

УДК 616.132.2-089.844

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА АРТЕРИЙ МЫШЕЧНО-ЭЛАСТИЧЕСКОГО ТИПА ПОСЛЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ**Мария Борисовна ВАСИЛЬЕВА, Давид Сергеевич СЕРГЕЕВИЧЕВ,
Наталья Анатольевна ПОДХВАТИЛИНА, Александр Михайлович КАРАСЬКОВ***ФГБУ Новосибирский НИИ патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина
Минздрава России
630055 г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15*

Цель: изучить влияние детергентного и ферментного способов децеллюляризации на структуру и биомеханические свойства сосудистого экстрацеллюлярного матрикса брахиоцефальных артерий. Материал и методы: фрагменты артерий децеллюляризовали детергентами или трипсином, после чего отмывали и исследовали гистологическими и физическим методами. Результат и обсуждение. Детергентный метод является более эффективным для удаления клеточного содержимого сосудистой стенки, при котором сохраняется исходная механическая прочность и пространственная структура соединительнотканного каркаса сосуда.

Ключевые слова: ткане-инженерный сосудистый аллогraft, детергентная децеллюляризация, тканевая инженерия, регенеративная медицина.

Облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей и коронарных артерий при ишемической болезни сердца нередко требуют проведения реконструктивно-восстановительного хирургического лечения. Большинство процедур, используемых для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связаны с имплантацией сосудистого трансплантата. Среди них шунтирование коронарных артерий для реваскуляризации миокарда, периферическое шунтирование для реваскуляризации конечности и создание артериовенозных фистул при диализе. Наилучшим образом для этого подходят аутососуды пациента. Однако в значительном проценте случаев собственного реконструктивного материала пациента недостаточно, что приводит к использованию синтетических протезов различных модификаций [6]. Случается, что в определенных ситуациях их использование сопряжено с опасностью возникновения тромбоза сосудистого протеза, инфекционных осложнений [16]. Отдельной задачей на сегодняшний день стоит создание сосудистого протеза, способного подвергаться ремоделированию, это особенно важно для детской кардиохирургии. Использование таких протезов позволит сократить число повторных операций у пациентов детского возраста,

поскольку такие аллогraftы будут способны расти по мере взросления пациента [13].

Ткане-инженерные сосудистые протезы, изготовленные на основе аллогенного донорского материала, на наш взгляд, могут стать хорошей альтернативой для протезов из искусственных материалов. Данные современных исследований показали, что использование в качестве биологических протезов соединительнотканых каркасов, полученных путем децеллюляризации, имеют очевидное преимущество перед протезированием «живыми» тканями и органами [5]. В процессе создания идеального ткане-инженерного сосуда важным этапом становится необходимость максимально полно удалить клетки из исходного донорского материала, при этом нарушение структурной и пространственной целостности соединительнотканного каркаса должно быть минимальным. Удаление жизнеспособных клеток донора, а также частей разрушенных клеточных стенок приводит к значительному снижению иммуногенности имплантата и, следовательно, к снижению риска постимплантационного воспаления, некробиоза и других дегенеративных процессов, запускаемых иммункомпетентными клетками пациента [19].

*Васильева М.Б. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии
Сергеевичев Д.С. – к.б.н., зав. лабораторией экспериментальной хирургии и морфологии
Подхватилина Н.А. – научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии
Караськов А.М. – академик РАМН, директор института*

Соединительнотканые каркасы представляют собой сложную пространственно-ориентированную систему структурных и функциональных белков экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), составляющих механическую основу ткани. Компоненты ЭЦМ, а это в основном коллаген и эластин, не имеют видоспецифичности и идентичны у большинства видов млекопитающих [7]. В настоящее время используются различные способы децеллюляризации биологического материала, каждый из которых имеет свои сильные и слабые стороны [8]. Так, по описанию в литературе, для децеллюляризации сосудистых и клапаносодержащих аллогraftов (легочный ствол, аорта) чаще других используют ферментные и детергентные способы [10, 14, 17].

Целью нашей работы являлось изучение влияния детергентного и ферментного способов децеллюляризации на структуру и биомеханические свойства сосудистого ЭЦМ на основе фрагментов брахиоцефальных артерий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили 30 фрагментов брахиоцефальных артерий (БЦА), полученных из секционного материала с использованием «чистого», но не стерильного способа забора. Время теплой ишемии составляло 13 ± 2 ч, общий период отсутствия кровообращения достигал 18 ч. Критерии забора тканей, противопоказания и параметры выбраковки были определены согласно рекомендациям Европейской ассоциации банков тканей [11].

После процедуры микродиссекции полученные сосудистые аллогraftы помещали в раствор «лечения» на основе питательной среды RPMI-1640 (Биолот, Санкт-Петербург) с добавлением комплекса антимикробных препаратов широкого спектра действия в цитотоксических дозировках [11]. Через 48 ч аллогraftы ополаскивали в фосфатном буфере с pH 7,4 и переносили в растворы для децеллюляризации.

Первая группа graftов БЦА ($n = 10$) была обработана детергентным способом согласно [14], вторая группа ($n = 10$) – ферментным способом согласно [17] с некоторыми нашими модификациями [1]. В качестве контроля (группа 3, $n = 10$) использовали размороженные криосохраненные фрагменты брахиоцефальных артерий.

Морфологическое исследование материала проводили по завершении процедуры децеллюляризации. Для этого с помощью ротационного микротомы Microm HM340E (Carl Zeiss, Герма-

ния) получали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином. Для мечения ядерного материала использовали DAPI. Аппаратное обеспечение: микроскопы Axiovert 200M с видеокамерой AxioCam HRC и Axioskop 40FL с видеокамерой AxioCam MRC, комплект программного обеспечения Axiovision 4.7 (Carl Zeiss, Германия).

Тензометрические испытания проводили согласно рекомендациям М.Б. Васильевой с соавт. [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ

При микроскопическом анализе образцов стенки БЦА в группе 1, окрашенных гематоксилином-эозином, ядра или какие-либо другие клеточные элементы не определялись (см. рисунок), при этом базальная мембрана была практически полностью сохранена и четко визуализирована. В группе 2 в образцах остаточный ядерный материал не визуализировался, базальная мембрана была значительно фрагментирована, а местами вообще отсутствовала. Кроме того, отмечалось разволокнение и набухание тканевых элементов.

Указанная тенденция была подтверждена также окраской ядерного материала препаратов с помощью DAPI. В группе 2 ядерный материал отсутствовал, волокна соединительнотканного каркаса были значительно изменены по своей конфигурации и взаимноориентации. В группе 1 при обработке детергентным способом компоненты экстрацеллюлярного матрикса практически не изменены. Сохранены упорядоченная структура и сетчатое расположение волокон, идентичное контролю.

Полученные данные проведенного физико-механического исследования показали, что средние значения максимальной разрушающей нагрузки в группах контроля и детергентной обработки значимо не различались, в то время как в группе с обработкой трипсином показатели прочностных характеристик были значительно ниже контрольных.

ОБСУЖДЕНИЕ

Замена поврежденного участка сосудистого русла – широко используемый метод в сердечно-сосудистой хирургии. На сегодняшний день перспективной альтернативой для синтетических протезов являются ткане-инженерные сосудистые протезы на основе биodeградируемой матрицы [13]. На наш взгляд, использование уже существующей натуральной соединительнотканной матрицы не менее перспективно для

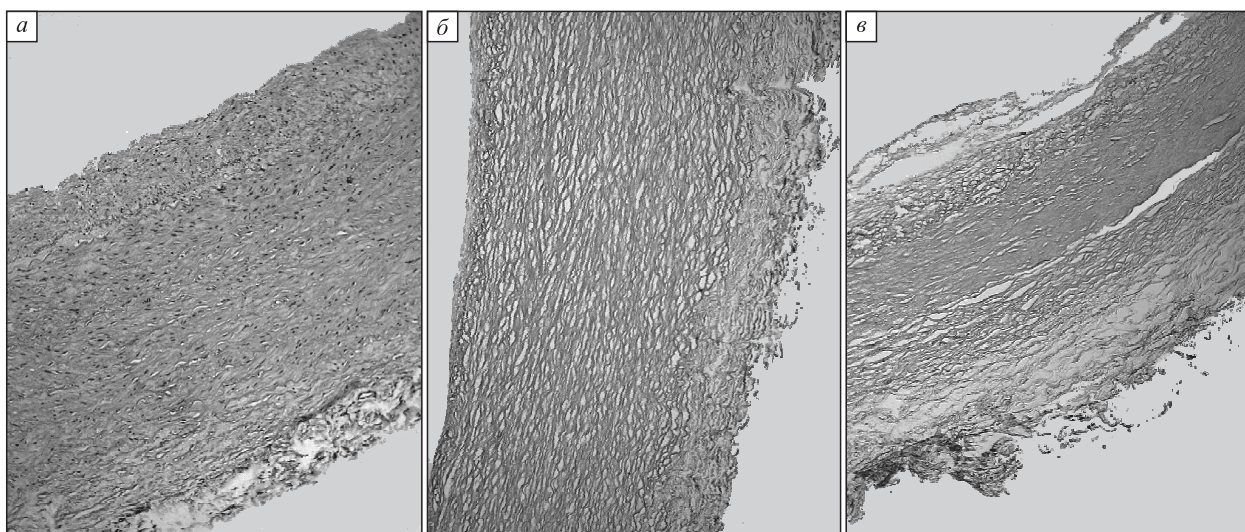


Рис. Поперечный срез брахиоцефальной артерии. Окрашено гематоксилин-эозином (объектив $\times 10$). а – контроль; б – децеллюляризация детергентами; в – ферментная децеллюляризация

работ по их дальнейшему заселению клетками и формированию ткане-инженерного сосудистого аллогraftа.

Многие авторы в своих работах используют ферментный способ децеллюляризации биологической ткани с ее дальнейшим процессингом как основной [3, 4, 17, 18]. Однако согласно результатам наших исследований, децеллюляризация ферментным способом имеет существенные недостатки. Так, в погоне за полной элиминацией остатков ядерного материала клеток дальнейшее увеличение концентрации трипсина и сроков экспозиции в растворе приводило к значительным повреждениям соединительной ткани, которые могли быть выявлены не только гистологическими методами и тензометрическими испытаниями, но и при обычном визуальном контроле. Наши данные согласуются с работами других авторов [9].

Важно отметить, что использование детергентов требует тщательной процедуры отмывки, так как они являются известными клеточными токсинами [12].

Данные по тензометрическим исследованиям фрагментов брахиоцефальных артерий аналогичны выводам наших предыдущих испытаний клапаносодержащих фрагментов легочных стволов и аорт [1, 2]. Сохранение механической прочности матриц сосудистых аллогraftов, обработанных детергентным способом, способно обеспечить более адекватное сопротивление гемодинамической нагрузке в условиях физиологической циркуляции и будет способствовать увеличению срока службы сосудистого протеза нового поколения.

Немаловажным остается решение вопроса о предотвращении тромбоза мелких сосудов, ведь именно эта проблема выходит на первый план при работе как с искусственными тканями, так и с ксенопротезами [15]. Заселение внутрисосудистой поверхности децеллюляризированной матрицы эндотелиальными клетками позволит решить эту проблему.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, децеллюляризация фрагментов брахиоцефальных артерий детергентным способом (сочетание натрия дезоксихолата и натрия додецилсульфата) является более эффективным методом удаления клеток из ткани в сравнении с ферментным способом. Полученные таким способом соединительнотканые матрицы по своим морфологическим и физико-механическим характеристикам пригодны для проведения дальнейших культуральных работ по заселению новыми клетками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева М.Б., Сергеевичев Д.С., Юношев А.С. и др. Морфофункциональная оценка ферментативного и детергентного способов децеллюляризации сердечных аллогraftов // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2012. (2). 77–81.
2. Сергеевичев Д.С., Васильева М.Б., Субботовская А.И. и др. Влияние детергентной и ферментной децеллюляризации на биомеханические свойства аортального аллогraftа // Вестн. НГУ. 2012. 10. (4). 29–35.
3. Субботин Д.В., Ларионов П.М., Сергеевичев Д.С. и др. Морфологическая и биофизическая

оценка (лазерно-индуцированная флюоресценция) структуры аорты на этапах биотехнологии аортального графта // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2008. (4). 81–84.

4. Субботин Д.В., Ларионов П.М., Сергеевичев Д.С. и др. Морфологическая оценка цитоархитектоники аортального графта на этапах биотехнологии с анализом изменений спектров лазерно-индуцированной флюоресценции // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. (4). 191–197.

5. Badylak S.F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction // Transplant. Immunol. 2004. 12. 367–377.

6. Enomoto S., Sumi M., Kajimoto K. et al. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material // J. Vasc. Surg. 2010. 51. (1). 155–164.

7. Exposito J.Y., D'Alessio M., Solursh M., Ramirez F. Sea urchin collagen evolutionary homologous to vertebrate pro- $\alpha 2$ (I) collagen // J. Biol. Chem. 1992. 267. 15559–15562.

8. Gilbert T.W., Sellar T.L., Badylak S.F. Decellularization of tissues and organs // Biomaterials. 2006. 27. 3675–3683.

9. Grauss R.W., Hazekamp M.G., van Vliet S. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2003. 126. (6). 2003–2010.

10. Honge J.L., Funder J., Hansen E. et al. Recellularization of aortic valves in pigs // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2011. 39. 829–834.

11. Jashari R., Goffin Y., Vanderkelen A. et al. European homograft bank: twenty years of cardiovascular tissue banking and collaboration with transplant coordination in Europe // Transplant. Proc. 2010. 42. 183–189.

12. Kasimir M.T., Rieder E., Seebacher G. et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves // Int. J. Artif. Organs. 2003. 26. 421–427.

13. Kurobe H., Maxfield M.W., Breuer C.K., Shinoka T. Concise review: Tissue-engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present, and future // Stem Cells Trans. Med. 2012. 1. (7). 566–571.

14. Lichtenberg A., Tudorache I., Cebotari S. et al. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions // Biomaterials. 2006. 27. 4221–4229.

15. Nieponice A., Soletti L., Guan J. et al. Development of a tissue engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique // Biomaterials. 2008. 29. (7). 825–833.

16. Pawlowski K.J., Rittgers S.E., Schmidt S.P., Bowlin G.L. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts // Front. Biosci. 2004. (9). 1412–1421.

17. Teebken O.E., Bader A., Steinhoff G., Havrich A. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2000. 19. 381–386.

18. Wilczek P. Heart valve bioprosthesis; effect of different acellularizations methods on the biomechanical and morphological properties of porcine aortic and pulmonary valve // Bull. Pol. Ac.: Tech. 2010. 58. (2). 337–342.

19. Zehr K.J., Yagubyan M., Connolly H.M. et al. Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: Postoperative immunoreactivity and early results // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2005. 130. 1010–1015.

MORPHO-FUNCTIONAL EVALUATION OF MUSCULO-ELASTIC ARTERIES FRAGMENTS AFTER DECELLULARIZATION

Mariya Borisovna VASIL'EVA, David Sergeevich SERGEEVICHEV, Natal'ya Anatol'evna PODKHAVATILINA, Alexandr Mikhaylovich KARAS'KOV

FSBI Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology named after Academician E.N. Meshalkin 630055, Novosibirsk Rechnunovskaya str., 15

Aim: To study the effect of detergent and enzyme decellularization methods on the morphology and biomechanical properties of the vascular extracellular matrix of the brachiocephalic arteries. **Material and Methods:** Fragments of arteries were decellularized by detergents or trypsin, and then washed and examined with histological and physical methods. **Results.** Detergent method is more effective for purification of the vessel walls from the cells, maintaining its original mechanical strength and the spatial structure of the framework.

Key words: tissue-engineered vascular allograft, detergent decellularization, tissue engineering, regenerative medicine.

Vasil'eva M.B. – candidate of medical sciences, researcher of the laboratory of experimental surgery and morphology
Sergeevichev D.S. – candidate of biological sciences, head of the laboratory of experimental surgery and morphology
Podkhvatilina N.A. – researcher of the laboratory of experimental surgery and morphology
Karas'kov A.M. – academician of RAMS, director

ЗНАЧЕНИЕ ФАЗОВОГО СОСТАВА КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ ПОКРЫТИЙ ДЛЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *IN VIVO*

**Владимир Петрович ПОПОВ¹, Марина Юрьевна ХЛУСОВА²,
Константин Васильевич ЗАЙЦЕВ³, Марина Владимировна ДВОРНИЧЕНКО²,
Елена Викторовна ЛЕГОСТАЕВА², Игорь Альбертович ХЛУСОВ^{2,5},
Юрий Петрович ШАРКЕЕВ², Сергей Васильевич ГНЕДЕНКОВ⁴**

¹ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

²НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при Томском политехническом университете,
Сибирском государственном медицинском университете и Институте физики прочности и
материаловедения СО РАН
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ФГБУН Томский НИИ курортологии и физиотерапии ФМБА России
634050, г. Томск, ул. Розы Люксембург, 1

⁴ФГБУН Институт химии ДВО РАН
690022, г. Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159

⁵ООО «Биоконструктор-С»
634021, г. Томск, ул. Сибирская, 31

Цель: изучить влияния фазового состава искусственных кальцийфосфатных поверхностей на остеогенную дифференцировку стромальных стволовых клеток *in vivo* на имплантатах с фиксированным диапазоном шероховатости. Материал и методы. Состояние поверхности оценивалось с помощью измерительной системы Talysurf 5-120, фазовый состав – дифрактометром Shimadzu XRD-7000, элементный состав – на электронном микроскопе Hitachi S5500. 35 мышам-самцам линии CBA/CaLac подкожно вводили по 1 имплантату из титана марки BT1.0 (диаметр 12 мм, толщина 1 мм) с шероховатым кальцийфосфатным покрытием, нанесенным микродуговым оксидированием, со столбиком костного мозга. Гистологическое исследование проводили через 45 дней. Компьютерной морфометрией определяли количественные параметры выросших тканевых пластинок. Результаты. На пластинах с искусственными поверхностями отмечен рост грубоволокнистой костной ткани с полостями, заполненными красным костным мозгом. Воспроизводимость ее на 22 % выше на покрытиях, в состав которых входят трикальцийфосфат и/или гидроксилапатит, по сравнению с аморфными фосфатами кальция.

Ключевые слова: имплантаты, шероховатость, мышцы, костный мозг, стволовые клетки.

Попов В.П. – к.м.н., ассистент кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии,
e-mail: ortopvp@mail.ru

Хлусова М.Ю. – к.м.н., доцент кафедры патофизиологии, e-mail: uchsovet@ssmu.ru

Зайцев К.В. – к.м.н., зав. лабораторией изучения механизмов действия физических факторов,
e-mail: zaitsev-kv@mail.ru

Дворниченко М.В. – к.м.н., докторант кафедры патофизиологии, e-mail: dochic@yandex.ru

Легостаева Е.В. – к.ф.-м.н., старший научный сотрудник НОЦ “БМБ” и лаборатории физики наноструктурных биосовместимых композитов, e-mail: lego@ispms.tsc.ru

Хлусов И.А. – д.м.н., проф., проф. кафедры морфологии и общей патологии, научный руководитель НОЦ “БМБ”, e-mail: khlusov63@mail.ru

Шаркеев Ю.П. – д.ф.-м.н., проф., зав. лабораторией физики наноструктурных биосовместимых композитов, член Совета НОЦ “БМБ”, e-mail: sharkeev@ispms.tsc.ru

Гнеденков С.В. – д.х.н., зам. директора, e-mail: svg21@hotmail.com

В настоящее время *in vitro* достигнуты значительные успехи в индустрии дифференцировки и созревания стромальных стволовых клеток (ССК) в различных направлениях. Тем не менее добиться реализации необходимого потенциала стромальных прекурсоров *in vivo* гораздо труднее. Направить потенциал ССК по остеогенному пути и создать специфическое микроокружение во многих случаях позволяет scaffold-технология, носителем которой для костной ткани являются кальцийфосфатные (КФ) материалы [4].

Различные образцы КФ материалов, в зависимости от физико-химических свойств (степень кристалличности и пористости, растворимость, шероховатость поверхности и т. д.), обладают разной способностью поддерживать костеобразование. Имплантаты с КФ покрытием активно используются при экспериментальном и клиническом остеосинтезе [3]. Однако до сих пор не удалось найти ключевое сочетание структуры, толщины и скорости растворения покрытия для реализации остеогенного потенциала ССК.

Предполагают, что для проявления остеиндуктивных свойств КФ поверхности необходимо, чтобы она имитировала структуру костной ткани, т. е. имела поры, диаметр которых должен быть сравним с диаметром остеонов. При меньшем или большем размере пор рост кости практически отменяется [6].

Другим свойством искусственных поверхностей, влияющим на адгезию, миграцию и остеогенную дифференцировку стромальных клеток, является шероховатость. Получены доказательства того, что КФ поверхность, даже без наличия макропор, способствует прилипанию ССК и поверхностному остеогенезу. На покрытиях, выполненных из оксида титана, кость из столбика костного мозга не образуется [7].

Не менее важным в этом процессе является содержание в КФ материалах таких компонентов, как гидроксилapatит ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, ГАП) и трикальцийфосфат ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ТКФ) в соотношении 7:3. Если оно меняется, то процесс образования кости тормозится [5].

Целью проведенной работы явилось изучение влияния фазового состава искусственных кальцийфосфатных поверхностей, полученных по одной технологии, на остеогенную дифференцировку стромальных стволовых клеток *in vivo* на имплантатах с фиксированным диапазоном шероховатости.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве модельных имплантатов применяли пластины из титана марки BT1.0 (диаметр

12 мм, толщина 1 мм), несущие двусторонние шероховатые КФ покрытия. Покрытия (показатель шероховатости Ra в области 2–3 мкм) наносили на металлическую подложку с помощью модификаций способа анодно-искрового (микродугового) оксидирования и состава электролита [2, 9].

Состояние поверхности оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью измерительной системы Talysurf 5-120 (разрешающая способность 10 нм). Определяли Ra (мкм) – показатель шероховатости в пределах нескольких длин участков измерений согласно ГОСТ 2789-73.

Оценку адгезии кальцийфосфатного покрытия к подложке проводили «методом отрыва» на испытательной машине Instron-1185. Толщина покрытий была измерена с помощью микрометра МК-25.

Для определения фазового состава покрытий применялся рентгенофазовый анализ, выполненный с помощью дифрактометра Shimadzu XRD-7000 (Япония). Интерпретация дифрактограмм проводилась на основе базы данных International Center for Diffraction Data (ICDD). Элементный состав покрытий определяли методом энергодисперсионной спектроскопии на электронном микроскопе Hitachi S5500 (Япония).

В биологической части экспериментов использовали 35 мышей-самцов линии СВА/CaLac из коллекционного фонда НИИ фармакологии СО РАМН (Томск). Имплантаты вводили 21 животному, 14 мышам служили источником столбика сингенного костного мозга, выделяемого из бедренной кости. Исследования выполняли с согласия локального этического комитета Сибирского государственного медицинского университета (заключение № 1923 от 28.03.2011), согласно нормам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, приказу Минздрава СССР № 577 от 12.08.77 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Животным под эфирным наркозом подкожно вводили по одному имплантату с нанесенным в асептических условиях столбиком костного мозга (средняя площадь трансплантатов 7–7,5 мм²), взятого из бедренной кости сингенных мышей. Для адгезии клеток органную культуру костного мозга на подложке культивировали в течение 45 мин в культуральной среде, содержащей 95 % среды RPMI-1640 («Биолот», Санкт-Петербург) и 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (ICN Pharmaceuticals). Костный мозг служил

источником мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и ростовых факторов. При раздельном подкожном введении мышам подложек и фрагментов костного мозга образования тканевых пластинок не наблюдалось.

Через 45 дней имплантаты извлекали (рис. 1), фотографировали в отраженном свете с фиксированными параметрами. Снимали тканевые пластинки с поверхности дисков, декальцинировали, заливали парафином и выполняли тонкие (10 мкм) срезы перпендикулярно основанию тканевых пластинок, окрашивали гематоксилином-эозином для гистологических исследований. Позитивным результатом эктопического теста считали рост на поверхности пластинки кости и костного мозга (рис. 2), негативным – развитие мышечной или соединительной ткани и ее производных (жировая ткань).

Методику компьютерной морфометрии применяли для выявления количественных параметров выросших тканевых пластинок и гистологических срезов посредством измерения их количественных характеристик. Площадь костной и кроветворной ткани на серийных срезах тканевых пластинок определяли с помощью программы ImageJ [1]. В связи с различным объемом трансплантатов на подложках площадь формирующихся тканевых пластинок выражали в процентах от исходной площади трансплантированного костного мозга. Группой сравнения служили имплантаты, несущие микродуговое покрытие, основные фазы которого составили диоксид титана (TiO_2) и аморфные (примитивные) кальцийфосфаты. Данные

образцы способствуют воспроизводимому на 75–85 % росту костной ткани в тесте эктопического остеогенеза [2].

При проведении статистической обработки определяли среднее значение (X) и ошибку среднего (m) с использованием гипотезы нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова), результаты представляли в виде $X \pm m$. Для выявления статистической значимости различий выборку применяли критерий Манна–Уитни (U -тест). С целью выявления связи между исследуемыми показателями применяли определение коэффициентов ранговой корреляции по Спирмену (r). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эктопическая метаплазия костного мозга *in vivo* протекает через активацию пула донорских (в нашем случае костно-мозговых) ССК, дифференцирующихся в предшественники и потомки хондро/остеообластогенеза. Это является важнейшим условием развития кроветворного микроокружения для заселения кроветворных стволовых клеток реципиента и формирования эктопических очагов кость/костный мозг [7]. В связи с этим процессы, протекающие на пластинках с КФ покрытием, связанные с остеогенным созреванием и дифференцировкой ССК, можно считать остеоиндуктивными.

Исследование реакции биологических тканей, окружающих имплантаты, показало, что

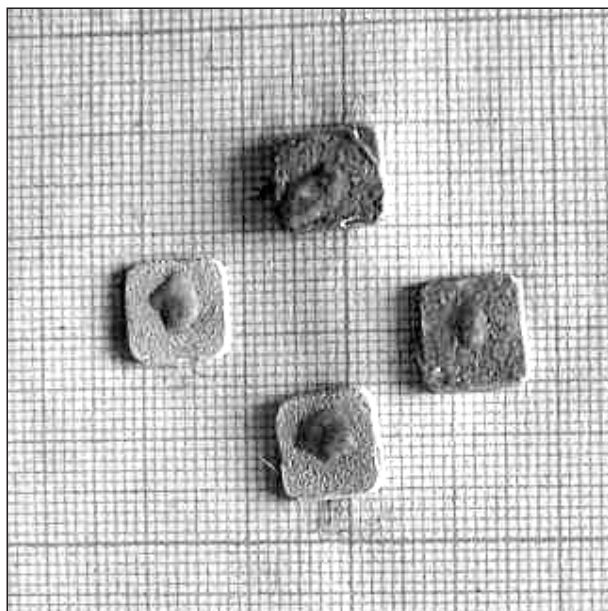


Рис. 1. Вид тканевых пластинок, выросших в тесте эктопического костеобразования на мышях

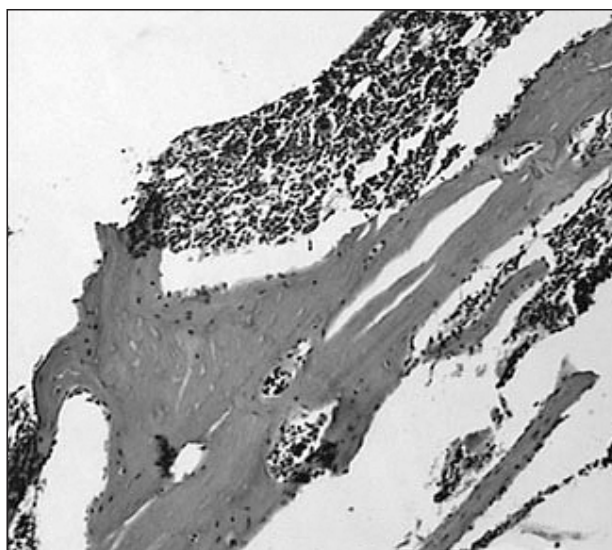


Рис. 2. Гистологическая картина срезов тканевых пластинок, выросших на кальцийфосфатных покрытиях в тесте эктопического остеогенеза. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. $\times 100$

Таблица 1

Физико-химические и биологические характеристики имплантатов с кальцийфосфатным микродуговым покрытием

Ra, мкм	Вариант покрытия	Основной фазовый состав покрытия	Ca/P	Вероятность образования тканевой пластинки, %	Вероятность образования кости, %
2,15–2,86	Группа TiO ₂ с аморфными кальцийфосфатами	TiO ₂ -анатаз; TiP ₂ O ₇ ; CaH ₂ P ₂ O ₇ ; Ca(H ₂ PO ₃) ₂	1,14 ± 0,19	100 n = 9	78
1,79–3,09	Группа фосфатов кальция и ТКФ	TiP ₂ O ₇ ; CaH ₂ P ₂ O ₇ ; Ca(H ₂ PO ₃) ₂ ; Ca(PO ₃) ₂ ; Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,65 ± 0,22	100 n = 6	100
2,85–3,58	Группа фосфатов кальция, ТКФ и ГАП	Промежуточные формы КФ; Ca ₅ (PO ₄) ₃ ОН	2,19 ± 0,21*	100 n = 6	100

* Отличие от величины соответствующего показателя в группе аморфных кальцийфосфатов статистически значимо при $p < 0,007$.

Таблица 2

Морфометрические характеристики тканевых пластинок, выросших в тесте эктопического остеогенеза на имплантатах с различным фазовым составом кальцийфосфатных покрытий

Ra, мкм	Вариант покрытия	Основной фазовый состав покрытия	Площадь тканевой пластинки, % от площади костного мозга	Площадь кости в тканевой пластинке, %
2,15–2,86	Группа TiO ₂ с аморфными кальцийфосфатами	TiO ₂ -анатаз; TiP ₂ O ₇ ; CaH ₂ P ₂ O ₇ ; Ca(H ₂ PO ₃) ₂	197,80 ± 27,20	48,12 ± 8,48 n = 72
1,79–3,09	Группа фосфатов кальция и ТКФ	TiP ₂ O ₇ ; CaH ₂ P ₂ O ₇ ; Ca(H ₂ PO ₃) ₂ ; Ca(PO ₃) ₂ ; Ca ₃ (PO ₄) ₂	118,12 ± 26,68	41,35 ± 5,47 n = 48
2,85–3,58	Группа фосфатов кальция и ГАП	Промежуточные формы КФ; Ca ₅ (PO ₄) ₃ ОН	244,19 ± 42,41# <0,05	64,79 ± 17,64 n = 50

* Отличие от величины соответствующего показателя в группе ТКФ статистически значимо при $p < 0,05$.

через 45 суток после подкожного введения подложек, несущих сингенный костный мозг, не отмечалось признаков воспалительной реакции ни в одной из групп наблюдения. Следует указать на высокую биосовместимость имплантатов, вызывающих только слабую инкапсуляцию, говорящую о незначительной реакции подкожной клетчатки на их введение.

Способность тканевых пластинок формироваться из костного мозга для всех биосовместимых пластин с КФ покрытием составила 100 % (табл. 1). На гистологических срезах выявлялась в основном грубоволокнистая костная ткань с лакунами, заполненными красным костным мозгом (см. рис. 2).

Тем не менее в случае «примитивных» (аморфных) КФ покрытий (не содержащих ТКФ или ГАП) в 2 из 9 случаев вместо кости была обнаружена соединительная ткань. Полученные результаты во многом совпадают с ранее описанными данными для такого рода покрытий [4].

Таким образом, вероятность образования костной ткани из столбика костного мозга на 22 % выше в случае использования покрытий, включающих в свой состав ТКФ или ГАП (см. табл. 1), которые являются основными минералами костной ткани. При этом отмечена прямая зависимость вероятности формирования костной ткани от соотношения кальция к фосфору в составе КФ покрытия ($r = 0,58$; $n = 13$; $p < 0,04$). Данное соотношение отражает, как известно, не только элементный, но и, в определенной степени, фазовый состав КФ материалов.

Считается, что ГАП и ТКФ обладают остеокондуктивными свойствами [3]. В связи с этим были определены площади тканевых пластинок и площади костной ткани на их гистологических срезах на имплантатах с различным фазовым составом КФ покрытий. Результаты показали, что площадь костной ткани коррелировала с площадью тканевых пластинок ($r = 0,69$; $n = 11$; $p < 0,019$). Другими словами, остеокондуктивность определяется гистокондуктивны-

ми свойствами КФ поверхностей. Однако нам не удалось установить, что фазовый состав фосфатов кальция имеет существенное значение для распространения (кондукции) ССК донора по шероховатой поверхности имплантатов с последующей остеогенной дифференцировкой (табл. 2).

Расширяется применение имплантатов с КФ покрытиями в клинической практике, поскольку они улучшают параметры межфазной границы раздела искусственный материал/кость, во многом определяющей эффективность имплантатов для остеосинтеза. Однако одновременно нарастает биомеханическая проблема, которая до сих пор не решена. Приближение свойств покрытия к характеристикам костной ткани (биомиметическое направление) приводит к ухудшению прочности межфазной границы подложка/покрытие [3]. Так, например, согласно нашим данным (рис. 3), увеличение толщины микродуговых КФ покрытий статистически значимо снижает их адгезию к металлической подложке.

В связи с этим стремление материаловедов получить «идеальный имплантат» для остеосинтеза за счет достижения в КФ покрытиях биологического соотношения фаз ГАП и ТКФ имеет неоднозначное значение для биомеханических свойств композитов подложка/покрытие и процессов остеокондукции и остеоиндукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В тесте эктопического костеобразования на пластинах, несущих искусственные шероховатые кальцийфосфатные покрытия с различным фазовым составом, путем остеоиндукции формируется грубоволокнистая костная ткань с полостями, заполненными красным костным мозгом.

2. Наличие трикальцийфосфата или гидроксилапатита в составе кальций-фосфатного покрытия, по сравнению с примитивными фосфатами кальция, увеличивает на 22 % воспроизводимость роста костной ткани в тесте эктопического остеогенеза, но не влияет на размеры формирующегося костного очага.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / Ред. В.В. Новицкий, В.П. Шахов, И.А. Хлусов. Томск: STT, 2004. 386 с.
2. Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синябрюхов С.Л. и др. Кальцийфосфатные биоактивные

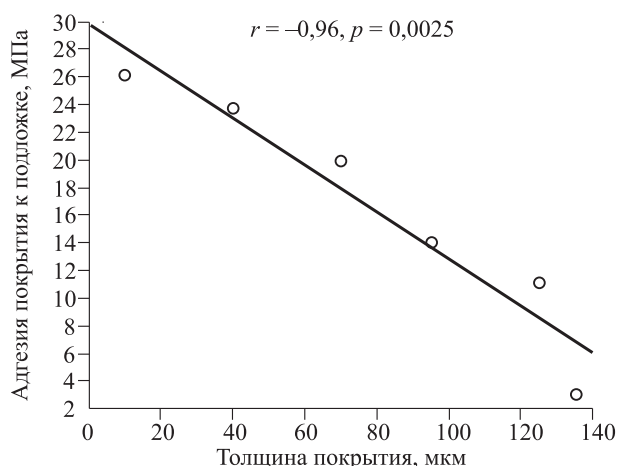


Рис. 3. Обратная регрессионная зависимость адгезии микродуговых кальцийфосфатных покрытий к титановой подложке при испытаниях «на отрыв»

покрытия на титане // Вестник ДВО РАН. 2010. (5). 47–57.

3. Карлов А.В., Саприна Т.В., Кириллова Н.А. и др. Некоторые клинические и патофизиологические вопросы и перспективы хирургической коррекции остеопении у пациентов с несовершенным остеогенезом // Гений ортопедии. 2008. (4). 84–88.

4. Хлусов И.А., Шевцова Н.М., Хлусова М.Ю. и др. Концепция «ниша-рельеф» для стволовых клеток как основа биомиметического подхода к инженерии костной и кроветворной тканей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. VI. (2). 55–64.

5. Ayers R.A., Simske S.J., Mumes C.R., Wolford L.M. Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans // J. Oral Maxillofac. Surg. 1998. 56. 1297–1301.

6. Bruijn J.D. Calcium phosphate biomaterials: Bone-bonding and biodegradation properties. Leiden, 1993. 170 p.

7. Chan C.K.F., Chen C.C., Luppen C.A. et. al. Endochondral ossification is required for hematopoietic stem cell niche formation // Nature. 2009. 457. 490–494.

8. Scadden D.T. The stem cell niche in health and leukemic disease // Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2007. 20. 19–27.

9. Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Eroshenko A. Yu. et. al. The structure and physical and mechanical properties of a novel biocomposite material, nanostructured titanium-calcium-phosphate coating // Composite Interfaces. 2009. 16. 535–46.

A SIGNIFICANCE OF PHASE COMPOSITION OF CALCIUM PHOSPHATE COATINGS FOR *IN VIVO* OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF STROMAL STEM CELLS

Vladimir Petrovich POPOV¹, Marina Yur'yevna KHLUSOVA²,
Konstantin Vasil'yevich ZAITSEV³, Marina Vladimirovna DVORNICHENKO²,
Elena Viktorovna LEGOSTAEVA², Igor' Al'bertovich KHLUSOV^{2,5},
Yuriy Petrovich SHARKEEV², Sergey Vasil'yevich GNEDENKOV⁴

¹ Siberian State Medical University
634050, Tomsk, Moskovskiy trakt, 2

² Scientific Educational Center "Biocompatible Materials and Bioengineering", Tomsk Polytechnic University, Siberian State Medical University, Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS
634050, Tomsk, Moskovskiy trakt, 2

³ Tomsk Scientific Research Institute of Balneology and Physiotherapy
634021, Tomsk, Sibirskaya str., 31

⁴ Institute of Chemistry FEB RAS
690022, Vladivostok, Vladivostok centenary str., 159

⁵ "Bioconstructor-S" Ltd.
634050, Tomsk, Roza Luxemburg str., 1

Purpose: to study the effect of the phase structure artificial calcium – phosphatic surfaces on an osteogenic differentiation of stromal stem cells *in vivo* on implants with the fixed range of roughness. Materials and methods. The condition of the surface was estimated by means of the measuring system Talysurf 5-120, phase structure – by the diffractometer Shimadzu XRD-7000 (Japan), element structure – by the electron microscope of Hitachi S5500. An implant from the titan of the VT1.0 brand (diameter of 12 mm, thickness of 1 mm) with the rough calcium phosphate coating applied by microarc oxidation with a column of bone marrow has been hypodermically placed to 35 mice males of the CBA/CaLac line. Histological research was carried out in 45 days. The quantitative parameters of grown tissue plates were defined by the computer morphometry. Results. The growth of coarse-fibered bone tissue with the cavities filled by red marrow has been revealed on plates with artificial surfaces. Its reproducibility was 22 % higher on surfaces composed of tricalcium phosphate and hydroxylapatite compared with amorphous calcium phosphate.

Key words: implants, roughness, mice, bone marrow, stem cells.

Popov V.P. – candidate of medical sciences, assistant of the chair of traumatology, orthopedics and field surgery, e-mail: ortopvp@mail.ru

Khlusova M.Yu. – candidate of medical sciences, associate professor of the department of pathophysiology, e-mail: uchsovet @ssmu.ru

Zaitsev K.V. – candidate of medical sciences, head of the laboratory for study of mechanisms of physical factors effect, e-mail: zaitsev-kv@mail.ru

Dvornichenko M.V. – candidate of medical sciences, doctoral student of the chair for pathophysiology, e-mail: dochic@yandex.ru

Legostaeva E.V. – candidate of physical mathematical sciences, senior researcher of the laboratory of physics of nanostructural biocompatible composites, e-mail: lego@ispms.tsc.ru

Khlusov I.A. – doctor of medical sciences, professor, scientific director, professor of the chair for morphology and general pathology, e-mail: khlusov63@mail.ru

Sharkeev Yu.P. – doctor of physical mathematical sciences, professor, head of the laboratory of physics of nanostructural biocompatible composites, e-mail: sharkeev@ispms.tsc.ru

Gnedenkov S.V. – doctor of chemical sciences, deputy director, e-mail: svg21@hotmail.com

УДК:617.51+617.53]-006.61-033.2:611-018.98:577.15:547.96

РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ HIF-1 α , NF- κ B И ФАКТОРА РОСТА СОСУДОВ ПРИ ЛИМФОГЕННОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ

**Евгений Лхамациренович ЧОЙНЗОНОВ, Людмила Викторовна СПИРИНА,
Ирина Викторовна КОНДАКОВА, Светлана Юрьевна ЧИЖЕВСКАЯ,
Дмитрий Александрович ШИШКИН, Денис Евгеньевич КУЛЬБАКИН**

*ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5*

С целью изучения экспрессии транскрипционных факторов NF- κ B, HIF-1 α и VEGF, особенностей их регуляции при лимфогенном метастазировании плоскоклеточных карцином головы и шеи обследовано 66 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом (T₂₋₃N₀₋₂). Экспрессия транскрипционных факторов и VEGF исследована иммуноферментным методом, активность протеасом и кальпаинов – флуориметрически. Субъединичный состав протеасом определяли методом вестерн-блоттинга. В результате проведения исследования выявлена связь лимфогенного метастазирования опухолей головы и шеи с экспрессией ядерного фактора NF- κ B p50 и с содержанием LMP2-субъединицы протеасом.

Ключевые слова: транскрипционные факторы NF- κ B и HIF-1 α , фактор роста эндотелия сосудов, протеасома, кальпаины, плоскоклеточные карциномы головы и шеи.

Плоскоклеточные карциномы головы и шеи (ПКГШ) относятся к числу социально значимых онкологических заболеваний. Несмотря на то, что ПКГШ являются опухолями наружной локализации, они характеризуются высокой запущенностью, связанной с анатомо-топографическими особенностями, бессимптомным течением и высокой агрессивностью заболевания [24]. Известно, что биологическое поведение опухоли определяет развитие и прогрессирование заболевания, однако молекулярный патогенез ПКГШ исследован недостаточно. К числу патогенетически важных молекул относятся ростовые и транскрипционные факторы [3, 27, 28].

Гипоксический фактор транскрипции HIF-1 является гетеродимером, состоящим из α - и β -субъединиц. β -Субъединицы конститутивны;

активность фактора в условиях гипоксии зависит главным образом от экспрессии и посттрансляционной модификации α -субъединиц [16]. Непосредственным следствием активации транскрипционного фактора HIF-1 α является продукция сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), который обеспечивает интенсивный рост сосудов, что, в свою очередь, создает условия для метастазирования и распространения опухоли [20].

Ключевым фактором транскрипции, связанным с процессами апоптоза и контролем пролиферации клеток, служит NF- κ B (nuclear factor kappa B). NF- κ B активен только в димерной форме, наиболее распространены димеры субъединиц p50 или p52 с субъединицей p65 [13]. Соотношение p65 к p50 менее единицы может

Чойнзонов Е.Л. – д.м.н., проф., академик РАМН, директор, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Спирин Л.В. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, e-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru

Кондакова И.В. – д.м.н., проф., зав. лабораторией биохимии опухолей, e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Чижевская С.Ю. – к.м.н., старший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Шишкин Д.А. – к.м.н., старший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@sibmail.com

Кульбакин Д.Е. – младший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

свидетельствовать о синтезе функционально неактивных димеров NF-κB [9]. Взаимное влияние транскрипционных факторов свидетельствует о наличии сложной системы регуляции их уровня. В настоящее время установлено влияние NF-κB на экспрессию транскрипционного фактора HIF-1α и его активацию [28].

Развитие и прогрессирование злокачественных новообразований области головы и шеи тесно связано с экспрессией транскрипционных и ростовых факторов. Высокая экспрессия HIF-1α, наблюдаемая в ткани ПКГШ, сочетается с повышением уровня VEGF, с увеличением плотности микрососудов и распространением опухоли на регионарные лимфоузлы [19]. Выявлено, что экспрессия транскрипционного фактора NF-κB также повышена в случае плоскоклеточного рака гортани по сравнению с неизмененным эпителием и связана со стадией заболевания [14]. В свою очередь применение ингибиторов NF-κB на культуре плоскоклеточного рака приводит к снижению экспрессии проангиогенных пептидов, в том числе и VEGF [30].

Одним из механизмов регуляции содержания транскрипционных факторов NF-κB и HIF-1α является внутриклеточный протеолиз, который осуществляется внутриклеточными протеиназами, к числу которых относят протеасомы и кальпаины [5]. Протеасомы представляют собой мультиферментативные каталитические комплексы, в которых происходит деградация до 80 % собственных белков клетки. Они представлены двумя пулами: 26S- и 20S-протеасомами. Активность протеасом тесно связана с их субъединичным составом. Известно, что появление иммунных типов (LMP7, LMP2, RA28) субъединиц в составе протеасом связано с изменением их ферментативной активности [4]. В настоящее время активно изучается роль протеасом в патогенезе злокачественных образований различных локализаций, в частности, молочной железы [7], кишечника [29], а также плоскоклеточных карцином головы и шеи [8, 17]. Активация системы протеасом показана при развитии опухолей головы и шеи, что сопровождается структурными изменениями в их субъединичном составе [2]. Семейство кальций-зависимых протеиназ представлено кальпаинами, из которых наиболее изучены и распространены кальпаин-1 и 2 [11]. Известно, что экспрессия кальпаинов повышается в случае плоскоклеточного рака кожи [23].

В настоящее время широко изучается вопрос протеолитической регуляции экспрессии транскрипционных и ростовых факторов внутриклеточными протеиназами. Известно, что снижение

деградации HIF-1α при использовании ингибиторов протеасом или при гипоксии приводит к значительному повышению экспрессии VEGF в опухолевых клетках [31]. Активация транскрипционного фактора NF-κB также осуществляется протеасомами [5]. В отсутствие стимулирующих сигналов NF-κB находится в цитоплазме в ассоциации с ингибитором (IκB). Ключевым этапом активации NF-κB являются освобождение его из комплекса с IκB и протеасомная деградация последнего [15]. В настоящее время показано, что в определенных условиях разрушение ингибитора IκB возможно при участии кальпаинов [18]. Дополнительным механизмом регуляции служит посттрансляционная модификация p105 – предшественника NF-κB p50, которая также осуществляется с помощью протеасом [22].

На сегодняшний день протеолитическая регуляция экспрессии транскрипционных и ростовых факторов, их взаимное влияние в злокачественных опухолях ПКГШ изучены недостаточно. В частности, нет понимания особенностей функционирования протеаз и регуляции ими транскрипционных факторов и VEGF при метастазировании. Цель настоящего исследования заключалась в изучении экспрессии транскрипционных факторов NF-κB, HIF-1α и сосудистого эндотелиального фактора роста, особенностей их протеолитической регуляции в ткани плоскоклеточных карцином области головы и шеи и при лимфогенном метастазировании.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 66 пациентов (средний возраст $57,1 \pm 1,7$ года) с морфологически верифицированным диагнозом плоскоклеточного рака области головы и шеи T₂₋₃N₀₋₂, в том числе 25 больных раком гортани и гортаноглотки, 23 пациента с опухолями ротовой полости и 18 больных с раком языка. Объемы диагностики (Международная классификация стадий развития раковых опухолей TNM 2009 г.) и лечения больных соответствовали рекомендуемым алгоритмам объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований, утвержденным Министерством здравоохранения и социального развития РФ. Всем пациентам проведено хирургическое иссечение опухоли. При наличии регионарных метастазов выполняли фасциально-футлярное иссечение шейной клетчатки, операцию Кайла. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, получено информированное согласие от каждого пациента.

Материалом для исследования протеасом явились образцы опухолевой и гистологически

неизменной ткани, находящиеся на расстоянии не менее 2 см от границы опухолей, которые были получены при выполнении радикального оперативного вмешательства. Весь материал проходил гистологическую верификацию. Образцы тканей замораживались и хранились при -80°C .

Приготовление ядерных экстрактов для определения содержания HIF-1 α и NF- κ B (форм p50 и p65) проводилось в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя Caymanchem (США). Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ NaCl. Гомогенат центрифугировали при 2400g и 4°C ("Eppendorf", Германия) для получения осадка, который ресуспендировали в 50 мкл 50 мМ Трис-HCl буфера (pH 7,5), состоящего из 2 мМ АТР, 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ NaCl, и затем центрифугировали при 14000g и 4°C . Полученный супернатант использовали для определения экспрессии транскрипционных факторов.

Определение содержания транскрипционных факторов. Экспрессию активированных форм NF- κ B p50, p65 и HIF-1 α определяли в ядерных экстрактах иммуоферментным методом с помощью наборов Caymanchem (США). Содержание белка в гомогенатах и ядерных экстрактах измеряли по методу Лоури [21]. Результаты определения содержания ростовых факторов выражали в нг/мг белка, а транскрипционных факторов – в условных единицах на 1 мг белка в лунке.

Получение осветленных гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ NaCl. Гомогенат центрифугировали 60 минут при 10000g и 4°C , надосадочную фракцию отбрасывали.

Фракционирование протеасом. Все процедуры проводили при 4°C . Белки осветленных гомогенатов фракционировали с помощью сульфата аммония в два этапа. Фракцию, обогащенную 26S-протеасомами, получали добавлением сульфата аммония до 40 % насыщения, фракцию 20S-протеасом – добавлением сульфата аммония до 70 % насыщения [1]. В полученных фракциях определяли активность протеасом.

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную активность общего пула протеасом, 26S- и 20S-пулов определяли в ос-

ветленных гомогенатах опухолевых и неизменных тканей, а также во фракциях протеасом, по гидролизу флуорогенного олигопептида N-сукцинил-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амидо-4-метилкумарина (Suc-LLVY-AMC, Sigma, США) химотрипсинподобными центрами протеасом [6], используя флуориметр «Hitachi-850» (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Реакционная смесь для определения активности 20S протеасом содержала 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ дитиотреитола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC. Для определения активности 26S-протеасом в реакционную смесь дополнительно вводили 5 мМ хлорида магния и 1 мМ АТФ. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин и останавливали 1%-м додецилсульфатом натрия. Для оценки активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеасом MG132 (Sigma, США). Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка, за единицу активности (МЕ) принимали количество фермента, при котором гидролизуется 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в течение 1 мин. Содержание белка определяли по методу Лоури [21].

Определение активности кальпаинов. Активность кальпаинов определяли в осветленных гомогенатах тканей по гидролизу Suc-LLVY-AMC [25], используя флуориметр «Hitachi-850» при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Реакционная смесь содержала 100 мМ Tris-HCl (pH 7,3), 145 мМ NaCl. Реакцию проводили, добавляя к 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, растворенного в реакционной смеси, 5 мкл супернатанта и инкубируя при 25°C в течение 30 мин в присутствии или в отсутствие 10 мМ CaCl_2 , 50 мкМ ингибитора N-ацетил-Leu-Leu-норлейцина (Sigma, США).

Электрофорез. Электрофорез проводили по Laemmli в 13%-м полиакриламидном геле. Пробы наносили в буфере, содержащем 0,0625M трис-HCl (pH 6,8), 2 % додецилсульфата натрия, 5 % 2-меркаптоэтанола, 10 % глицерина, 0,01 % бромфенолового синего.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза белков осуществляли перенос полипептидов на нитроцеллюлезную мембрану Hybond-ECL (Amersham, США). Мембрану инкубировали в течение 2 часов при 20°C в буфере TNT, содержащем 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween-20. Затем мембрану инкубировали в том же буфере, содержащем 5%-е обезжиренное молоко и моноклональные антитела к субъединицам $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$, LMP7, Rpt6 и поликлональные антитела к субъеди-

ницам LMP2 и PA28 β протеасом в разведении 1 : 2500, отмывали несколько раз буфером TNT и инкубировали в течение 1 ч в буфере TNT с 5%-м обезжиренным молоком и антителами к IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой, в разведении 1 : 10000. После отмывки мембрану подвергали стандартной обработке системой хемилюминесцентной детекции белков (Amersham, США). Плотность полос была определена с помощью стандартной компьютерной программы «Image J». Результаты были стандартизированы по содержанию актина в пробе и выражали в процентах от содержания субъединиц протеасом в неизменной ткани, которое принимали за 100 %.

Статистическая обработка. Результаты представлены как медиана (Me) с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля, Q_1 – Q_3). Значимость различий между группами исследовали с помощью критерия Манна–Уитни, а также с помощью многомерного непараметрического дисперсионного анализа, рангового теста Краскела–Уоллиса и медианного теста. Корреляционный анализ проведен с использованием непараметрического критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что экспрессия NF- κ B зависела от наличия метастазов в регионарные лимфоузлы (табл. 1), причем эта зависимость носила сложный волнообразный характер. Выявлено, что экспрессия субъединицы NF- κ B p50 у больных со стадией $T_{2-3}N_1$ в 2,9 раза выше, чем у пациентов со стадией $T_{2-3}N_0$. Дальнейшее увеличение количества пораженных лимфоузлов сопровождалось снижением экспрессии NF- κ B p50: у больных со стадией $T_{2-3}N_2$ содержание фактора снижалось по сравнению с больными со стадией $T_{2-3}N_1$. Экспрессия активированной формы NF- κ B p65 при поражении лимфатических узлов имела тенденцию к повышению.

Волнообразная динамика изменения содержания ядерного фактора NF- κ B была выявлена и для коэффициента NF- κ B p65/p50. Данный показатель был меньше у больных со стадией $T_{2-3}N_1$, чем у больных без поражения лимфоузлов, и составлял 0,6. В группе пациентов $T_{2-3}N_2$ коэффициент NF- κ B p65/p50 повышался до 2,5. Содержание VEGF и HIF-1 α при прогрессировании заболевания имело тенденцию к увеличению у больных с поражением регионарных лимфоузлов по сравнению с больными со стадией $T_{2-3}N_0$.

В целом полученные данные согласуются с представлениями о том, что экспрессия ядерных и ростовых факторов является важным маркером прогрессирования ПКГШ [19]. Колебание содержания субъединицы p50 NF- κ B, вероятно, имеет существенное значение в механизме лимфогенного распространения опухоли и может быть связано с функционированием протеасом, которые осуществляют активацию фактора [22]. Для подтверждения связи экспрессии транскрипционных факторов NF- κ B p65, p50, HIF-1 α и ростового фактора VEGF с интенсивностью внутриклеточного протеолиза было проведено определение активности протеолитических систем – протеасом и кальпаинов, а также анализ субъединичного состава протеасом.

Поражение регионарных лимфоузлов сопровождается ростом активности протеасом (табл. 2). В ткани ПКГШ наблюдалось увеличение общей активности протеасом у больных со стадией $T_{2-3}N_2$ по сравнению с больными со стадией $T_{2-3}N_1$ в 1,6 раза, что сопровождалось снижением экспрессии LMP2 субъединицы протеасом в 1,4 раза. Экспрессия LMP2 субъединицы протеасом тесно связана с уровнем убиквитинированных белков, а также с дефектами иммунного ответа, что свидетельствует о ее влиянии на активность протеасом и презентацию антигенов.

Таблица 1

Связь экспрессии транскрипционных факторов и сосудистого эндотелиального фактора роста с поражением регионарных лимфоузлов при плоскоклеточном раке головы и шеи, Me (Q_1 – Q_3)

Показатель		Группа больных		
		$T_{2-3}N_0, n = 11$	$T_{2-3}N_1, n = 6$	$T_{2-3}N_2, n = 6$
Экспрессия транскрипционных факторов, усл. ед./мг белка в лунке	NF- κ B p50	6,6 (2,2–17,0)	19,7 (11,8–30,8)*	5,2 (2,8–7,8)**
	NF- κ B p65	9,2 (5,9–14,4)	12,5 (10,7–16,7)	8,7 (7,0–19,4)
	NF- κ B p65/p50	1,6 (0,7–3,3)	0,6 (0,5–0,8)	2,5 (1,7–3,2) **
	HIF-1 α	7,8 (4,6–21,1)	10,9 (10,8–16,7)	9,0 (6,5–14,6)
Экспрессия VEGF, пг/мг белка		71,1 (48,2–87,7)	92,1 (84,5–98,7)	74,5 (65,2–88,8)

Примечание. Здесь и в табл. 2 отличие статистически значимо ($p < 0,05$): * – от величины соответствующего показателя больных группы $T_{2-3}N_0$, ** – от величины соответствующего показателя больных группы $T_{2-3}N_1$.

Таблица 2

Связь активности протеасом, их субъединичного состава и активности кальпаинов с поражением регионарных лимфоузлов при плоскоклеточном раке головы и шеи, Me (Q_1 – Q_3)

Показатель		Группа больных		
		$T_{2-3}N_0, n = 36$	$T_{2-3}N_1, n = 20$	$T_{2-3}N_2, n = 10$
Активность протеасом, $\times 1000$ ME/мг белка	Общая активность	58,1 (43,1–117,1)	43,5 (31,5–68,0)	94,4 (60,0–268,3)**
	26S	20,0 (14,8–38,0)	21,6 (13,3–35,9)	34,0 (11,1–47,8)
	20S	45,9 (35,5–87,0)	35,9 (17,5–62,5)	45,0 (33,3–87,0)
Содержание субъединиц протеасом в опухолевой ткани в % от такового в неизменной ткани	$\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$	83,5 (58,3–91,8)	81,0 (56,3–96,0)	62,3 (10,0–81,7)
	LMP7	138,6 (89,0–211,9)	184,1 (116,6–276,9)	172,8 (84,2–300,0)
	LMP2	143,1 (105,4–167,1)	154,5 (11,3–194,3)	110,1 (81,1–138,5)**
	PA28 β	128,5 (105,4–168,3)	120,1 (104,2–163,9)	116,0 (98,2–180,0)
	rpt6	151,5 (101,0–222,8)	128,6 (95,0–194,4)	157,9 (112,0–305,3)
Активность кальпаинов, $\times 1000$ ME/мг белка		119,0 (66,2–245,2)	142,4 (56,6–345,0)*	204,7 (74,0–335,5)**

тацию ими комплекса гистосовместимости I класса [12]. Активность других внутриклеточных протеиназ – кальпаинов – увеличивалась у больных со стадией $T_{2-3}N_1$ и $T_{2-3}N_2$ соответственно в 1,4 и 1,7 раза по сравнению с величиной показателя у пациентов без поражения регионарных лимфоузлов.

Следует отметить, что изменения активности протеасом и экспрессии транскрипционных факторов и VEGF при поражении регионарных лимфоузлов носили противоположный характер и при максимальной активности протеасом на стадии $T_{2-3}N_2$ отмечено минимальное содержание транскрипционных факторов, что свидетельствует о регуляции их содержания протеасомами. В целом динамика изменения экспрессии субъединиц протеасом в процессе метастазирования была разнонаправленной, при этом изменения содержания субъединицы протеасом LMP2 и транскрипционных факторов носили однонаправленный характер. Была исследована связь лимфогенного метастазирования с экспрессией транскрипционных факторов, VEGF и активностью внутриклеточных протеиназ методом непараметрического дисперсионного анализа. Ранговый тест Краскела–Уоллиса показал зависимость стадии N заболевания от экспрессии NF- κ B p50 ($p = 0,05$) и общей активности протеасом ($p = 0,05$), а медианный тест – от уровня LMP2-субъединицы протеасом ($p = 0,05$), что свидетельствует о вовлеченности этих показателей в развитие регионарных метастазов.

Анализ полученных результатов показал существование связей между общей активностью протеасом и экспрессией субъединицы NF- κ B p65 ($r = 0,6$, $p = 0,001$), а также между активностью 20S-протеасом и содержанием NF- κ B p50 ($r = 0,58$, $p = 0,004$), NF- κ B p65 ($r = 0,45$,

$p < 0,05$). Показана связь между экспрессией фактора HIF-1 α и содержанием VEGF ($r = 0,4$, $p = 0,04$). В работе A.L. Goldberg выявлено влияние транскрипционного фактора NF- κ B на экспрессию HIF-1 α [10]. В нашем исследовании концентрация NF- κ B p50 и NF- κ B p65 в ткани ПКГШ зависела от экспрессии HIF-1 α ($r = 0,65$, $p = 0,0001$ и $r = 0,62$, $p = 0,002$ соответственно). При этом обнаружена связь экспрессии VEGF с содержанием NF- κ B p50 ($r = 0,4$, $p = 0,036$), что, вероятно, опосредуется через изменение уровня ядерного фактора HIF-1.

Активация протеасомной системы, вероятно, имеет преимущественное значение в развитии лимфогенного метастазирования злокачественных опухолей головы и шеи за счет наличия множественных уровней контроля транскрипционных и ростовых факторов. Известно, что ключевым этапом активации NF- κ B являются освобождение его из комплекса с ингибитором I κ B и последующая протеасомная деградация последнего [15, 26]. Несомненную роль в регуляции уровня транскрипционного фактора играет посттрансляционная модификация предшественников ядерного фактора, которая осуществляется в протеасомах [22]. В представленном исследовании связь экспрессии NF- κ B p65 и NF- κ B p50 с активностью протеасом выявлена в случае плоскоклеточного рака области головы и шеи.

Неоангиогенез является важным процессом, определяющим развитие опухоли, его активность тесно связана с экспрессией транскрипционного фактора HIF-1 α , деградация которого происходит в протеасомах. Однако для ПКГШ непосредственной связи между активностью протеасом и экспрессией HIF-1 не обнаружено. Наличие тесных зависимостей между экс-

прессией NF-κB, активируемого протеасомами, и HIF-1α позволяет сделать предположение о возможной регуляции процесса неоплазии транскрипционным фактором NF-κB.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе развития и метастазирования опухолей головы и шеи происходит изменение экспрессии транскрипционного фактора NF-κB p50, что связано с активацией внутриклеточных протеиназ и с изменением субъединичного состава протеасом. Полученные результаты позволили выявить взаимосвязь между активностью протеасом и содержанием транскрипционных факторов в плоскоклеточных карциномах головы, а именно между экспрессией ядерных факторов NF-κB и общей активностью протеасом, а также активностью 20S-пула. В целом изучение данных белков в контексте прогрессирования опухолей головы и шеи может служить основой не только поиска новых маркеров течения заболевания, но и разработки новых подходов молекулярно-направленной терапии опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы (ФЦП) «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (Гос. контракт № П-320).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова Е.Б., Астахова Т.М., Ерохов П.А. и др. Множественность форм протеасомы и некоторые подходы к их разделению // Изв. РАН. Сер. Биол. 2004. (2). 150–156.
2. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. и др. Активность и субъединичный состав в плоскоклеточных карциномах головы и шеи // Бюл. эксперим. биол. мед. 2010. 149. (1). 89–92.
3. Спирина Л.В., Бочкарева Н.В., Кондакова И.В. и др. Регуляция инсулиноподобных факторов роста и NF-κB протеасомной системой при раке эндометрия // Молек. биол. 2012. 46. (3). 452–461.
4. Arlt A., Bauer I., Schafmayer C. et al. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) // Oncogene. 2009. 28. 3983–3996.
5. Baud V., Derudder E. Control of NF-κB activity by proteolysis // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2011. 349. 97–114.
6. Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E. et al. 26S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate // J. Biol. Chem. 1999. 274. 21963–21972.
7. Chen C., Seth A.K., Aplin A.E. Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer // Mol. Cancer Res. 2006. 4. 695–707.
8. Chen Z., Ricker J.L., Malhotra P.S. et al. Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasome, nuclear factor-κB and activator protein-1 related mechanisms // Mol. Cancer Ther. 2008. 7. (7). 1949–1960.
9. Conner J.R., Smirnova I.I., Moseman A.P. et al. IRAK1BP1 inhibits inflammation by promoting nuclear translocation of NF-κB p50 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. 107. (25). 11477–11482.
10. Goldberg A.L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy // Biochem. Soc. Trans. 2007. 35. 12–17.
11. Goll D.E., Thompson V.F., Li H. et al. The calpain system // Physiol. Rev. 2002. 83. 731–801.
12. Hensley S.E., Zanker D., Dolan B.P. et al. Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses // J. Immunol. 2010. 184. (8). 4115–4122.
13. Hoffmann A., Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling // Immunol. Rev. 2006. 210. 171–186.
14. Jiang L.Z., Wang P., Deng B. et al. Overexpression of Forkhead Box M1 transcription factor and nuclear factor-κB in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis // Hum. Pathol. 2011. 42. (8). 1185–1193.
15. Juvekar A., Manna S., Ramaswami S. et al. Bortezomib induces nuclear translocation of IκBα resulting in gene-specific suppression of NF-κB-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL // Mol. Cancer Res. 2011. 9. (2). 183–194.
16. Klatte T., Seligson D.B., Riggs S.B. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma // Clin. Cancer Res. 2007. 13. 7388–7393.
17. Li C., Li R., Grandis J. R. et al. Bortezomib induces apoptosis via Bim and Bik up-regulation and synergizes with cisplatin in the killing of head and neck squamous cell carcinoma cells // Mol. Cancer Ther. 2008. 7. (6). 1647–1655.
18. Li C., Chen S., Yue P. et al. Proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) induces calpain-dependent IκB(α) degradation // J. Biol. Chem. 2010. 285. (21). 16096–16104.
19. Liang X., Yang D., Hu J. et al. Hypoxia inducible factor-1α expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma // Anticancer Res. 2008. 28. 1659–1666.
20. Linder C., Linder S., Munck-Wikland E. et al. Evaluation of tissue and serum VEGF in patients with head and neck carcinoma // Angiogenesis. 1999. 2. 365–372.
21. Lowry O., Rosebrough W., Farr A., Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. 193. 265–275.

22. Moorthy A.K., Savinova O.V., Ho J.Q. et al. The 20S proteasome processes NF- κ B p105 into p50 in a translation-independent manner // EMBO J. 2006. 25. (9). 1945–1956.
23. Reichart J., Welter C., Mitschele T. et al. Different expression patterns of calpain isozymes 1 and 2 (CAPN1 and 2) in squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC) of human skin // J. Pathol. 2003. 199. (4). 509–516.
24. Ridge J.A., Glisson B.S., Lango M.N. et al. Head and neck tumors // Cancer management: 14th edition. <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/head-and-neck/article/10165/1802498>
25. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L. et al. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961 // Br. J. Pharmacol. 2002. 135. (8). 1951–1958.
26. Schmitz M.L., Bacher S., Kracht M. I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations // Trends Biochem. Sci. 2001. 26. 186–190.
27. Spirina L.V., Yunusova N.V., Kolomiets L.A. et al. Association of growth factors, HIF-1 and NF- κ B expression with proteasomes in endometrial cancer // Mol. Biol. Rep. 2012. 39. (9). 8655–8662.
28. Uden P., Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B // J. Biochem. 2008. 412 (3). 477–484.
29. Voutsadakis I.A. Pathogenesis of colorectal carcinoma and therapeutic implications: the role of the ubiquitin-proteasome system and Cox-2 // J. Cell. Mol. Med. 2007. 11(2). 252–337.
30. Yan M., Xu Q., Zhang P. et al. Correlation of NF- κ B signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma // BMC Cancer. 2010. 10. 437.
31. Yue C.X., Ma J., Zhou H.J. The effect of RhoA and proteasome inhibitor MG132 on angiogenesis in tumors // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011. 42. (4). 445–501.

THE ROLE OF INTRACELLULAR PROTEINASES IN REGULATION OF THE HIF-1 α , NF- κ B TRANSCRIPTION FACTORS EXPRESSION AND VEGF AT LYMPHATIC CANCER SPREAD OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF HEAD AND NECK

Evgeni Lkhamatserenovitch CHOINZONOV, Lyudmila Viktorovna SPIRINA, Irina Viktorovna KONDAKOVA, Svetlana Yurevna CHIZHEVSKAYA, Dmitri Aleksandrovich SHISHKIN, Denis Evgenevich KULBAKIN

*FSBI Research Institute for Pharmacology SB RAMS
634050, Tomsk, Kooperativny lane, bd. 5*

Aim of the study was to determine the NF- κ B, HIF-1 α и VEGF expression, their characteristics in lymph node metastasis development of squamous cell carcinoma of head and neck. Material and methods: 66 patients with squamous cell carcinoma of head and neck (T₂₋₃N₀₋₂). Transcription factors and VEGF expression was measured by ELISA kits. Proteasome and calpain activity was determined using specific fluorogenic substrate. Proteasome subunits composition was measured by Western Blot Analysis. Results and discussion. The obtained data revealed the association of lymph node metastasis development with NF- κ B p50 expression and LMP2 proteasome subunits content.

Key words: transcription factors NF- κ B and HIF-1 α , VEGF, proteasome, calpain, squamous cell carcinoma of head and neck.

Choinzonov E.L. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, director,
e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Spirina L.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of laboratory of tumor biology,
e-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru

Kondakova I.V. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of tumor biochemistry,
e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Chizhevskaya S.Yu. – candidate of medical sciences, senior researcher of head and neck cancer department,
e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Shishkin D.A. – candidate of medical sciences, senior researcher of head and neck cancer department,
e-mail: niio@sibmail.com

Kulbakin D.E. – junior researcher of head and neck cancer department, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ГЕСТОЗА БЕРЕМЕННЫХ ПО ДАННЫМ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ РИТМА СЕРДЦА МАТЕРИ

Сергей Александрович КЛЕЩЕНОГОВ

*НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН
654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23*

С целью поиска ранних прогностических критериев позднего гестоза изучены показатели variability ритма сердца у 32 беременных с последующими осложнениями в форме гестоза и 97 здоровых женщин контрольной группы с неосложненной беременностью. Показано, что наиболее значимыми признаками дифференциации между беременными с гестозом и женщинами контрольной группы являются динамические характеристики нелинейной variability ритма сердца (параметр детрентного флуктуационного анализа, DFA) на фоне умственной (счет в уме) и респираторной (углубленное дыхание с произвольной частотой) нагрузочных проб. Изменения DFA были выраженными у беременных с гестозом при исходном дисбалансе вегетативной регуляции: в условиях парасимпатикотонии в сторону повышения (счет в уме: +33,6 %, $p < 0,001$; углубленное дыхание с произвольной частотой: +58,1 %, $p < 0,001$ по сравнению с исходным уровнем показателя), при симпатикотонии, напротив, в сторону снижения (счет в уме: –8,2 %, $p < 0,10$; углубленное дыхание с произвольной частотой: –30,1 %, $p < 0,001$). В контрольной группе беременных подобные эффекты нагрузочных проб отсутствовали. Сделан вывод о том, что нелинейная variability ритма сердца матери при умственной и респираторной нагрузочных пробах является ценным критерием прогнозирования гестоза беременных на доклинической стадии развития данного осложнения.

Ключевые слова: беременность, variability ритма сердца, нагрузочные пробы.

Синдром полиорганной недостаточности – гестоз беременных – остается «болезнью теорий», поскольку причины развития этого тяжелого осложнения окончательно не определены. Высокая частота материнской и перинатальной заболеваемости и смертности при данной патологии обусловлена как недостаточностью точных знаний о патогенезе, так и трудностью осуществления достоверного прогноза до первых клинических проявлений. Вместе с тем справедливо считается, что обнаружение ранних признаков гестоза служит залогом успешной профилактики неблагоприятных исходов [1]. Наиболее значимыми из таких признаков являются системные нарушения сосудистого тонуса и появление в циркуляции антиангиогенных факторов, продуцируемых функционально аномальным сосудистым эндотелием [2]. Новейшие данные свидетельствуют о высокой прогностической ценности комплекса тестов, включающего анамнестические и клинические сведения, обнаружение антиангиогенов, определение артериального давления и коэффициентов кровотока в маточной артерии методом

ультразвуковой доплерометрии. Процент истинно положительных результатов указанного комплекса тестов достигает 90 %, однако признается необходимым дальнейший поиск прогностических критериев, отвечающих требованиям бескровности и минимизации затрат на проведение обследования [3].

Одним из подходов к установлению риска развития гестоза на ранних стадиях беременности может явиться изучение variability ритма сердца (ВРС) матери. Исследования ВРС при гестозах показали перспективность данного метода диагностики [4, 5]. Однако пока имеется мало данных в пользу значимости ВРС для обнаружения ранних признаков гестоза с учетом индивидуальных особенностей кардиодинамики беременных.

Целью данной работы было исследование прогностической ценности различных показателей variability ритма сердца матери в отношении ранних признаков гестоза (преэклампсии). Использовался динамический подход с применением функциональных нагрузочных проб.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Контингент. Исследования проводились с информированного согласия испытуемых, после проведения экспертизы биоэтическим комитетом НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН. Обследовано 129 беременных. Клиническая оценка течения беременности и ее исходов производилась ретроспективно по данным стандартных медицинских документов (истории беременности и родов). Средний возраст женщин составил 25 лет (от 16 до 35). В возрасте менее 17 и более 30 лет обследовано соответственно 3 (2 % от общего числа обследованных) и 24 (18 %) женщины. Дефицит массы тела с индексом Кетле (ИК) менее 18,5 наблюдался у 18 беременных (14 %). Среди них не было женщин с осложненным течением беременности. Избыточная масса тела (ИК 25–30) имела у 13 женщин (10 %), ожирение I степени (ИК 30–35) – у 4 (3 %). У двух женщин зафиксировано ожирение II и III степени (ИК соответственно 35–40 и более 40). Среди обследованных с последующим развитием гестоза ожирение наблюдалось у 5 беременных. Первородящих было 88 (68 %). Средний срок беременности на момент обследования составил 20,1 недели (от 8 до 34). В I триместре (до 13 недели гестации) обследовано 8 (6 %), во II триместре (до 25 нед.) – 107 (83 %) и в III триместре (более 25 нед.) – 14 (11 %) женщин. Все обследуемые были разделены на контрольную (отсутствие гестационной и соматической патологии) и основную (поздний гестоз) группы, включавшие соответственно 97 и 32 беременных.

У женщин основной группы наблюдались отеки в сочетании с протеинурией (3 случая), ОГ-гестоз (отеки с гипертензией) – 3 случая, гипертензия в родах (6), ОГ-гестоз в сочетании с задержкой развития плода (3). В 9 случаях наблюдался сочетанный гестоз, преимущественно гипертензионной формы с ожирением и (или) на фоне гипоталамического синдрома. Досрочное прерывание беременности посредством кесарева сечения ввиду утяжеления гестоза произведено у 6 женщин. В двух случаях после экстренного родоразрешения зарегистрирована антенатальная смерть плода.

Процедура. Все исследования проводились в утренние часы, в положении сидя. Сигнал ЭКГ регистрировался в течение 256 последовательных сокращений сердца. Преобразование сигнала в цифровую форму осуществлялось с использованием отечественного интерфейса «ВНС-ритм» («Нейрософт», г. Иваново). После

этого проводилась обработка сигнала на ПЭВМ по соответствующим программам. Объектом анализа являлась изменчивость во времени интервала от зубца R электрокардиограммы до следующего зубца R (интервал RR). Запись ЭКГ проводили последовательно: 1) в спокойном состоянии (фон), 2) при предъявлении умственного нагрузочного теста (последовательное вычитание в уме из 500 по 7, seven-test), 3) в периоде восстановления после умственной нагрузки, 4) при дыхательной нагрузочной пробе и 5) в периоде восстановления после дыхательной пробы. На 4-м этапе процедуры испытуемым предлагалось углубить дыхание, соблюдая по возможности одинаковые временные промежутки между экскурсиями легких. В результате достигались умеренные, близкие к физиологическим, воздействия симпатической (умственный «стресс») и парасимпатической (углубленное дыхание с произвольной частотой) направленности [6].

Показатели. Изучали спектрально-частотные показатели вариабельности ритма сердца с помощью компьютерного варианта преобразования Фурье. Соблюдали международные стандарты частотных диапазонов указанных компонентов спектра ВРС [7]. Отношение высокочастотного спектрального компонента (HF) к очень низкочастотному компоненту (VLF) использовали как оценку вегетативного (вагосимпатического) баланса [6]. Это обусловлено общепринятым мнением о природе HF как отражающем парасимпатическую активность [7] и представлениями ряда авторов о симпатико-адреналовом происхождении VLF-компонента спектра ВРС [8]. Для стратификации группы беременных по типам нейровегетативной регуляции применяли классификацию спектральных видов ВРС, учитывающую соотношение основных частотных компонентов и общую энергетику колебаний кардиоритма [9, 10]. Нелинейные характеристики ритма сердца оценивались по параметру детрентного флуктуационного анализа (DFA) и показателю аппроксимированной энтропии (ApEn) [11, 12].

Сравнение средних групповых величин показателей осуществляли по критерию *t* Стьюдента, сравнение процентов – по критерию ϕ Р. Фишера [13]. Применяли дисперсионный анализ с вычислением *F*-критерия Р. Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Контрольная (КГ) и основная (ОГ) группы женщин существенно различались по средним показателям догестационной массы тела (ин-

декс Кетле $20,9 \pm 5,5$ и $24,4 \pm 5,2$ кг/м² соответственно, $p < 0,001$), сроку родоразрешения (КГ: $39,1 \pm 0,6$; ОГ: $38,4 \pm 2,1$ недель, $p < 0,01$) и среднединамическому АД (КГ: $80,0 \pm 8,1$; ОГ: $85,1 \pm 10,0$ мм рт. ст., $p < 0,01$). Не было значительных различий между группами по показателям возраста, гестационного срока на момент обследования и проценту первородящих. Также не было существенных различий по средним величинам частоты сердечных сокращений (ЧСС), RR, Var (вариационный размах кардиоинтервала), DFA, ApEn, спектральных компонентов BPC (HF, низкочастотный компонент LF, VLF) и вагосимпатического индекса (отношение HF/VLF). Показатели приведены как среднее арифметическое значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$).

Следовательно, по показателям BPC матери, зарегистрированным в сроках около 20 недели гестации, в статическом положении обследуемых не наблюдалось влияния патологических процессов, приводящих впоследствии к формированию позднего гестоза.

При анализе показателей ЧСС и вариабельности ритма сердца на фоне нагрузочных проб получены следующие результаты (табл. 1). Увеличение ЧСС и, соответственно, снижение средней длительности кардиоинтервала при умственном тесте было отчетливым в контрольной группе ($p < 0,001$) и имело характер тенденции в основной группе беременных ($p \leq 0,10$). По всей вероятности, во втором случае недоста-

точная статистическая достоверность эффекта зависела от небольшого числа обследованных в группе, хотя прирост ЧСС в процентном выражении был аналогичным таковому в контроле ($5,2$ и $5,9$ % соответственно). Ответ ЧСС и RR на дыхательную пробу оказался незначительным в обеих группах беременных.

Увеличение параметра DFA и снижение респираторного компонента BPC (HF) в контрольной группе при умственной нагрузочной пробе ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно), как и возрастание ЧСС, очевидно, зависело от симпатической активации при данном тесте. Снижение вагосимпатического индекса было обусловлено депрессией HF. В то же время наблюдалось значительное уменьшение величины барорецепторного компонента спектра BPC (LF) с уровнем достоверности $p < 0,001$. В основной группе беременных сдвиг показателей при умственной нагрузочной пробе по отношению к их фоновой величине оказался статистически недостоверным.

Дыхательная проба вызывала существенное изменение величин DFA (в сторону снижения), LF и вагосимпатического индекса ВСИ (в сторону возрастания) в контрольной группе. В основной группе беременных близким к достоверному было лишь увеличение вагосимпатического индекса.

Следовательно, наблюдались реципрокные нагрузочные сдвиги ряда показателей BPC, в целом соответствующие представлению о симпатической активации при умственном тесте

Таблица 1

Нагрузочная динамика показателей частоты и вариабельности ритма сердца у женщин с физиологическим течением беременности и при гестозе ($M \pm SD$)

Показатель	Группа беременных					
	Контрольная, $n = 97$			Гестоз, $n = 32$		
	Фон	Ум	Г/в	Фон	Ум	Г/в
ЧСС, уд/мин	$90,1 \pm 10,5$	$95,4 \pm 11,6^{***}$	$91,5 \pm 10,4$	$89,6 \pm 9,8$	$94,3 \pm 10,1^{\nabla}$	$90,5 \pm 9,8$
RR, мс	673 ± 75	$636 \pm 73^{***}$	662 ± 72	679 ± 77	$645 \pm 75^{\nabla}$	669 ± 78
Var, мс	163 ± 65	148 ± 53	170 ± 61	166 ± 78	163 ± 74	189 ± 99
DFA	$0,80 \pm 0,16$	$0,86 \pm 0,19^*$	$0,74 \pm 0,24^*$	$0,81 \pm 0,21$	$0,86 \pm 0,19$	$0,74 \pm 0,22$
ApEn	$2,00 \pm 0,58$	$1,80 \pm 0,53^*$	$2,16 \pm 0,58$	$2,07 \pm 0,69$	$1,80 \pm 0,69$	$2,21 \pm 0,76$
HF	$1,00 \pm 0,54$	$0,78 \pm 0,49^{**}$	$1,11 \pm 0,56$	$0,97 \pm 0,59$	$0,75 \pm 0,56$	$1,14 \pm 0,61$
LF	$1,00 \pm 0,41$	$0,80 \pm 0,35^{***}$	$1,21 \pm 0,57^{**}$	$0,99 \pm 0,42$	$0,88 \pm 0,44$	$1,20 \pm 0,63$
VLF	$1,53 \pm 0,42$	$1,46 \pm 0,41$	$1,51 \pm 0,36$	$1,53 \pm 0,42$	$1,42 \pm 0,43$	$1,48 \pm 0,39$
ВСИ	$0,72 \pm 0,24$	$0,61 \pm 0,25^{**}$	$0,80 \pm 0,31^*$	$0,69 \pm 0,27$	$0,59 \pm 0,26$	$0,84 \pm 0,34^{\nabla}$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 Фон – исходное состояние покоя; Ум – умственная нагрузочная проба (счет в уме); Г/в – гипервентиляция; Var – вариационный размах кардиоинтервала (разница между максимальным и минимальными значениями RR в вариационном ряду); показатели BPC даны в десятичных логарифмах спектральной плотности мощности (мс²/Гц); уровень достоверности отличий от фоновой величины показателя (критерий t Стьюдента): ∇ – $p \leq 0,10$, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

и повышении парасимпатической активности при дыхательной пробе. Учитывая однотипный характер указанных сдвигов в контрольной и основной группах, можно предполагать неспецифический их характер по отношению к фактору патологии беременности в форме позднего гестоза. Другими словами, при анализе средних величин как в статических, так и в динамических (на фоне умственного и дыхательного тестов) условиях, не было найдено достоверных критериев риска развития позднего гестоза беременных.

Отсутствие значимых критериев риска могло быть обусловлено индивидуальными различиями видов ВРС, формирующих подгруппы беременных в соответствии с типом нейровегетативной регуляции. Для проверки этого предположения был проведен двухфакторный дисперсионный анализ по результирующим признакам вагосимпатического индекса и нелинейной динамики ритма сердца. Выбор последней обусловлен наибольшей чувствительностью нелинейных показателей к фактору гестационной патологии, что было показано нами в предыдущей работе [14]. Анализируемыми факторами влияния были «норма беременности / гестоз» (Н/Г), с одной стороны, и «спектральный вид ВРС» (СпВРС), с другой. Оба фактора изучались по их вкладу в дисперсию ВСИ и нелинейной динамики на фоне умственной и дыхательной нагрузочных проб.

Согласно полученным данным (табл. 2), изменчивость вагосимпатического индекса была существенной при дыхательной нагрузочной пробе, но не при умственном тесте. При этом значимым оказался фактор «спектральный вид ВРС», вклад которого в дисперсию вагосимпатического индекса на фоне гипервентиляции оценивался с уровнем достоверности $p < 0,01$. Но особенно важным для данного исследования явился факт выраженного влияния на дисперсию ВСИ комплексного фактора, представляющего взаимодействие Н/Г и СпВРС ($p < 0,05$). Это означало, что фактор «норма беременности / гестоз» оказывал значительное влияние на

вагосимпатический индекс при дыхательной нагрузке, но не в целом, а лишь при определенных видах нейровегетативной регуляции у беременных.

С целью уточнения этих видов был проведен анализ динамики средних показателей в подгруппах беременных с различными вариантами ВРС. Результаты свидетельствовали о том, что единственным видом ВРС, при котором динамика вагосимпатического индекса на фоне гипервентиляции являлась значимой, был депрессивный вариант I типа (ДИ). Согласно принятой нами классификации [6, 9, 10], данный вид ВРС отражает повышенную симпатическую активность. Прирост ВСИ при дыхательной нагрузке у беременных с повышенной симпатической активностью в исходном состоянии и с последующей патологией в форме гестоза составил в среднем +48 % ($p < 0,01$). В контрольной группе женщин с тем же видом ВРС и в тех же условиях тестирования сдвиг ВСИ оказался незначительным. Следовательно, дифференциальным критерием между нормой беременности и скрытыми процессами, приводящими к гестозу, является характерная динамика в ответ на умеренную гипервентиляцию в виде значительного прироста вагосимпатического индекса при условии исходно повышенного симпатического тонуса.

Следует отметить, что динамика ВСИ в виде увеличения показателя при гипервентиляции является обычной у беременных и особенно выражена в ранних сроках гестации при исходно депрессивных видах спектра ВРС [6]. Отличительной чертой основной группы женщин, по данным настоящего исследования, был чрезвычайно резкий прирост ВСИ, так как почти 1,5-кратный его сдвиг для среднegrupповой величины является необычно высоким.

Дисперсионный анализ нелинейной variability кардиоритма по показателю АрЕп не дал значимых результатов. Такой же анализ по параметру DFA (табл. 3) выявил достоверные признаки влияния на указанный параметр комплексного фактора (взаимодействие Н/Г и

Таблица 2

Дисперсионный анализ влияния нагрузочных проб на вагосимпатическое соотношение у беременных контрольной и основной групп

Источник варьирования (фактор)	Критерий F Фишера		Уровень достоверности	
	Ум	Г/в	Ум	Г/в
Норма беременности / гестоз	0,0	2,7	$> 0,05$	$> 0,05$
Спектральный вид ВРС	1,2	5,5	$> 0,05$	0,01
Взаимодействие факторов	0,7	3,1	$> 0,05$	0,05

Таблица 3

Дисперсионный анализ влияния нагрузочных проб на параметр DFA у беременных контрольной и основной групп

Источник варьирования (фактор)	Критерий F Фишера		Уровень достоверности	
	Ум	Г/в	Ум	Г/в
Норма беременности / гестоз	0,6	0,0	> 0,05	> 0,05
Спектральный вид ВРС	0,6	2,5	> 0,05	0,05
Взаимодействие факторов	4,8	9,9	0,01	0,01

СПВРС) при обеих использованных нагрузочных пробах ($p < 0,01$). В свою очередь эти результаты зависели от существенной динамики DFA при двух видах ВРС: 1) ваготоническом и 2) депрессивном I типа. При ваготонической регуляции в основной группе беременных наблюдалось выраженное повышение DFA по сравнению с исходной величиной показателя как на фоне умственной пробы (+33,6 %, $p < 0,001$), так и при гипервентиляции (+58,1 %, $p < 0,001$). Противоположная направленность сдвигов DFA у женщин основной группы наблюдалась при симпатикотонической регуляции (депрессивный вариант ВРС I типа) – в виде выраженного снижения показателя на фоне гипервентиляции (–30,1 %, $p < 0,001$) и менее отчетливого снижения при умственном тесте (–8,2 %, $p < 0,10$).

Обращает на себя внимание однонаправленная изменчивость DFA в основной группе беременных при различных внешних воздействиях, моделирующих симпатическую (ментальный «стресс») и парасимпатическую (дыхательная проба) активацию. В контрольной группе беременных изменения DFA в тех же условиях были незначительными.

Следовательно, дифференциальным критерием нормы беременности и гестоза по параметру нелинейной вариабельности ритма сердца (DFA) служила динамика данного показателя при умственном «стрессе» и гипервентиляции.

При этом фактором риска являлся вегетативный дисбаланс, проявляющийся в виде признаков как парасимпатикотонического, так и симпатикотонического характера в исходном состоянии обследуемых.

На диаграмме (см. рисунок) представлено процентное распределение различных спектральных видов ВРС в контрольной и основной группах беременных. Видно, что у женщин с последующими осложнениями беременности в форме позднего гестоза (панель справа) значительно преобладал процент депрессивного вида ВРС I типа (ДI) и вариант с повышенной барорефлекторной активностью (Бар) по сравнению с контрольной группой (КГ: 17,5 и 9,3 %; ОГ: 34,4 и 25 %; $p < 0,03$ и $p < 0,02$ соответственно). В этой же группе были снижены процентные доли оптимального (Опт) и ваготонического (Ваг) видов ВРС (КГ: 24,7 и 30 %; ОГ: 9,4 и 15,6 %; $p < 0,02$ и $p < 0,05$ соответственно). Отсюда «группа риска» с отмеченными выше характеристиками динамики DFA при нагрузочных пробах и исходно тестируемым вегетативным дисбалансом (ДI + Ваг) составляла 50 % обследованных основной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным результатом данной работы мы считаем установление прогностически значи-

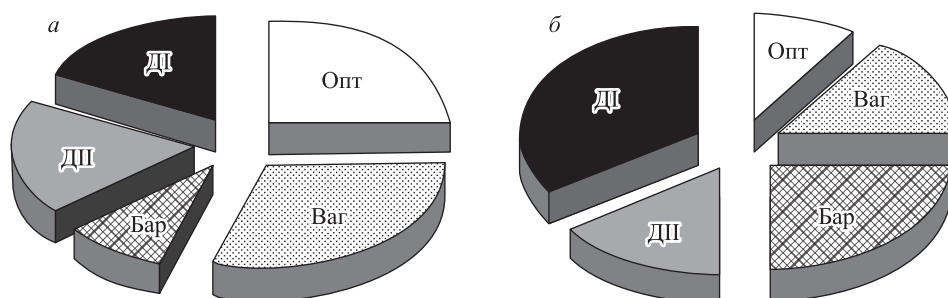


Рис. Процентное распределение различных спектральных видов вариабельности ритма сердца у беременных контрольной (а) и основной (б) групп: Опт – оптимальный; Ваг – ваготонический; Бар – бароактивный; ДII – депрессивный II типа; ДI – депрессивный I типа

мых критериев скрытых патологических процессов, приводящих в последующем, в более поздних сроках, к формированию гестоза. Показано, что наиболее ценным признаком такого рода являются изменения величины параметра детрентного флуктуационного анализа кардиоритма матери при предъявлении функциональных нагрузочных проб: умственной (счет в уме) и дыхательной (гипервентиляция умеренной интенсивности). При этом наблюдается типичная только для женщин с патологическим течением беременности динамика DFA, различающаяся по направленности в зависимости от исходного типа вегетативного дисбаланса в организме женщины. Найдено, что в группу риска по означенному признаку входили беременные с фоновым изменением вагосимпатического индекса по типу как парасимпатикотонии, так и симпатикотонии. В целом таких случаев оказалось 50 % от общего количества женщин основной группы.

Является перспективным в прикладном аспекте представление об индивидуально, возможно генетически, преформированных особенностях нейровегетативной регуляции, определяющих повышенный риск развития гестоза. Наиболее ценно то, что найденные в данном исследовании физиологические критерии риска определяются относительно простым бескровным методом с высокой информативностью и воспроизводимостью результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aquilina J., Thompson O., Thilaganathan B., Harrington K. Improved early prediction of preeclampsia by combining second-trimester maternal serum inhibin-A and uterine artery Doppler // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2001. 17. 477–484.
2. Levine R., Lam S., Qian C. et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia // *N. Engl. J. Med.* 2006. 355. 992–1005.
3. Scazzocchio E., Figueras F. Contemporary prediction of preeclampsia // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* // 2011. 23. 65–71.
4. Eneroth-Grimfors E., Storck N. Preeclampsia and maternal heart rate variability // *Gynecol. Obstet. Invest.* 1998. 45. 170–173.
5. Walther T., Wessel N., Malberg H., Voss A. et al. A combined technique for predicting pre-eclampsia: concurrent measurement of uterine perfusion and analysis of heart rate and blood pressure variability // *J. Hypertens.* 2006. 24. 747–750.
6. Клещеногов С.А., Флейшман А.Н. Спектральный компьютерный анализ кардиоритма беременных: оценка течения и прогнозирование осложнений беременности: Метод. пособие для практик. врачей. Новокузнецк, 2003.
7. Camm A., Malik M., Bigger J. et al. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use / Task Force of European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology // *Circulation.* 1996. 93. 1043–1065.
8. Хаспекова Н.Б. Диагностическая информативность мониторингирования variability ритма сердца // *Вестн. аритмол.* 2003. (32). 15–23.
9. Флейшман А.Н. Медленные колебания гемодинамики. Теория, практическое применение в клинической медицине и профилактике. Новосибирск: Наука, 1999.
10. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В. и др. Анализ variability сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем (методические рекомендации) // *Вестн. аритмол.* 2001. (24). 65–87.
11. Peng C., Havlin S., Stanley A. et al. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series // *Chaos.* 1995. 5. 82–87.
12. Pincus S. Approximate entropy as a measure of system complexity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. 88. 2297–2301.
13. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1978.
14. Клещеногов С.А., Каньковска О.И. Нелинейная variability ритма сердца матери в прогнозировании патологических исходов беременности // *Вестн. РАМН.* 2009. (7). 3–8.

PROGNOSTIC CRITERIA FOR PREECLAMPSIA ON THE DATA OF MATERNAL CARDIAC RHYTHM VARIABILITY

Sergei Aleksandrovich KLESHCHENOGOV

*Research Institute for Integrated Problems of Hygiene and Occupational Diseases SB RAMS
654041, Novokuznetsk, Kutuzov str., 23*

In order to search for early prognostic criteria of preeclampsia (P) the measures of cardiac rhythm variability (CRV) were explored in 32 pregnant with afterwards P manifestation and 97 healthy women (H) with uncomplicated pregnancy at terms near 20 weeks of gestation. Dynamic characteristics of non-linear CRV (parameter of Detrended Fluctuation Analysis, DFA) were shown to be the most valuable signs for differentiation between P and H against mental (calculation in mind, Cal) and respiratory (deep breathing with a voluntary periodicity, Rsp) loading tests. Prominent DFA changes were found in P with initial autonomic disbalance: increase against parasympathetic prevalence (Cal: +33.6 %, $p < 0.001$; Rsp: +58.1 %, $p < 0.001$ in comparison with rest level) and decrease upon sympathetic predominance (Cal: –30.1 %, $p < 0.001$; Rsp: –8.2 %, $p < 0.10$). There were no such effects in H group. It has been concluded that changes of non-linear CRV under condition of mental and respiratory loading tests are the relevant criteria for prediction of preeclampsia at pre-clinical stage of its development.

Key words: pregnancy, heart rate variability, loading tests.

*Kleshchenogov S.A. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of physiology,
e-mail: serg_kle29@mail.ru*

ПОКАЗАТЕЛИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЮНОШЕЙ-ЯКУТОВ

**Галина Касьяновна СТЕПАНОВА, Татьяна Николаевна КИРИЛЛИНА,
Мария Васильевна УСТИНОВА**

*ФГАОУ ВПО Медицинский институт Северо-Восточного федерального университета
имени М.К. Аммосова
677016, г. Якутск, ул. Ойунского, 27*

Цель исследования – проведение спирографических исследований у юношей-якутов, представителей урбанизированного этноса, для установления региональной возрастной нормы основных параметров внешнего дыхания. Методы: компьютерная спирография. Результаты: фактические значения объемно-временных показателей внешнего дыхания у юношей-якутов соответствовали нижней границе возрастной нормы, рассчитанной для жителей средних широт. Полученные величины параметров внешнего дыхания адекватны уровню физическо-го развития современных урбанизированных этносов и могут служить региональной возрастной нормой.

Ключевые слова: показатели спирометрии, урбанизация, якуты.

Система дыхания как одна из немногочисленных, обращенных во внешнюю среду, подвержена существенному влиянию неблагоприятных природно-климатических факторов Севера. В связи с усилением энерготрат организма в экстремальных условиях Севера этой системе отводится особая роль по обеспечению повышенных потребностей в кислороде.

Характер и уровень заболеваемости северян свидетельствуют о неблагоприятной ситуации в отношении поражения органов дыхания. Заболевания органов дыхания в Республике Саха (Якутия) составляют более 40 % всей обращаемости, что примерно в 2 раза выше средних данных по РФ. Особенно высока заболеваемость в районах жесткого арктического климата [4]. В регионах Крайнего Севера отмечается более тяжелое течение патологии органов дыхания как у коренного, так и у приезжего населения [2, 6]. Учитывая уязвимость системы внешнего дыхания к воздействию природно-климатических факторов и высокую частоту хронических неспецифических заболеваний легких в Якутии, крайне важно определение диапазона физиологических параметров этой системы у практически здоровых лиц, проживающих в экстремальных условиях среды. Таким образом, проблема изучения особенностей состояния кислородтранспортных

функций у северян – одна из актуальных проблем адаптации человека.

Целью работы явилось проведение спирографических исследований у юношей-якутов, представителей урбанизированного этноса, для установления региональной возрастной нормы основных параметров внешнего дыхания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были 113 практически здоровых юношей-якутов (студенты медицинского института Северо-Восточного федерального университета) в возрасте от 18 лет до 21 года, занимающихся физической культурой по программе вуза. Спирометрические исследования выполнены в условиях лаборатории в утренние часы при информированном согласии студентов. Исследование функции внешнего дыхания проводилось на спирографе компьютерной диагностической системы «Валента» (Санкт-Петербург, ПО «Нео») в положении сидя. В программном обеспечении заложено приведение объемных и скоростных показателей к системе BTPS и сравнение с должными величинами [15]. Исследования проводили весной (апрель 2009 г.) на 45 юношах и зимой (февраль и декабрь 2010 г.) на 68 юношах. Оценивались

*Степанова Г.К. – д.м.н., проф. кафедры нормальной и патологической физиологии,
e-mail: g_k_step@mail.ru*

*Кириллина Т.Н. – к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии
Устинова М.В. – к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии*

следующие показатели: ЖЕЛ – жизненная емкость вдоха, л; $T_{\text{фжел}}$ – время форсированного выдоха, с; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких, л; ОФВ_1 – объем форсированного выдоха за первую секунду, л; $T_{\text{пос}}$ – время достижения пиковой объемной скорости, с; ПОС – пиковая объемная скорость выдоха, л/с; МОС_{25} – мгновенная объемная скорость на уровне 25 % ФЖЕЛ, л/с; МОС_{50} – то же на уровне 50 % ФЖЕЛ, л/с; МОС_{75} – то же на уровне 75 % ФЖЕЛ, л/с, $\text{ОФВ}_1/\text{ЖЕЛ}$, % – индекс Тиффно. Выполнение маневров для определения ЖЕЛ и ФЖЕЛ проводилось последовательно. В процессе одного исследования использовалось три повторных измерения.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$ [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что рост обследованных студентов составляет $173,2 \pm 0,56$ см, масса тела $64,2 \pm 0,95$ кг, что согласуется с данными других авторов [3, 10], установившими достоверно меньшие значения указанных антропометрических показателей у юношей-якутов по сравнению с юношами-европеоидами, проживающими в Якутии.

Исследование ЖЕЛ выявило, что ее фактическая величина ниже должного значения на 17,1 % (см. таблицу). Ранее также обнаружены достоверно меньшие значения ЖЕЛ у юношей-якутов ($3,57 \pm 0,04$ л), чем у юношей-европеоидов, постоянно проживающих в Якутии ($4,01 \pm 0,12$ л) [10]. На низкие значения ЖЕЛ относительно должных величин у якутов указывают и другие авторы [5, 9]. Существенное уменьшение ЖЕЛ (до 64 % к должному значению) выявлено у девушек-ханты – студенток Ямала [7]. Снижение ЖЕЛ у современных юношей-якутов, возможно, связано с внелегочными рестриктивными изменениями, обусловленными ограниченной подвижностью грудной клетки из-за относительно слабого развития вспомогательных дыхательных мышц. Известно, что у юношей-якутов (студенты Северо-Восточного федерального университета) достоверно ниже показатели мышечной массы компонентного состава тела, значимо меньшие значения абсолютных показателей кистевой и становой силы

Таблица

Объемно-временные показатели внешнего дыхания у юношей-якутов

Показатель	Величина	
	Фактическая	В % к должной
ЖЕЛ, л	$3,94 \pm 0,07$	$82,9 \pm 1,31$
$T_{\text{фжел}}$, с	$1,53 \pm 0,06$	–
ФЖЕЛ, л	$3,57 \pm 0,05$	$77,5 \pm 1,02$
ОФВ_1 , л	$3,21 \pm 0,04$	$79,1 \pm 0,89$
$T_{\text{пос}}$, с	$0,3 \pm 0,02$	–
ПОС, л/с	$7,11 \pm 0,12$	$80,7 \pm 1,28$
МОС_{25} , л/с	$6,50 \pm 0,12$	$82,6 \pm 1,47$
МОС_{50} , л/с	$4,99 \pm 0,10$	$91,2 \pm 1,83$
МОС_{75} , л/с	$3,07 \pm 0,08$	$113,9 \pm 2,90$
Индекс Тиффно, %	$82,8 \pm 1,03$	$97,1 \pm 1,20$

относительно юношей-европеоидов, живущих в Якутии [3, 10].

Исследовались показатели проходимости воздухоносных путей: ФЖЕЛ, ОФВ_1 , ИТ, ПОС, МОС_{25} , МОС_{50} , МОС_{75} . Границей нормальных значений этих показателей считается 80 % от должной величины (д.в.) [13].

Фактическая величина ФЖЕЛ оказалась ниже должного значения на 22,5 % (см. таблицу). Объем форсированного выдоха, показывающий тот объем, который испытуемый способен выдохнуть за первую секунду при максимально быстром и глубоком выдохе после предварительного максимального вдоха (ОФВ_1), тоже был меньше на 20,9 % от должной величины. Наибольшая скорость воздушного потока после выдоха первых 20 % ФЖЕЛ (ПОС) была снижена на 19,3 % от должного значения. Еще большее уменьшение ПОС – на 30 % от должных величин – отмечено у девушек-ханты [7]. В ходе изучения проходимости крупных бронхов (МОС_{25}) выявлено снижение показателя на 17,4 %. Также отмечено некоторое уменьшение (на 8,8 %) проходимости средних бронхов (МОС_{50}). В развитии этих функциональных изменений, наряду с холодом, играет роль такой фактор природной среды Крайнего Севера, как низкое абсолютное содержание водяных паров в атмосфере [14]. Среднегодовое абсолютное содержание влаги в атмосферном воздухе приполярных областей ниже, чем в воздухе пустынь, так как при сильном морозе вода вымерзает. Прямое действие охлажденного и сухого воздуха на верхние дыхательные пути и бронхиальное дерево вызывает снижение температуры слизистых оболочек воздухоносных путей, рефлекторное сокращение гладких мышц

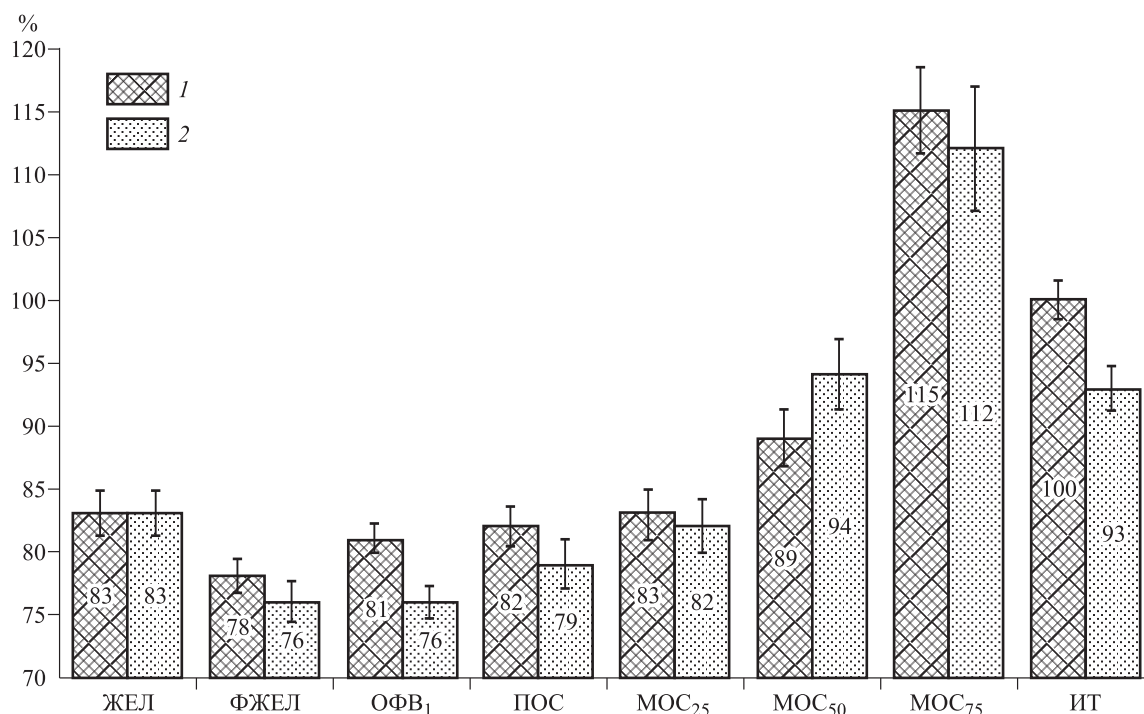


Рис. Объемно-временные показатели внешнего дыхания (в % к должным) у юношей-якутов в зимний (декабрь; 1) и весенний (апрель; 2) сезоны

бронхов и сужение их просвета [8]. Показатель проходимости мелких бронхов (МОС₇₅) оказался выше должных величин на 13,9 %. В исследованиях О.П. Бартош и А.Я. Соколова [1] отмечено увеличение проходимости мелких бронхов у восемнадцатилетних юношей, постоянно проживающих в Магадане, на 70,1 % относительно должных величин. А.Г. Марачевым [6] установлен повышенный синтез сурфактанта в бронхиолах и альвеолах аборигенов Севера. Сурфактант, стабилизируя просвет бронхиол и альвеол при максимальном выдохе, препятствует сужению просвета мелких бронхов, что и обеспечивает высокую скорость воздушного потока в них.

В наших исследованиях фактическое значение индекса Тиффно, характеризующего проходимость бронхов, составляет 82,8 %, что не значительно ниже должной величины (97,1 %). Е.П. Васильев [2] указывает на нормальную величину индекса Тиффно у практически здоровых жителей Республики Саха (Якутия) различной этнической принадлежности (якуты, русские), находящихся в состоянии покоя. Однако после физической нагрузки на велоэргометре показатели теста Тиффно восстановились лишь через 15 минут, что, по мнению автора, свидетельствует о признаках умеренно выраженной обструкции бронхиального дерева.

Исследование сезонной динамики ЖЕЛ показало, что резервные возможности внешнего дыхания в зимний и весенний периоды года достоверных различий не имеют (см. рисунок). В то же время показатель, характеризующий проходимость бронхов (ОФВ₁), значимо ($p < 0,05$) выше зимой ($80,9 \pm 1,13$ % от должного), чем весной ($76,4 \pm 1,33$ % от должного). Такую же динамику имеют величины индекса Тиффно, зимой составившего $99,7 \pm 1,56$ % от должного, весной – $93,2 \pm 1,67$ % ($p < 0,01$).

Следует учесть, что должные значения параметров функции внешнего дыхания, по отношению к которым проведены сравнения полученных нами данных, были разработаны для популяции жителей Центрально-Европейской части. Выявленные нами сниженные, относительно должных, фактические значения параметров функции внешнего дыхания еще не свидетельствуют о недостаточности резервных возможностей данной системы, а, возможно, являются «вариантом нормы» у современных юношей-якутов – представителей популяции урбанизированного этноса. Обследуемые юноши занимаются преимущественно умственным трудом, что в сочетании с низким уровнем двигательной активности приводит к уменьшению мышечной массы и силы мышц грудной клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растущая урбанизация отражается на адаптивной перестройке аппарата внешнего дыхания юношей-якутов. Благоустроенность жизни, европейский тип питания, низкий двигательный режим уменьшают уровень физического развития студентов-якутов [10, 12]. В этих условиях полученные нами значения объемно-временных показателей внешнего дыхания, соответствующие нижней границе среднеширотной нормы, могут служить регионарной адаптивной нормой для современных юношей-якутов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бартош О.П., Соколов А.Я. Региональные особенности внешнего дыхания в экологических условиях Северо-Востока России // Физиология человека. 2006. (3). 70–78.
2. Васильев Е.П. Хронический бронхит в условиях Якутии: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Якутск, 1995.
3. Дегтярева Т.Г., Соколова Н.П. Морфофункциональные показатели физического развития студентов Якутии // X Междунар. симп. «Эколого-физиологические проблемы адаптации». М., 2001. 157.
4. Макаров В.М. Эпидемиология хронических обструктивных болезней органов дыхания в условиях Республики Саха. Томск, 1995. 111 с.
5. Малышева Л.А. Патологические аспекты функциональных нарушений кардиореспираторной системы у жителей Республики Саха (Якутия): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Якутск, 2004.
6. Марачев А.Г. Морфофункциональные основы адаптации и патологии легких, сердца и красной крови человека в условиях Крайнего Севера: автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1980.
7. Матюшина Н.А., Соловьев В.С. Состояние системы дыхания у девушек-новопереселенцев и коренных жительниц Ямальского региона в различные сезоны года // Вестн. Тюменского гос. ун-та. 2011. (6). 123–126.
8. Милованов А.П. Адаптация малого круга кровообращения человека в условиях Севера. Новосибирск, 1981. 172 с.
9. Миронова Г.Е., Васильев Е.П., Величковский Б.Г. Хронический обструктивный бронхит в условиях Крайнего Севера. Красноярск, 2003. 169 с.
10. Пермякова С.П. Закономерности морфофункционального развития юношей коренного населения Республики Саха (Якутия): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2002.
11. Петри А., Сэбин К. Наглядная статистика в медицине. М., 2003. 143 с.
12. Степанова Г.К. Физическая работоспособность и ее связь с морфофункциональными характеристиками у различных этносов Якутии // Физиол. человека. 2005. (3). 124–130.
13. Турина О.И., Лаптева И.М., Калечиц О.М. и др. Организация работы по исследованию функционального состояния легких методами спирографии и пневмотахометрии и применение этих методов в клинической практике (Методические указания). Минск, 2002. 78 с.
14. Устюшин Б.В. Физиолого-гигиенические аспекты труда человека на открытых территориях Крайнего Севера: автореф. дис.... докт. мед. наук. М., 1991.
15. Knudson R.J., Burrows B., Lebowitz M.D. The maximal expiratory flow volume curve: Its use in the detection of ventilatory abnormalities in a population study // Am. Rev. Respir. Dis. 1976. 114. (3). 871–879.

INDICATORS OF EXTERNAL RESPIRATION AT APPARENTLY HEALTHY YOUNG MALE YAKUTS

Galina Kasyanovna STEPANOVA, Tatyana Nikolayevna KIRILLINA, Mariya Vasilyevna USTINOVA

*Medical Institute of Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education
«North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov»
6770016, Yakutsk, Oyunsky str., 27*

The purpose of research – conducting spirographic research in boys, Yakuts – representatives of urbanized ethnic group to determine the regional age-specific norm of basic parameters of external respiration. Methods: computer spirometry. Results: the actual values of volume-time parameters of external respiration in young men – Yakuts correspond to the lower boundary of the age norms, designed for residents of middle latitudes. The obtained values of the parameters of external respiration are appropriate to the level of physical development of the modern urbanized ethnic groups and can serve as a regional age norm.

Keywords: spirometry, urbanization, the Yakuts.

*Stepanova G.K. – doctor of medical sciences, professor of the chair for normal and pathological physiology,
e-mail: g_k_step@mail.ru*

Kirillina T.N. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair for normal and pathological physiology

Ustinova M.B. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair for normal and pathological physiology

РОЛЬ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кирилл Александрович СИМОНОВ¹, Жанна Александровна СТАРЦЕВА¹,
Елена Михайловна СЛОНИМСКАЯ^{1,2}

¹ ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

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

Обзор посвящен вопросам применения лучевой терапии у больных раком молочной железы после выполнения радикальной мастэктомии. Представлена проблема выбора объема адъювантной лучевой терапии с учетом клинико-морфологических факторов прогноза.

Ключевые слова: рак молочной железы, радикальная мастэктомия, локорегионарный рецидив, адъювантная лучевая терапия.

Общеизвестно, что в лечении больных раком молочной железы (РМЖ) применяется комплексный подход, неотъемлемым компонентом которого является лучевая терапия. Целесообразность назначения адъювантной лучевой терапии (АЛТ) и ее эффективность после выполнения радикальной мастэктомии изучались многими специалистами на протяжении нескольких десятилетий [27, 28, 32–34, 39, 44]. Так, в конце 90-х годов были опубликованы результаты крупных рандомизированных исследований, проведенных в Дании, которые показали, что применение АЛТ приводит к статистически значимому снижению частоты локорегионарных рецидивов с 32 до 9 % как в группе пациенток, получавших системную химиотерапию [33], так и у постменопаузальных больных (с 35 до 8 %, $p < 0,001$), которым проводилась гормонотерапия [34]. При этом наибольшая эффективность послеоперационной лучевой терапии наблюдалась у пациенток с высоким риском рецидивирования – размером опухолевого очага от 5 см и выше и наличием более трех регионарных лимфатических узлов, пораженных метастазами. Аналогичные данные были представлены в рекомендациях американской ассоциации врачей-онкологов (ASCO, 2001). Мета-анализ 78 проспективных рандомизированных

исследований, проведенный группой по изучению раннего рака молочной железы (EBCTG), также подтвердил значительную эффективность послеоперационной лучевой терапии в отношении контроля местных рецидивов и увеличении отдаленной общей выживаемости [16, 17].

На сегодняшний день среди радиационных онкологов существует единая точка зрения, что адъювантную лучевую терапию следует проводить больным РМЖ с исходно большими размерами первичной опухоли ($T_{3,4}$) вне зависимости от поражения лимфоузлов, а также при морфологическом подтверждении вовлеченности в опухолевый процесс трех и более лимфатических узлов. Однако весьма неоднозначным является вопрос о целесообразности назначения адъювантной лучевой терапии больным с меньшими размерами опухоли и наличием от одного до трех «позитивных» в отношении метастазов лимфоузлов. Опрос европейских онкологов показал значительное расхождение взглядов среди специалистов. Так, за проведение облучения у этого контингента пациентов в Италии высказалось 19 %, в Испании и Португалии – до 74 % исследователей [14]. Но все-таки наибольший интерес представляет точка зрения, согласно которой назначать АЛТ этим больным следует с учетом дополнительных прогностических кри-

Симонов К.А. – аспирант отделения радиологии, e-mail: simonov_ka@bk.ru

Старцева Ж.А. – д.м.н., рук. отделения радиологии, e-mail: zhanna.alex@rambler.ru

Слонимская Е.М. – д.м.н., проф., рук. отделения общей онкологии

териев [10, 30, 37, 40]. Основанием для такого вывода явились результаты ранее выполненных исследований, которые показали, что наибольшая эффективность послеоперационной лучевой терапии наблюдалась у больных с высоким риском развития локорегионарного рецидива [30, 32, 39]. Такая позиция нашла отражение в рекомендациях американского сообщества радиологов (ACR, 2009): в случае небольшого размера опухолевого очага (T_{1-2}) и при наличии 1–3 пораженных опухолевыми клетками лимфоузлов целесообразен индивидуальный подход к планированию АЛТ. По мнению большинства как европейских, так и американских экспертов, он должен базироваться на учете прогностически значимых клинических (возраст больных, состояние менструальной функции) и морфологических (размер первичной опухоли, количество метастатических лимфатических узлов, наличие лимфоваскулярной инвазии, прорастание опухоли капсулы лимфоузла, близость границ опухоли во время операции, степень дифференцировки новообразования) факторов, сопряженных с риском развития рецидива РМЖ [10, 21, 23–25, 38, 44, 50].

В качестве одного из важных прогностических параметров рассматривается возраст пациенток. По мнению панели экспертов (Сан Гален, 2009), возраст менее 35 лет является независимым фактором риска в отношении развития местного рецидива опухоли и отдаленного метастазирования безотносительно к другим признакам [8]. Согласно исследованию Р. Anderson с соавт., возраст больных моложе 35 лет, имеющих от одного до трех метастатических лимфоузлов, ассоциируется с повышением риска местного рецидива на 20 % по сравнению с больными старше 35 лет [11]. По данным Ж.А. Жогиной с соавт., наибольшее количество местных рецидивов зарегистрировано у больных РМЖ до 40 лет, при этом пятилетняя безрецидивная выживаемость составила $78,1 \pm 11,1$ %, тогда как у пациенток старше 50 лет – $83,3 \pm 7,6$ % [5]. Немалый интерес представляют данные А. Nixon с соавт., [31], которые, проанализировав результаты лечения 1398 больных РМЖ с T_1 – T_2 , показали, что у женщин моложе 35 лет опухоль часто ассоциируется с такими неблагоприятными факторами прогноза, как III степень злокачественности, инвазия сосудов, отрицательный рецепторный статус опухоли. Эти результаты позволили авторам сделать вывод о том, что в большей степени именно морфологические характеристики опухоли, а не возраст как таковой, определяют прогноз заболевания.

Считается, что возникновение рецидивов РМЖ сопряжено также и с состоянием менструальной функции пациенток. Так, по данным С.В. Вторушина [2, 3], рецидивы чаще наблюдались у больных с сохраненным менструальным циклом, чем у пациенток, находившихся в состоянии менопаузы – в 18 и 11 % случаев соответственно. Аналогичные результаты представлены в работе И.Б. Щепотина с соавт. [9].

Среди факторов, характеризующих биологические особенности опухоли, одним из наиболее значимых параметров, связанных с риском развития рецидива РМЖ, является размер первичного узла. По данным R. Jagsi, диаметр новообразования более 2 см ассоциируется с увеличением частоты местных рецидивов до 11 % за 10-летний период наблюдения, в то время как при опухолевом очаге меньших размеров этот показатель составляет всего 3,1 % за аналогичный промежуток времени [24]. В работе С.В. Вторушина [3] было показано, что у пациенток с рецидивом РМЖ изначальный средний размер новообразования был достоверно выше, чем у больных, у которых не было отмечено признаков местного прогрессирования. Следует отметить, что литературные данные свидетельствуют о том, что наиболее существенное значение в отношении увеличения риска развития местного рецидива опухоли имеет не столько наличие какого-либо одного прогностически неблагоприятного фактора, сколько сочетание нескольких параметров, таких как, например, сохраненная менструальная функция и наличие выраженной лимфоваскулярной опухолевой инвазии [42, 50].

При прогнозировании риска развития локорегионарных рецидивов и определении дальнейшей тактики лечения (в том числе и усиления местного контроля) значимая роль отводится такому фактору, как количество лимфатических узлов, пораженных метастазами. Согласно исследованию А. Recht с соавт. [38], у больных РМЖ с метастатическим поражением 1–3 лимфоузлов частота локорегионарных рецидивов за 10 лет наблюдения составила 12,9 % и более чем в 2 раза чаще наблюдалась у пациенток с наличием четырех и более метастатических лимфоузлов (28,7 % случаев).

Кроме того, немаловажное значение имеет и соотношение числа пораженных метастазами лимфатических узлов к общему количеству исследованных лимфоузлов (nodal ratio): показано, что по мере его увеличения возрастает и частота локорегионарных рецидивов [41, 45, 47].

В качестве прогностически значимых критериев рассматриваются такие морфологические параметры, как лимфоваскулярная инвазия опухоли, заинтересованность в процессе капсулы лимфоузла, а также положительный край резекции [10, 22, 25, 29]. А.К. Garg с соавт. выявили, что наличие даже одного такого признака, как выход опухолевой ткани за пределы капсулы лимфоузла, ассоциировалось с трехкратным повышением частоты локорегионарного рецидива [19]. Согласно данным W.A. Woodward с соавт. [48], применение лучевой терапии у больных с сочетанием вышеуказанных признаков привело к снижению частоты местных рецидивов за 10-летний период наблюдения с 13 до 3 %.

В отношении степени злокачественности опухоли было отмечено, что при высокодифференцированном РМЖ (I степень) рецидивы практически отсутствуют, тогда как при II и III степени злокачественности они выявляются в 5,3 и 10 % случаев соответственно [24]. При этом наличие лимфососудистой инвазии в опухолевой ткани в сочетании с III степенью злокачественности сопряжено со значительным повышением частоты рецидивов [10, 42, 50].

Заслуживающим внимания представляется исследование, проведенное в массачусетском госпитале и включавшее 877 больных. Было показано, что у пациенток с РМЖ даже при отсутствии метастазов в лимфатических узлах (N_0), но с наличием трех или более неблагоприятных факторов прогноза, таких как размер опухолевого очага более 2 см, лимфоваскулярная инвазия, сохраненная менструальная функция и положительный край резекции, частота развития местного рецидива аналогична той, которая наблюдается при наличии метастатически пораженных лимфоузлов [24].

В последнее время активно изучается роль рецепторного статуса в отношении развития местных рецидивов у больных, получавших не только системную терапию, но и АЛТ после радикальной мастэктомии. В исследовании С.В. Вторушина было выявлено, что отрицательный рецепторный статус первичной опухоли (отсутствие рецепторов к эстрогену и к прогестерону) сопряжен со значительно большей частотой не только регионарных метастазов, но и локальных рецидивов [3]. Аналогичные данные были представлены в работах исследователей университета Майами [36]. Авторы показали, что частота местных рецидивов была в 2 раза больше у больных с отрицательным рецепторным статусом. Частота рецидивов у больных с отсутствием рецепторов к прогестерону составила 8,5 %, в то время как у пациенток с

позитивным статусом – 3,4 %. При этом наихудшие результаты были отмечены у больных с трипл-негативным раком, у которых местные рецидивы определялись в 3 раза чаще, чем у пациенток с другими типами РМЖ.

С представленных позиций становится очевидным, что при планировании послеоперационной лучевой терапии, основной целью которой является оптимизация локорегионарного контроля, способствующего улучшению выживаемости, необходимо принимать во внимание основные клинические и морфологические факторы, определяющие возможный исход заболевания. Вместе с тем однозначного подхода к определению значимых как самих отдельных клиничко-морфологических параметров, так и их сочетания на сегодняшний день не существует [10, 15, 23, 40, 50].

Еще один нерешенный вопрос касается объема тканей, подлежащих лучевому воздействию. Согласно рекомендациям Национальной всеобщей онкологической сети (NCCN, 2009), при размере первичной опухоли более 5 см и/или наличии опухолевых клеток после выполнения радикальной мастэктомии по краю кожных лоскутов передняя грудная стенка является областью наивысшего риска в отношении развития местного рецидива РМЖ, поэтому в обязательном порядке должна быть включена в поле облучения. В других случаях вопрос о лучевой терапии передней грудной стенки подлежит обсуждению. В то же время эксперты ACR выступают за проведение АЛТ на эту область всем больным РМЖ, которым планируется послеоперационная лучевая терапия. Рекомендуемая суммарная очаговая доза составляет 50 Гр при стандартном режиме фракционирования [13, 44]. Однако проводятся исследования, направленные на решение вопроса о возможном снижении суммарной дозы в связи с угрозой развития отдаленных кардиальных осложнений. Так, по данным Ю.А. Понкратовой, Е.В. Хмелевского [7], которые сравнивали эффективность нормодозного облучения (50 Гр за 25 фракций на область грудной клетки) и низкодозного варианта фракционирования (40 Гр за 20 фракций) после радикальной мастэктомии, значимых различий 5-летней частоты местно-регионарного прогрессирования получено не было.

Кроме того, обсуждается целесообразность проведения лучевой терапии на зоны регионарного лимфооттока. По мнению большинства европейских радиологов, при адекватно выполненной аксиллярной лимфодиссекции и отсутствии метастатически измененных лимфатических узлов (N_0) нет оснований для облучения подмыш-

печной области (Европейское сообщество специалистов по раку молочной железы EUSOMA, 2010). При поражении четырех и более аксиллярных лимфоузлов (N_2) проведение лучевой терапии на эту зону значительно сокращает риск развития локорегионарных рецидивов [35, 37]. В то же время при наличии 1–3 метастатических лимфатических узлов (N_1) вопрос об облучении подмышечной зоны остается спорным и требует индивидуального подхода [13, 39, 44]. Это же касается и подходов к облучению надподключичной области. Данный вопрос не является окончательно решенным. Очевидно, что наличие в этой зоне лимфатических узлов, пораженных метастазами, существенно зависит от распространенности опухолевого процесса и у некоторых больных может достигать 20–25 % [43]. В случае промежуточного (N_1) и низкого риска рецидивирования (N_0) необходим взвешенный анализ, учитывающий возможный эффект от проводимой АЛТ и риск развития нежелательных явлений лучевой терапии надключичной зоны на уровне верхней доли легкого, сосудисто-нервного пучка у основания шеи [40, 43]. Однако при соответствующей технике, разовой очаговой дозе (РОД) 2 Гр и суммарной очаговой дозе, не превышающей 50 Гр, риск развития побочных эффектов остается низким [20, 37].

Особое внимание уделяется определению показаний к облучению парастернальных лимфоузлов. Согласно статистическим данным, частота вовлечения в опухолевый процесс этой группы лимфатических узлов в значительной степени определяется локализацией первичной опухоли, а также состоянием подмышечных лимфоузлов. Так, у больных с расположением опухоли в наружных квадрантах риск метастатического поражения этой группы лимфатических узлов составляет не более 3–17 %, при локализации же очага во внутренних квадрантах он может увеличиваться до 35 % [46]. В соответствии с рекомендациям EUSOMA (2010), АЛТ следует проводить при локализации опухоли в центральных и внутренних квадрантах молочной железы. Ряд исследований указывает на то, что лучевая терапия области парастернальных лимфоузлов значительно снижает риск локорегиональных рецидивов и увеличивает выживаемость больных РМЖ на 9–16 % [12, 35, 37]. Но согласно другой точке зрения, облучение этой зоны связано с высоким риском постлучевых повреждений, а преимуществ в показателях общей выживаемости у этих пациенток нет. Выраженность же лучевых реакций может быть

выше, чем основной эффект лучевой терапии, так как в зону облучения неизбежно попадают органы средостения, легкие, спинной мозг, которые получают от 25 до 30 % суммарной очаговой дозы [1, 4].

Согласно принятым стандартам Американской коллегии радиологии (ACR, 2009) и специалистов EUSOMA (2010), суммарная очаговая доза АЛТ на зоны регионарного лимфооттока должна составлять не менее 45–50 Гр, подводимой за 25–28 фракций, при РОД 1,8–2,0 Гр. Однако в последние годы прослеживается тенденция к сокращению длительности курса АЛТ за счет выбора альтернативных режимов. Так, А.А. Курносов [6] использовал режим динамического фракционирования – РОД 5 Гр 2 фракции, затем РОД 2 Гр 12–13 фракций (что составило 40–44 изоГр при классическом фракционировании). Автор показал, что данный режим послеоперационной лучевой терапии способствовал увеличению показателей 10-летней общей выживаемости до 73,4 % по сравнению с классическим режимом фракционирования, при котором этот показатель был ниже и составил 59,8 %. Специалисты из Центра лечения раковых заболеваний (MD Anderson Cancer Center, США) используют другой вариант фракционирования – 2,5 Гр за фракцию до суммарной дозы 50 Гр в течение 4 недель [18]. В Великобритании выполняются исследования по оценке влияния величины разовой дозы на эффективность АЛТ и сравниваются группы больных, получающих АЛТ в режиме гипofракционирования (40 Гр за 15 фракций в течение 3 недель) с традиционным (50 Гр за 5 недель) [49]. Окончательных данных еще не получено и исследования по данному направлению продолжаются.

Таким образом, с представленных позиций становится очевидным, что планирование адекватного объема адьювантной лучевой терапии для больных РМЖ, равно как и проведение системных методов лечения, необходимо осуществлять с учетом клинко-морфологических факторов, сопряженных с прогнозом заболевания. При этом важно помнить, что стремясь к максимальному контролю над опухолью, радиационный онколог должен одновременно учитывать и риск возможных осложнений, обуславливающих качество жизни пациенток. Соблюдение именно такого баланса позволит определить не только высокую эффективность лечения, но и обеспечить персонифицированный подход к назначению АЛТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бекузарева Н.В. Современные подходы к диагностике и лечению рака молочной железы Пб стадии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009.
2. Вторушин С.В., Перельмутер В.М., Завьялова М.В. и др. Синхронное и метасинхронное развитие локальных рецидивов и отдаленных метастазов у больных раком молочной железы // Сиб. онкол. журн. 2011. (2). 27–31.
3. Вторушин С.В. Клинико-морфологические особенности мультицентрического роста и рецидивирования при раке молочной железы: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Томск, 2011.
4. Геворкян В.С. Современные возможности внутритканевой лучевой терапии в комбинированном и комплексном лечении рака молочной железы центральной и медиальной локализации: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008.
5. Жогина Ж.А., Слонимская Е.М., Мусабаева Л.И. Влияние клинико-морфологических факторов на течение и прогноз ранних форм рака молочной железы // Сиб. онкол. журн. 2003. 3. (7). 7–10.
6. Курносов А.А. Ускоренные режимы лучевой терапии больных раком молочной железы Пб-III стадии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008.
7. Понкратова Ю.А., Хмелевский Е.В., Добровольская Н.Ю. Целесообразность снижения дозы постмастэктомической лучевой терапии при комплексном лечении местно-распространенного рака молочной железы // Вестн. Рос. науч. центра рентгенодиагностики. 2011. 11. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/poncrat_v11.htm.
8. Семглазов В.Ф., Семглазов В.В., Даиян Г.А. Обоснование международных стандартов лечения операбельных форм рака молочной железы. Пособие для врачей. СПб., 2009. 57 с.
9. Щепотин И.Б., Зотов А.С., Зайчук В.В. Факторы риска развития местных рецидивов инвазивного рака молочной железы // Онкология. 2010. 4. (12). 347–350.
10. Abi-Raad R., Boutrus R., Wang R. Patterns and risk factors of locoregional recurrence in T1-T2 node negative breast cancer patients treated with mastectomy: implications for postmastectomy radiotherapy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. 2011. 81. 151–157.
11. Anderson P., Freedman G., Li T. et al. Post-mastectomy radiation for node-negative breast cancer: Is regional node coverage always needed? // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2008. 72. S194.
12. Buchholz T.A., Katz A., Strom E.A. et al. Pathologic tumor size and lymph node status predict for different rates of locoregional recurrence after mastectomy for breast cancer patients treated with neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2002. 53. (4). 880–888.
13. Carlson R.W., Allred D.C., Anderson B.O. et al. Breast cancer clinical practice guidelines in oncology // J. Natl. Compr. Canc. Netw. 2009. 7. 122–192.
14. Ceilley E., Jagsi R., Goldberg S. et al. Radiotherapy for invasive breast cancer in North America and Europe: results of a survey // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2005. 61. (2). 365–367.
15. Cheng S.H., Horng C.-H., West M. et al. Genomic prediction of locoregional recurrence after mastectomy in breast cancer // J. Clin. Oncol. 2006. 24. 4594–4602.
16. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: An overview of the randomized trials // Lancet. 2000. 355. 1757–1770.
17. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials // Lancet. 2005. 366. 2087–2106.
18. Fletcher G.H., McNeese M.D., Oswald M.J. Long-range results for breast cancer patients treated by radical mastectomy and postoperative radiation without adjuvant chemotherapy: an update // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1989. 17. (1). 11–14.
19. Garg A.K., Strom E.A., McNeese M.D. et al. T3 disease at presentation or pathologic involvement of four or more lymph nodes predict for locoregional recurrence in stage II breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and mastectomy without radiotherapy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004. 59. (1). 138–145.
20. Gebski V., Lagleva M., Keech A. et al. Survival effects of postmastectomy adjuvant radiation therapy using biologically equivalent doses: A clinical perspective // J. Natl. Cancer Inst. 2006. 98. 26–38.
21. Goldhirsch A., Ingle J.N., Gelber R.D. et al. Thresholds for therapies: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer // Ann. Oncol. 2009. 20. 1319–1329.
22. Gruber G., Cole B.F., Castiglione-Gertsch M. et al. Extracapsular tumor spread and the risk of local, axillary and supraclavicular recurrence in node-positive, premenopausal patients with breast cancer // Ann. Oncol. 2008. 19. 1393–1401.
23. Hamamoto Y., Shinohara S., Nakajima N. et al. Impact of aggregate of risk factors for isolated locoregional failure in breast cancer patients treated with mastectomy without radiotherapy // Breast Cancer. 2012. DOI 10.1007/s12282-012-0335-4.

24. Jagsi R., Raad R.A., Goldberg S. et al. Locoregional recurrence rates and prognostic factors for failure in node-negative patients treated with mastectomy: implications for postmastectomy radiation // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2005. 62. 1035–1039.
25. Katz A., Strom E.A., Buchholz T.A. et al. Locoregional recurrence patterns after mastectomy and doxorubicin-based chemotherapy: implications for postoperative irradiation // J. Clin. Oncol. 2000. 18. 2817–2827.
26. Kunkler I., Russell N., Canney P. et al. Survival effects of postmastectomy adjuvant radiation therapy using biologically equivalent doses: a clinical perspective // J. Natl. Cancer Inst. 2006. 98. 1020–1021.
27. Lee J.C., Truong P.T., Kader H.A. et al. Postmastectomy radiotherapy reduces locoregional recurrence in elderly women with high-risk breast cancer // Clin. Oncol. 2005. 17. (8). 623–629.
28. Livi L., Meattini I., Di Cataldo V. et al. Postmastectomy radiotherapy in breast cancer adjuvant treatment // Minerva Chir. 2010. 65. (5). 527–536.
29. Nagao T., Kinoshita T., Tamura N. et al. Locoregional recurrence risk factors in breast cancer patients with positive axillary lymph nodes and the impact of postmastectomy radiotherapy // Int. J. Clin. Oncol. 2011. DOI.10.1007/s10147-011-0343-y.
30. Nielsen H.M., Overgaard M., Grau C. et al. Study of failure pattern among high-risk breast cancer patients with or without postmastectomy radiotherapy in addition to adjuvant systemic therapy: long-term results from the Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82 b and c randomized studies // J. Clin. Oncol. 2006. 24. (15). 2268–2275.
31. Nixon A., Neuberg D., Hayes D. et al. Relationship of patients age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage 1 or 11 breast cancer // J. Clin. Oncol. 1994. 12. 888–894.
32. Olivotto I.A., Truong P.T., Chua B. Postmastectomy radiation therapy: who needs it? // J. Clin. Oncol. 2004. 22. (21). 4237–4239.
33. Overgaard M., Hansen P.S., Overgaard J. et al. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy // N. Engl. J. Med. 1997. 337. 949–955.
34. Overgaard M., Jensen J., Overgaard J. et al. Postoperative radiotherapy in high-risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomized trial // Lancet. 1999. 353. 1641–1648.
35. Overgaard M., Nielsen H.M., Overgaard J. Is the benefit of postmastectomy irradiation limited to patients with four or more positive nodes, as recommended in international consensus reports? A subgroup analysis of the DBCG 82 b&c randomized trials // Radiother. Oncol. 2007. 82. (3). 247–253.
36. Panoff J.E., Takita C., Hurley J. et al. Higher chest wall dose results in improved locoregional outcome in patients receiving postmastectomy radiation // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2012. 82. (3). 1192–1199.
37. Poortmans P. Evidence based radiation oncology: Breast cancer // Radiother. Oncol. 2007. 84. 84–101.
38. Recht A., Gray R., Davidson N.E. et al. Locoregional failure 10 years after mastectomy and adjuvant chemotherapy with or without tamoxifen without irradiation: experience of the Eastern Cooperative Oncology Group // J. Clin. Oncol. 1999. 17. 1689–700.
39. Recht A., Edge S., Solin L. et al. Postmastectomy radiotherapy guidelines of the American Society of Clinical Oncology // J. Clin. Oncol. 2001. 19. 1539–1569.
40. Russell N., Kunkler I., Canney P. et al. Postmastectomy radiotherapy: will the selective use of postmastectomy radiotherapy study end the debate? // J. Clin. Oncol. 2009. 27. 996–1001.
41. Schiffman S.C., McMasters K.M., Scoggins C.R. et al. Lymph node ratio: a proposed refinement of current axillary staging in breast cancer patients. // J. Am. Coll. Surg. 2011. 213. 45–52.
42. Sharma R., Bedrosian I., Lucci A. et al. Present-day locoregional control in patients with T1 or T2 breast cancer with 0 and 1 to 3 positive lymph nodes after mastectomy without radiotherapy // Ann. Surg. Oncol. 2010. 17. 2899–2908.
43. Strom E.A., Woodward W.A., Katz A. et al. Clinical investigation: regional nodal failure patterns in breast cancer patients treated with mastectomy without radiotherapy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2005. 63. 1508–1513.
44. Taylor M.E., Haffty B.G., Rabinovitch R. et al. ACR appropriateness criteria on postmastectomy radiotherapy expert panel on radiation oncology-breast // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2009. 73. (4). 997–1002.
45. Truong P.T., Woodward W.A., Thames H.D. et al. The ratio of positive to excised nodes identifies high-risk subsets and reduces inter-institutional differences in locoregional recurrence risk estimates in breast cancer patients with 1–3 positive nodes: an analysis of prospective data from British Columbia and the M.D. Anderson Cancer Center // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2007. 68. 59–65.
46. Veronesi U., Arnone P., Veronesi P. et al. The value of radiotherapy on metastatic internal mammary nodes in breast cancer. results on a large series // Ann. Oncol. 2008. 19. 1553–1560.

47. Vinh-Hung V., Verkooijen H.M., Fioretta G. *et al.* Lymph node ratio as an alternative to pN staging in node-positive breast cancer // J. Clin. Oncol. 2009. 27. 1062–1068.

48. Woodward W.A., Strom E.A., Tucker S.L. *et al.* Locoregional recurrence after doxorubicin-based chemotherapy and postmastectomy: Implications for breast cancer patients with early-stage disease and predictors for recurrence after postmastectomy radi-

ation // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2003. 57. 336–344.

49. Yarnold J., Ashton A., Bliss J. *et al.* Fractionation sensitivity and dose response of late adverse effects in the breast after radiotherapy for early breast cancer: Long-term results of a randomized trial // Radiother. Oncol. 2005. 75. 9–17.

50. Yildirim E. Locoregional recurrence in breast carcinoma patients // Eur. J. Surg. Oncol. 2009. 35. 258–265.

THE ROLE OF POSTOPERATIVE RADIOTHERAPY IN THE TREATMENT OF BREAST CANCER PATIENTS

Kirill Aleksandrovich SIMONOV¹, Zhanna Aleksandrovna STARTSEVA¹,
Elena Mikhailovna SLONIMSKAYA^{1,2}

¹ Tomsk Cancer Research Institute
634050, Tomsk, Kooperativnyy lane, 5

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

The review covers the radiotherapy application after radical mastectomy in breast cancer patients. The problem of adjuvant radiation therapy choice with consideration for clinical and morphological prognostic factors has been presented.

Key words: breast cancer, radical mastectomy, locoregional recurrence, adjuvant radiation therapy.

Simonov K.A. – postgraduate student of Radiology Department, e-mail: simonov_ka@bk.ru

Startseva Zh. A. – doctor of medical sciences, Head of the Radiology Department, e-mail: zhanna.alex@rambler.ru

Slonimskaya E.M. – professor, doctor of medical sciences, Head of the General Oncology Department

РОЛЬ КРЕСТЦА И НИЖНЕПОЯСНИЧНОГО ОТДЕЛА ПОЗВОНОЧНИКА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО ПОЛОЖЕНИЯ И РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ ПРОКСИМАЛЬНОГО ОТДЕЛА БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Валерий Михайлович ПРОХОРЕНКО, Петр Сергеевич ТУРКОВ, Виктор Юрьевич КУЗИН, Андрей Михайлович ПЕРФИЛЬЕВ

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

Цель исследования – провести сравнительный анализ взаимосвязи поясничного отдела позвоночника, крестца и проксимального отдела бедренной кости на основе предложенного метода. Материал и методы. 30 пациентам и 10 добровольцам выполнены многосрезовая компьютерная томография бедренной кости и рентгенография поясничного отдела позвоночника и крестца в двух проекциях. Осмотрены неврологом и вертебрологом. Выполнено определение угловых взаимоотношений между элементами проксимального отдела бедренной кости. На рентгенограммах определены угол лордоза поясничного отдела позвоночника и положение крестца. Результаты. В контрольной группе добровольцев величины пространственного положения элементов проксимального отдела бедренной кости составили: антефлексия головки бедренной кости $0,0 \pm 0,4^\circ$, антеверсия шейки бедренной кости $75,6 \pm 1,2^\circ$, антеторсия проксимального отдела бедренной кости $101,7 \pm 0,7^\circ$; лордоз в поясничном отделе позвоночника составил $131,0 \pm 0,2^\circ$, перекос таза 1° , а угол наклона крестца $30-40^\circ$. В основной группе у всех пациентов наблюдался перекос таза $4,8 \pm 0,2^\circ$ и спондилоартроз 1-й степени, у двух человек – гиперлордоз поясничного отдела позвоночника $155,5 \pm 0,9^\circ$ и ретроспондилолистез 1-й степени с синдромами фиксированного поясничного лордоза, толчкообразной походкой, пояснично-бедренной разгибательной ригидностью и клиникой люмбаишалгии одно- или двусторонней, нормофлексия $0,0 \pm 0,4^\circ$, ретроверсия $68,0 \pm 1,2^\circ$ и антеторсия $111,0 \pm 1,1^\circ$. У семи пациентов основной группы гиполордоз поясничного отдела позвоночника составил $120,6 \pm 1,2^\circ$ с клиникой сгибательной контрактуры тазобедренного сустава, из них в 10 тазобедренных суставах – антефлексия $10,2 \pm 0,6^\circ$ и в 3 нормофлексия $0,0 \pm 0,4^\circ$. У 8 пациентов выявлена ретроверсия $69,6 \pm 0,7^\circ$, у 5 – антеверсия $81,5 \pm 1,3^\circ$, у 9 – антеторсия $121,5 \pm 1,8^\circ$, у 2 – ретроверсия $94,7 \pm 0,6^\circ$, у 1 – нормоторсии $101,0 \pm 1,7^\circ$. У одного пациента основной группы лордоз в поясничном отделе позвоночника составил 133° , клиники люмбаишалгии и патологии поясничного отдела позвоночника не наблюдалось, нормофлексия $0,0 \pm 0,4^\circ$, нормоверсия $75,2 \pm 0,3^\circ$, антеторсия $120,5 \pm 1,7^\circ$. Заключение. Проведенное исследование показывает, что изменение пространственного положения крестца, поясничного отдела позвоночника и элементов проксимального отдела бедренной кости взаимосвязано. Одним из факторов риска развития дегенеративных изменений в поясничном отделе позвоночника и тазобедренных суставах является горизонтализация или вертикализация крестца.

Ключевые слова: таз, поясничный отдел позвоночника, тазобедренный сустав, диагностика.

Тазобедренный сустав – важнейший сустав для опоры и передвижения человека в пространстве, патология которого влечет за собой ухудшение функционирования всего опорно-двигательного аппарата, и в первую очередь поясничного отдела позвоночника. Работами многих исследователей установлено, что искривление позвоночника во фронтальной плоскости является статическим сколиозом [10]. Из-

вестна причинно-следственная связь между заболеваниями поясничного отдела позвоночника и тазобедренного сустава, характеризующаяся диагностическими данными в зависимости от первичности либо сочетанности патологии. Этиопатогенетическая зависимость между дегенеративно-дистрофическими изменениями в поясничном отделе позвоночника и крупных суставах нижних конечностей отражена в ра-

Прохоренко В.М. – д.м.н. проф., зав. кафедрой травматологии и ортопедии, зам. директора по лечебной работе, e-mail: VProhorenko@niito.ru

Турков П.С. – аспирант, e-mail: sugery@yandex.ru

Кузин В.Ю. – к.м.н., врач отделения травматологии и ортопедии № 2

Перфильев А.М. – врач отделения лучевой диагностики

ботах многих современных авторов. В работах Янсона говорится о наличии перекреста мышечных спиралей на уровне прямой мышцы бедра, что является одним из факторов ортоградной статики и прямохождения человека. Для проксимального отдела бедренной кости характерно отклонение элементов проксимального отдела бедренной кости. Как правило, речь идет о пространственном взаимоотношении головки, шейки и проксимального отдела бедренной кости. Эти соотношения большинством авторов обозначены как анте- и ретрофлексия, анте- и ретроверсия, анте- и ретроторсия. Угол, образованный между осью шейки бедренной кости и осью проксимального отдела бедренной кости, является углом версии шейки бедренной кости. Под термином «версия» А. Меуер (1923) подразумевает поворот шейки бедренной кости без участия в нем диафизарного отдела [6]. Угол, образованный между осью проксимального отдела и надмыщелковой линией бедренной кости, является углом торсии проксимального отдела бедренной кости. В 1931 году Н. Bohm описал «торсию» как поворот всего проксимального отдела бедренной кости к плоскости мыщелков [6].

Оценка биомеханических предпосылок развития дегенеративных процессов в проксимальном отделе бедренной кости и в поясничном отделе позвоночника предполагает анализ равенства момента сил обеих кинематических спиралей. Так, при уменьшении расстояния между большим вертелом и центром ротации головки бедренной кости заметно уменьшается плечо, что приводит к пропорциональному увеличению мышечной силы и суммарной силы, действующих на тазобедренный сустав [12], и это возможно при изменении положения элементов проксимального отдела бедренной кости. В настоящее время часто употребляется термин деклинация, под которым подразумеваются все виды поворотов элементов проксимального отдела бедренной кости во фронтальной плоскости [5, 7, 9]. Однако в литературе встречаются единичные упоминания о положении элементов проксимального отдела бедренной кости в горизонтальной плоскости и взаимоотношениях с поясничным отделом позвоночника, что подчеркивает актуальность данного исследования.

Цель настоящего исследования – анализ взаимосвязи процессов в поясничном отделе позвоночника и проксимального отдела бедренной кости у пациентов с патологией тазобедренного сустава с клиникой поясничного межпозвонкового остеохондроза в различной

степени его проявления и без таковой для определения факторов риска.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведена многосрезовая компьютерная томография (МСКТ) (TOSHIBA Agulion64, Япония) на базе Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии. Обследованы 30 пациентов с дегенеративными изменениями тазобедренных суставов и с болями в поясничном отделе позвоночника и 10 добровольцев с неизмененными тазобедренными суставами и без неврологической патологии. Основную группу составили пациенты в возрасте от 24 до 75 лет с односторонним (20 человек) и двусторонним (10 человек) поражением тазобедренных суставов и с наличием болей в поясничном отделе позвоночника с иррадиацией в правую или левую нижнюю конечность. Рентгенологически изменения поясничного отдела позвоночника проявлялись распространенным остеохондрозом на нижнепоясничном уровне, распространенным спондилезом 1–2 степени на поясничном уровне, спондилоартрозом 2–3 степени, дегенеративным спондилолистезом позвонков поясничного отдела позвоночника до 7 мм 1-й степени, с неоартрозом между остистыми отростками на уровне позвонков L1-S1. Все пациенты осмотрены невропатологом, которым был установлен диагноз поясничного межпозвонкового остеохондроза. Клиническая оценка болей в поясничном отделе позвоночника с одно- или двусторонней люмбаго-иалгией проявлялась фиксированным поясничным лордозом, толчкообразной походкой, пояснично-бедренной разгибательной ригидностью, болью в пояснице с иррадиацией в одну или обе нижние конечности по задней поверхности бедер и голеней. При оценке патологии тазобедренного сустава наблюдался болевой синдром, комбинированная контрактура пораженного сустава и гипотрофия мышечного рельефа. Контрольная группа состояла из 10 здоровых людей с неизмененными тазобедренными суставами и без неврологической симптоматики в возрасте от 18 до 50 лет без рентгенологически значимых изменений. Предварительно проведенный статистический анализ показал, что полученные группы не различались по возрасту ($p > 0,05$), поэтому в дальнейшем распределение материала по возрастным группам не проводилось.

На МСКТ-томограммах в сагиттальной плоскости на уровне позвонков L5-S1 установлен угол наклона крестца (рис. 1, 2), который определяется пересечением касательной, про-

веденной к позвонку S1 и вертикальной оси [11]. На МСКТ-томограммах во фронтальной плоскости на уровне L5-S1 позвонков выполнено определение угла наклона таза (рис. 3) по стандартной методике. Для оценки положения элементов проксимального отдела бедренной кости используются авторская методика по 3 срезам (рис. 4, 5): области центра головки бедренной кости, центра шейки бедренной кости и мыщелков бедренной кости, с дальнейшим наложением полученных данных 3 срезов с использованием базового ориентира. На полученном изображении определяется ось головки бедренной кости, ось шейки бедренной кости, ось проксимального отдела бедренной кости и надмыщелковая линия бедренной кости с измерением углов между полученными осями. Угол, образованный осью головки бедренной кости и осью шейки бедренной кости, является углом флексии головки бедренной кости.

Рентгенография поясничного отдела позвоночника и крестца проводилась по стандартной методике в прямой и боковой проекции в положении стоя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В биомеханике изучаемого нами процесса существенная роль принадлежит системе рычага, которая создается деятельностью подвздошно-поясничной мышцы, где бедренная кость функционирует как спаянный двойной рычаг. Механизм торсионного развития сегментов нижней конечности в норме представляет собой чрезвычайно сложный процесс вследствие правильной биомеханики сустава [4]. В результате смещения вперед опорной стороны таза и смещения назад неопорной его стороны совершается вращение таза вокруг вертикальной оси, проходящей через точку на середине рас-

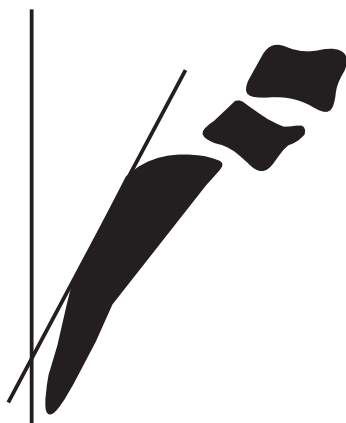


Рис. 1. Схема определения угла наклона крестца



Рис. 2. МСКТ-томограмма в сагиттальной плоскости на уровне позвонков L1-S1, выполнено определение угла наклона крестца

стояния между центрами головок бедренных костей и, с учетом наклона таза и супинационной деформации бедра, совпадающей с общим центром тяжести человека. Также исследование доказывает, что угловые и линейные размеры костей таза и проксимального отдела бедренной кости взаимосвязаны и подчинены закону пропорционального роста. Величины углов проксимального отдела бедренной кости в значительной мере зависят от различных параметров костей таза (ширины, высоты, наклона и т. д.); трансформация его происходит в процессе торсионного развития бедренной кости так, что ростковая пластинка головки всегда оказывается перпендикулярной по отношению к механической оси нагрузки [1, 4]. Полученные нами данные подтверждают мнение исследова-



Рис. 3. МСКТ-томограмма во фронтальной плоскости на уровне позвонков L5-S1 и таза, выполнено определение угла наклона таза по стандартной методике

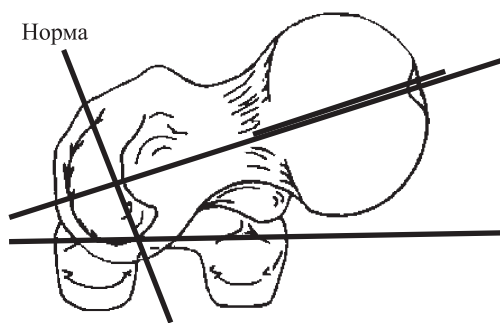


Рис. 4. Схема положения элементов проксимального отдела бедренной кости по авторской методике

телей [2, 8, 13], считающих, что морфогеометрические параметры бедренной кости влияют на риск возникновения переломов в этой области и риск развития дегенеративных изменений тазобедренного сустава.

У всех обследованных (пациентов и добровольцев) определяли пространственное положение проксимального отдела бедренной кости и степень лордоза поясничного отдела позвоночника, а также положение таза и крестца по разработанной нами методике. В контрольной группе добровольцев средние величины пространственного положения элементов проксимального отдела бедренной кости составили: антефлексия $0,0 \pm 0,4^\circ$, антеверсия $75,6 \pm 1,2^\circ$, антеторсия $101,7 \pm 0,7^\circ$; лордоз в поясничном отделе позвоночника составил $131,0 \pm 0,2^\circ$, перекос таза 1° , а угол наклона крестца $30\text{--}40^\circ$. В основной группе у всех пациентов наблюдался перекос таза $4,8 \pm 0,2^\circ$ и спондилоартроз 1-й степени. У двух пациентов основной группы диагностировали гиперлордоз поясничного отдела позвоночника $155,5 \pm 0,9^\circ$ и ретроспондилолистез 1-й степени с синдромами фиксированного поясничного лордоза, толчкообразной походкой, пояснично-бедренной разгибательной ригидностью и клиникой люмбагоишиалгии одно- или двусторонней. У данных пациентов обнаружена нормофлексия $0,0 \pm 0,4^\circ$, ретроверсия $68,0 \pm 1,2^\circ$ и антеторсия $111,0 \pm 1,1^\circ$. У семи пациентов основной группы гиполордоз поясничного отдела позвоночника составил $120,6 \pm 1,2^\circ$ с клиникой сгибательной контрактуры тазобедренного сустава, из них в 10 тазобедренных суставах наблюдалась антефлексия $10,2 \pm 0,6^\circ$ и в трех тазобедренных суставах – нормофлексия $0,0 \pm 0,4^\circ$.

При определении пространственной ориентации шейки бедренной кости у восьми пациентов основной группы в тазобедренных суставах выявлена ретроверсия $69,6 \pm 0,7^\circ$, а в 5

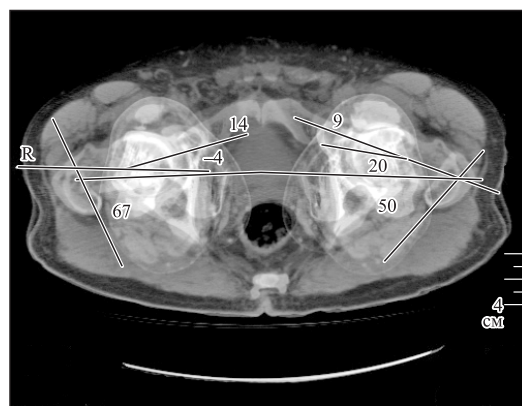


Рис. 5. «Наложённые» 3 среза томограммы оценки положения элементов проксимального отдела бедренной кости, используется авторская методика

случаях – антеверсия $81,5 \pm 1,3^\circ$. При изучении торсии бедренной кости у девяти пациентов в тазобедренных суставах выявлена антеторсия проксимального отдела бедренной кости $121,5 \pm 1,8^\circ$, у двух – ретроторсия $94,7 \pm 0,7^\circ$, у одного – нормоторсия $101,0 \pm 1,7^\circ$. У одного пациента основной группы лордоз в поясничном отделе позвоночника составил 133° , клиники люмбагоишиалгии и патологии поясничного отдела позвоночника не наблюдалось. При исследовании элементов проксимального отдела бедренной кости выявлена нормофлексия $0,0 \pm 0,4^\circ$, нормоверсия $75,2 \pm 0,3^\circ$, антеторсия $120,5 \pm 1,7^\circ$.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показывает, что изменение пространственного положения крестца, поясничного отдела позвоночника и элементов проксимального отдела бедренной кости взаимосвязано и является прогностическим тестом в возникновении дегенеративной патологии в поясничном отделе позвоночника и тазобедренных суставах. Основным фактором риска развития дегенеративных изменений в поясничном отделе позвоночника и тазобедренных суставах является горизонтализация или вертикализация крестца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.П. Остеометрия. Методика антропологических исследований. М.: Наука, 1966. 72–85.
2. Аристова И.С., Николенко В.Н. Особенности физического развития девушек-славянок с различными вариантами форм тазового пояса и свободных нижних конечностей // Морфологич. ведомости. 2006. (1–2, Прил. 1). 13–16.

3. Гафаров Х.З. Механизм торсии при развитии сегментов нижних конечностей. Ортопедия и травматология. 1981. (9). 6–9.
4. Лирицман В.М., Зоря В.И., Гнетецкий С.Ф. Проблема лечения переломов шейки бедра на рубеже // Вестн. травматологии и ортопедии. 1997. (2). 12–18.
5. Маркс В.О. Ортопедическая диагностика. Минск: Наука и техника, 1978. 147–154.
6. Михайлов Н.Н. Структурные преобразования проксимального конца бедренной кости на этапах онтогенеза человека: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Астрахань, 2008.
7. Плющев А.Л. Диспластический коксартроз: теория и практика. М.: Лето-принт, 2007. 33–46.
8. Родионова С.С., Макаров М.А., Колондаев А.Ф., Гаврюшенко Н.С. Значение минеральной плотности и показателей качества костной ткани в обеспечении ее прочности при остеопорозе // Вестн. травматологии и ортопедии. 2001. (2). 76–80.
9. Ревенко Т.А. Измерение отклонения головки и шейки бедра от оси мышечков. Ортопедия (патология суставов). Киев, 1966. 213–217.
10. Садофьева В.И. Рентгенофункциональная диагностика заболеваний опорно-двигательного аппарата у детей. Л.: Медицина, 1986. 216 с.
11. Ульрих Э.В., Мушкин А.Ю. Вертебрология в терминах, цифрах, рисунках. СПб., 2004. 190 с.
12. Янсон Х.А. Биомеханика нижней конечности человека. Рига: Зинатне, 1975. 320 с.
13. Jordan G.R., Loveridge N., Bell K.L. et al. Spatial clustering of remodeling osteons in the femoral neck cortex: a cause of weakness in hip fracture // Bone. 2000. 26. (3). 305–313.

ROLE OF THE SACRUM AND LOW-LUMBAR SPINE IN DETERMINING THE SPATIAL POSITION AND PATHOLOGY DEVELOPMENT OF THE PROXIMAL FEMUR

Valery Mikhailovich PROKHORENKO, Petr Sergeevich TURKOV, Viktor Yuryevich KUZIN, Andrey Mikhailovich PERFILIYEV

FSBI Research Institute for Traumatology and Orthopedics
630091 Novosibirsk, Frunze str., 17

Objective. To analyze the relationship of the lumbar spine, sacrum and the proximal femur. **Material and methods.** 30 patients and 10 volunteers underwent MSCT of the femur, and X-rays of the lumbar spine and the sacrum in 2 projections. Both groups were examined by a neurologist and spine surgeon. Angular relationships between the elements of the proximal femur were determined using our proposed evaluation method. The angle of lordosis of the lumbar spine and the position of the sacrum were estimated on radiographs. **Results.** In the control group of volunteers the elements of the proximal femur had the following spatial orientation: ante flexion of the femoral head was $0.0 \pm 0.4^\circ$; ante version of the femoral neck – $75.6 \pm 1.2^\circ$; ante torsion of the proximal femur – $101.7 \pm 0.7^\circ$, lumbar lordosis – $131.0 \pm 0.2^\circ$, pelvic misalignment – 1° , and the angle of sacral inclination – $30\text{--}40^\circ$. All patients of the main group had pelvic misalignment of $4.8 \pm 0.2^\circ$ and grade 1 spondylarthrosis. Two patients of this group had lumbar hyperlordosis of $155.5 \pm 0.9^\circ$ and grade 1 retrolisthesis with syndromes of fixed lumbar lordosis, jerky gait, lumbar-hip extensor rigidity and unilateral or bilateral ischialgia. They demonstrated normoflexion of $0.0 \pm 0.4^\circ$, retroversion of $68.0 \pm 1.2^\circ$ and ante torsion of $111.0 \pm 1.1^\circ$. In 7 patients of the main group lumbar hyperlordosis was $120.6 \pm 1.2^\circ$ with flexion contracture of the hip. Among them 10 hips had ante flexion of $10.2 \pm 0.6^\circ$ and 3 hips – normoflexion of $0.0 \pm 0.4^\circ$. A retroversion of $69.6 \pm 0.7^\circ$ was revealed in 8 patients, and an ante version of $81.5 \pm 1.3^\circ$ — in 5 cases. In 9 patients an ante torsion was $121.5 \pm 1.8^\circ$, in 2 cases – $94.7 \pm 0.6^\circ$ and in 1 case a normal torsion of $101.0 \pm 1.7^\circ$ was observed. In 1 patient lumbar lordosis was 133° , lumbar ischialgia and lumbar spine pathology were not observed, normoflexion was $0.0 \pm 0.4^\circ$, normoverversion – $75.2 \pm 0.3^\circ$, and ante torsion – $120.5 \pm 1.7^\circ$. **Conclusion.** This study shows that the change in the spatial position of the sacrum, lumbar spine, and the elements of the proximal femur is interconnected. Horizontal or vertical change in the sacrum slope is a risk factor for the development of degenerative changes in the lumbar spine and hip joints.

Key words: sacrum, lumbar spine, hip, diagnosis.

Prokhorenko V.M. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for traumatology and orthopedics, deputy director on clinical work, e-mail: VProhorenko@niito.ru
Turkov P.S. – postgraduate student, e-mail: sugery@yandex.ru
Kuzin V.Yu. – candidate of medical sciences, physician
Perfilyev A.M. – physician

СЛУЧАИ РАЗВИТИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ-1 У ДЕТЕЙ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

**Феруза Одилжоновна МИРДЖАМАЛОВА^{1,2}, Юлия Владимировна МЕЩЕРЯКОВА¹,
Евгения Владимировна КАЗАЕВА¹, Екатерина Борисовна САВОЧКИНА^{1,2},
Владислав Викторович БОГАЧЕВ², Павел Борисович БАРЫШЕВ²,
Юлия Владимировна НИКОНОРОВА², Юрий Андреевич ТОПЧИН¹,
Наиля Якубовна ЧЕРНОУСОВА¹, Валерий Николаевич МИХЕЕВ²,
Наталья Матвеевна ГАШНИКОВА²**

¹ ГБУЗ Новосибирский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД
и инфекционными заболеваниями

630559, Кольцово, ГНЦ ВБ «Вектор», корп. 20

² ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
630559, Кольцово

В работе выполнена комплексная оценка случаев развития множественной лекарственной устойчивости среди вариантов ВИЧ-1, выделенных у детей от 1,5 до 6 лет в Новосибирской области в 2010–2011 гг. Исследовано генетическое разнообразие ВИЧ-1, проведен анализ мутаций в геноме вируса, возникающих в ответ на антиретровирусную терапию, и оценена их распространенность. Показано, что среди исследованных вариантов ВИЧ-1 доминируют мутации, ответственные за формирование устойчивости к нуклеозидным и нуклеотидным ингибиторам обратной транскриптазы (M184V, Y181C и K103N). У 11 из 12 пациентов с неэффективностью терапии в анамнезе выявлена новая рекомбинантная форма CRF02_AG/A ВИЧ-1. Установлено, что коррекция схемы антиретровирусной терапии с учетом профиля резистентности ВИЧ-1 в большинстве случаев приводит к вирусологической эффективности терапии и снижению тяжести иммуносупрессии. Тем не менее приверженность к терапии, своевременное выявление максимально полного спектра мутаций устойчивости вируса, корректная оценка актуального профиля резистентности и генетических особенностей вариантов ВИЧ-1 также являются важными факторами, влияющими на успех антиретровирусной терапии.

Ключевые слова: ВИЧ-1, антиретровирусная терапия, дети, резистентность к антиретровирусным препаратам, Новосибирская область.

В настоящее время эпидемия ВИЧ-инфекции в Новосибирской области (НСО) приобретает все большие темпы, охватывая широкие слои населения. Среди впервые выявленных случаев ВИЧ-инфекции неуклонно возрастает удельный вес женщин, что, в свою очередь, приводит к росту числа детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями. Несмотря на большой охват беременных ВИЧ-инфицированных женщин 2-х

и 3-ступенчатой профилактикой перед родами, количество случаев передачи ВИЧ от матери к ребенку при рождении остается высоким. В целом частота вертикальной передачи ВИЧ в НСО совпадает с общероссийскими статистическими данными [1]. На территории области преобладает перинатальный путь инфицирования детей ВИЧ, но, кроме того, регистрируются отдельные случаи заражения детей ВИЧ при кормлении

Мирджамалова Ф.О. – врач-инфекционист, e-mail: fira2709dobs@mail.ru

Мещерякова Ю.В. – врач-инфекционист, e-mail: yuliya_meshcheryakova@list.ru

Казеева Е.В. – врач-инфекционист, зав. отделением, e-mail: Kazaeva@ngs.ru

Савочкина Е.Б. – врач-инфекционист, e-mail: e.savochkina@list.ru

Богачев В.В. – младший научный сотрудник отдела ретровирусов, e-mail: sleeepy@ngs.ru

Барышев П.Б. – младший научный сотрудник отдела ретровирусов, e-mail: pavel1983@ngs.ru

Никонорова Ю.В. – младший научный сотрудник отдела ретровирусов, e-mail: jvnik@mail.ru

Топчин Ю.А. – зав. отделением эпидемиологии, e-mail: epidhiv_nsk@mail.ru

Чернусова Н.Я. – главный врач, e-mail: topnsk@mail.ru

Михеев В.Н. – к.м.н., зам. генерального директора, e-mail: vn_mikheev@vector.nsc.ru

Гашишкова Н.М. – к.б.н., зав. отделом ретровирусов, e-mail: ngash@vector.nsc.ru

грудью. На 1 октября 2012 г. в НСО зарегистрировано 1380 детей с перинатальным контактом по ВИЧ, из них у 109 (8,0 %) подтвержден диагноз ВИЧ-инфекция. На 01.10.2012 г. антиретровирусную терапию (АРВТ) получали 78 детей, из которых в 20 случаях отмечалась вирусологическая и/или иммунологическая неудача антиретровирусной терапии.

Цель данного исследования заключалась в изучении случаев множественной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в педиатрической практике в городе Новосибирске, выявленных в период 2010–2011 гг.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 12 детей, состоящих на учете в ГБУЗ НСО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями». Возраст детей составлял от 1,5 до 6 лет. Все дети находились на разных стадиях ВИЧ-инфекции, получали антиретровирусные препараты (АРВП) и имели в анамнезе вирусологическую неэффективность АРВТ.

Мониторинг терапии включал определение показателей периферической крови и параметров биохимического анализа крови, количественное определение уровня РНК ВИЧ-1 в плазме крови (вирусная нагрузка), исследование иммунного статуса (количество лимфоцитов CD4+). Концентрацию РНК ВИЧ-1 в плазме крови определяли с помощью наборов Amplicor Roche HIV-1 Monitor (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария), содержание лимфоцитов CD4+ (абсолютное и относительное) – методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител фирмы Becton Dickinson (Facs Count™, Becton Dickinson, США).

Выделение изолятов ВИЧ проводили методом сокультивирования моноклеаров периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов с предварительно стимулированными фитогемагглютинином моноклеарами здоровых доноров [7]. Репликацию вируса оценивали по уровню накопления вирусспецифического белка p24, определяемого в иммуноферментном анализе, с использованием тест-системы «ВИЧ-1 p24-антиген-ИФА-БЕСТ» (ВекторБест, Россия).

Выделение вариантов ВИЧ-1 для генетических исследований проводилось из клинических образцов плазмы крови, забранной для определения вирусной нагрузки. Исследование вариантов ВИЧ-1 на наличие мутаций устойчивости к АРВП осуществляли путем анализа нуклеотидных последовательностей участка гена *pol*. Исследуемые фрагменты генома ВИЧ-1 имели

длину 1,3 тыс. нуклеотидных остатков, включая последовательности гена, кодирующего протеазу и обратную транскриптазу вируса. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на секвенаторе модели 3130xl фирмы ABI PRISM (модель 3130xl, Applied Biosystems, США). Для наработки фрагментов гена *pol* использовали наборы «Виросек» (Viroseq HIV-1 Genotyping System, Abbott™). Выявление мутаций, ответственных за устойчивость к антиретровирусным препаратам, осуществляли с помощью программы «HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm», представленной на Интернет-сайте Стенфордского университета [6]. Филогенетический анализ и определение субтипа ВИЧ-1 выполняли с помощью программы «Mega», версия 4.1, путем построения филогенетических деревьев методом ближайших соседей [12]. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. В качестве референс-последовательностей использовали ранее охарактеризованные последовательности субтипов и групп ВИЧ-1 из международной базы данных (GenBank) [5]. Достоверность филогенетических отношений определяли методом бутстрэп-анализа с построением 500 деревьев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В период 2010–2011 гг. в Новосибирской области АРВТ получали 57 ВИЧ-инфицированных детей, в 19 случаях была выявлена ее неэффективность. У 12 детей, имеющих опыт приема АРВП в течение как минимум одного года, схемы АРВТ неоднократно менялись в связи с иммунологической и клинической неэффективностью терапии, ни у кого из них не было диагностировано значимого снижения уровня РНК ВИЧ-1 в плазме крови при назначении АРВП. Эти пациенты были включены в группу наблюдения, основные клинко-эпидемиологические данные детей на момент формирования группы (2010–2011 гг.) приведены в табл. 1.

В 11 случаях инфицирование ВИЧ произошло вертикальным путем, в одном случае путь инфицирования не установлен. У 4 пациентов была диагностирована клиническая категория С (в анамнезе имела место СПИД-индикаторная патология – пневмоцистная пневмония, внегочный туберкулез, диссеминированная цитомегаловирусная инфекция), у 4 – категория В, у 2 – категория А, у 2 – категория N (отсутствие клинических симптомов ВИЧ-инфекции). При установлении стадии заболевания использовалась клинко-иммунологическая классификация ВИЧ-инфекции у детей до 13 лет, предложенная

Таблица 1

Характеристика пациентов, включенных в исследование

Характеристика	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12
Пол	Мужской	Мужской	Мужской	Женский	Мужской	Женский	Женский	Мужской	Мужской	Мужской	Мужской	Мужской
Возраст	4 года 7 мес.	4 года 3 мес.	4 года 11 мес.	4 года 1 мес.	3 года 1 мес.	4 года 6 мес.	5 года 2 мес.	4 года 3 мес.	3 года 11 мес.	5 лет	2 года 7 мес.	8 лет
Стадия ВИЧ-инфекции	C3	C1	B2	N2	B1	N2	B1	A2	C1	A1	C2	B3
Клинический статус	Внегочерный туберкулез, кандидозный стоматит	Генерализованная ЦМВ инфекция	Кандидозный стоматит	Субклиника	Кандидозный стоматит, персистир. генерализованная лимфаденопатия	Субклиника	Диссем. туберкулез легких, herpes zoster, кандидоз, инфекции дыхательных путей	Кандидозный стоматит, рецидивные инфекции дыхательных путей	Пневмоцистная пневмония	Рецидивные респираторные инфекции, лимфаденопатия	Пневмоцистная пневмония	Волос. лейкопл., рецидивный кандидозный стоматит, алопеция, лимфаденопатия
Профилактика: перинатальная	Нет	Нет			Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
при родах	NVP	Нет	NVP	NVP	NVP	Нет	NVP	Нет	Нет	NVP	Нет	Нет
Грудное вскармливание	Да	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Да
Социальный статус	Проживает в семье	Проживает в доме ребенка	Проживает в семье	Проживает в семье	Проживает в доме ребенка	Проживает в семье	Проживает в семье	Проживает в доме ребенка	Проживает в доме ребенка	Проживает в семье	Проживает в семье	Проживает в семье

CDC в 1994 г. и применяющаяся в Российской Федерации [9].

Все пациенты получали антиретровирусные препараты трех классов: нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (соответственно НИОТ и ННИОТ), ингибиторы протеазы (ИП). Во всех случаях была зарегистрирована вирусологическая неэффективность схем АРВТ. Следует подчеркнуть, что 4 пациента из 12 проживают в домах ребенка, исходя из асоциальных семей.

Для всех детей было выполнено генетическое исследование выделенных из плазмы крови вариантов ВИЧ-1. Исследование вируса включало определение нуклеотидной последовательности области гена *pol*, кодирующей протеазу и обратную транскриптазу ВИЧ-1. Для расшифрованных нуклеотидных последовательностей вариантов ВИЧ-1 был проведен анализ наличия мутаций, обуславливающих развитие резистентности к АРВП.

В 12 случаях (21,1 % от общего количества детей, принимающих АРВТ) у пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ были выявлены варианты ВИЧ-1, содержащие в геноме наборы мутаций, опосредующих развитие множественной лекарственной устойчивости вируса к антиретровирусным препаратам – НИОТ, ННИОТ и ИП. Обобщенные данные по разнообразию и частоте выявленных мутаций ВИЧ-1 представлены в табл. 2. Наиболее часто возникла замена M184V, обуславливающая устойчивость высокого уровня к ЗТС, FTC и небольшое снижение чувствительности к ABC и ddI (клинически незначимое в отсутствие других мутаций резистентности). Исследованиями ряда авторов показано, что появление такой мутации в геноме вируса приводит к снижению репликативных характеристик ВИЧ, повышению чувствительности вируса к AZT, d4T и TDF. Кроме того, при включении в схему АРВТ аналогов тимидина наличие M184V замедляет процесс селекции в геноме ВИЧ соответствующих мутаций устойчивости [3]. Среди исследованных вариантов в 7 из 9 случаев выявлялись одновременно M184V и мутации к НИОТ и ННИОТ.

В 7 случаях ВИЧ-инфекции была предпринята попытка выделения инфекционных изолятов ВИЧ-1 для оценки репродуктивных свойств вируса. Успешным оказалось выделение изолятов лишь в четырех случаях, при этом наблюдалась четкая зависимость вероятности выделения от концентрации РНК ВИЧ-1 в плазме пациента. Изоляты ВИЧ-1 были получены только от пациентов, имеющих показатели вирусной на-

грузки, превышающие 10^4 копий РНК на 1 мл плазмы (K1, K4, K6, K7). В трех других случаях концентрация РНК ВИЧ-1 в плазме крови была ниже 1000 копий/мл (K3, K8, K9). У пациента K4 был выявлен ВИЧ-1, несущий мутации T215Y, K103N и V90I при отсутствии M184V. Изолят ВИЧ-1, выделенный от пациента K4, в 2,5–163 раза превосходил по уровню репродукции варианты ВИЧ-1, выделенные от пациентов K1, K6, K7, содержащие в геноме в комплексе с другими мутациями и M184V (данные не приведены). Необходимо отметить, что у варианта ВИЧ-1, выделенного от пациента K4, при повторном определении мутаций устойчивости после процесса изоляции вируса из клинического образца, в отличие от трех других вариантов ВИЧ, все мутации устойчивости были утрачены. Интересно, что в случае ВИЧ-1, выделенного от пациента K7, напротив, после выделения инфекционного вируса в культуре моноклеональных клеток была выявлена дополнительная, не обнаруживаемая в плазме крови, мутация K103N, которая вызывает повышение резистентности ко всем ННИОТ первого поколения в

Таблица 2

Представленность и частота встречаемости мутаций, ответственных за развитие устойчивости к лекарственным препаратам, среди вариантов ВИЧ-1, выделенных у инфицированных ВИЧ детей Новосибирской области

Группа препаратов	Мутация	Частота выявления
Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ)	M184V	9 (75,0 %)
	D67N	4 (33,3 %)
	K70R	4 (33,3 %)
	K219E, N	4 (33,3 %)
	P225H	1 (8,3 %)
	N215Y	1 (8,3 %)
	Q151M	1 (8,3 %)
	T69S	1 (8,3 %)
	Y115F	1 (8,3 %)
	F77L	1 (8,3 %)
	V75I	1 (8,3 %)
Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ)	K103N	7 (58,3 %)
	Y181C	7 (58,3 %)
	V108I	1 (8,3 %)
	G190A	1 (8,3 %)
Ингибиторы протеазы (ИП)	K101E	1 (8,3 %)
	N88S	1 (8,3 %)
	L90M	1 (8,3 %)

Таблица 3

Схемы АРВТ пациентов, их эффективность, выявленные профили резистентности исследованных вариантов ВИЧ-1 и мутации в геноме вируса, обуславливающие развитие резистентности

Пациент	Схемы АРВТ, сроки и эффективность	Профиль резистентности	Мутации в геноме ВИЧ-1
1	2	3	4
K1	1. F-AZT + DDI + NVP (03.2009 – 02.2010) 2. 3TC + ABC + NVP (02.2010 – 05.2010) Иммунологическая, вирусологическая неэффективность Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 3. 3TC + ABC + LPV/RTV (03.05.2010 – настоящее время) Иммунологическая, вирусологическая неэффективность	3TC, FTC DLV, EFV NVP ETR AZT ABC	K70IKRT M184V K103N Y181FSY
K2	1. F-AZT + ABC + 3TC (11.2008 – 11.2009) Вирусологическая неэффективность, отсутствие иммуносупрессии Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 2. 3TC + DDI + FPV/r (10.2010 – наст. время) Вирусологический ответ	3TC FTC AZT ABC D4T DDI	D67N K70R M184V
K3	1. F-AZT + DDI + NVP (07.2009 – 03.2010) 2. F-AZT + DDI + NFV (03.2010 – 10.2010) Иммунологическая и вирусологическая неэффективность Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 3. F-AZT + DDI + LPV/r (10.2010 – по наст. время) Вирусологический ответ, снижение иммуносупрессии	3TC, FTC DLV, EFV NVP, ABC AZT DDI ETV	T69S K70R M184V K103N P225H
K4	1. F-AZT + DDI + NVP (07.2009 – 10.2010) Иммунологическая и вирусологическая неэффективность Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 2. F-AZT + DDI + LPV/r (10.2010 – 13.06.12) Вирусологический и иммунологический ответ 3. AZT/3TC + LPV/R (13.06.12– наст. время)	NVP, EFV DLV, AZT D4T, ABC DDI TDF	T215Y V90I K103N
K5	1. F-AZT + DDI + NVP (08.2009 – 05.10.10) Иммунологическая и вирусологическая неэффективность Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 2. F-AZT + DDI + LPV/R (05.10.10 – 20.09.11) Перерыв терапии 3. F-AZT + 3TC + LPV/R (13.08.2012 – наст. время) Иммунологическая и вирусологическая неэффективность	NVP EFV DLV ETR	A98G K103N
K6	1. F-AZT + DDI + 3TC (11.2009 – 07.2010) Вирусологическая неэффективность Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 2. AZT + DDI + ABC (07.2010 – наст. время) Вирусологический и иммунологический ответ	3TC, FTC NVP EFV DLV ABC	M184V K103N
K7	1. F-AZT + 3TC + NVP (10.2009 – 05.2010) Вирусологическая неэффективность Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 2. F-AZT + DDI + NFV (05.2010 – наст. время) Вирусологический и иммунологический ответ	3TC, FTC NVP EFV ETR ABC	M184V K219N K103N Y181C
K8	1. F-AZT + 3TC + LPV/r (03.2008 – 05.2008) 2. F-AZT + 3TC (05.2008 – 07.2008) 3. F-AZT + 3TC + ABC (07.2008 – 07.2010) Вирусологическая неэффективность Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 4. F-AZT + 3TC + NFV (07.2010 – наст. время) Вирусологический и иммунологический ответ	AZT 3TC DDI D4T ABC FTC TDF	D67N V75I F77L Y115F Q151M M184V K219E

Окончание табл. 3

1	2	3	4
K9	1. AZT + DDI + NVP (06.2009 – 09.2009) 2. AZT + 3TC + NVP (02.2010 – 07.2010) Вирусологическая неэффективность Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 3. AZT + DDI + 3TC + LPV/r (07.2010 – наст. время) Вирусологический и иммунологический ответ	3TC, FTC NVP EFV DLV ETR ABC	M184V K101E Y181C G190A
K10	1. ABC + 3TC + NFV (11.08.09–21.10.09) 2.. ABC + 3TC + NVP (23.10.09–23.10.10) 3. ABC + 3TC + LPV/r (23.10.10–02.03.11) Приверженность низкая Вирусологическая неэффективность, появление иммуносупрессии 4. LPV/R + 3TC + ABC (03. 03.2011 - 16.05.12) Коррекция АРВТ с учетом резистентности Высокая вирусная нагрузка сохраняется, развивается иммуносупрессия, планируется коррекция АРВТ	DLV, NVP ETR, EFV	T69S Y181C
K11	1. F-AZT + 3TC + NVP (25.06.09 – 02.03.11) Вирусологическая неэффективность, иммуносупрессия Коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности 2. ABC + ddI + LPV/r (02.03.11 – по наст. время) Вирусологический и иммунологический ответ	3TC, ZT, FTC, ABC D4T, DDI TDF, DLV NVP, EFV ETR	D67N, R70R, M184, N215Y, K219N K103N, Y181C
K12	1. ABC + 3TC + FPV (04.01.10 – 22.04.10) 2. ABC + 3TC + FPV + ddI (22.04.10 – 03.11.11) Вирусологическая неэффективность, прогрессирование иммуносупрессии Коррекция АРВТ с учетом резистентности 3. Зиаген + Эпивир + Видекс + калетра (03.11.11 – 19.03.12) 4. Никавир + Эпивир + Вирамун + фузеон (19.03.12 – по наст. время) Вирусологическая, иммунологическая неэффективность	3TC, FTC DDI, ABC APV, FOS NFV, IDV LPV/R SQV, DRV, ATV, TPV	K103N, Y181C

20–50 раз. Мутация K103N наряду с Y181C занимает второе место по степени распространенности среди исследованных вариантов ВИЧ-1. Y181C вызывает резистентность к NVP и DLV, повышая чувствительность к AZT и тенофовиру [3]. На третьем месте по распространенности были мутации тимидинового ряда, определяющие резистентность к НИОТ. Важно отметить, что только в двух случаях были выявлены мутации устойчивости к ИП: L90M, которая вызывает резистентность среднего уровня к SQV, NFV и резистентность низкого уровня к другим ИП, за исключением TPV, и мутация N88S, ответственная за высокий уровень резистентности к NFV и ATV/r и низкую резистентность к IDV/r; при этом данная мутация усиливает чувствительность к FPV/r [3].

Полученные результаты объясняются молекулярно-биологическими особенностями формирования резистентности ВИЧ-1. К некоторым НИОТ (например, ламивудину) и ННИОТ резистентность высокого уровня может возникнуть уже после появления одиночной точечной

мутации (например, M184V), в то время как ИП имеют более высокий генетический порог формирования резистентности [4, 10].

После определения профиля мутаций устойчивости ВИЧ-1 для всех пациентов из группы наблюдения в 2010–2011 гг. проводилась корректировка терапии. Эффективность схемы антиретровирусной терапии, скорректированной с учетом профиля резистентности ВИЧ-1 у детей, оценивалась с учетом показателей параметров биохимического анализа крови, определения концентрации РНК ВИЧ-1 в плазме крови и исследования иммунного статуса.

Ретроспективный анализ выявил, что у 7 детей после выявления профиля резистентности и смены схемы АРВТ отмечался вирусологический и иммунологический ответ (K3, K4, K6, K7, K8, K9 и K11). У четверых из них при этом регистрировались ВИЧ-ассоциированные заболевания (K7, K8, K9 и K11).

У одного ребенка на фоне отсутствия иммуносупрессии, но при высокой вирусной нагрузке после коррекции АРВТ отмечался вирусологический ответ (K2).

У трех детей (K1, K5 и K12) после смены терапии, с учетом выявленной резистентности ВИЧ к АРВП, по-прежнему наблюдаются стабильно высокие показатели вирусной нагрузки и иммуносупрессия.

У пациента K10 на фоне нормального иммунного статуса и вирусологической неэффективности первой схемы АРВТ была проведена коррекция терапии с учетом профиля резистентности. Изменение терапии не повлияло на эффективность лечения – высокая вирусная нагрузка сохраняется, при этом в динамике отмечается появление иммуносупрессии.

Для 12 случаев ВИЧ-инфекции, вызванной вариантами вируса, несущими множественные мутации лекарственной устойчивости, была определена принадлежность к генетическому субтипу ВИЧ-1. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей показал, что в 11 из 12 сложных случаев ВИЧ-инфекции заболевание вызвано новой рекомбинантной формой ВИЧ-1 CRF02_AG/A, выявленной и описанной нами ранее [2], и лишь в одном случае был выделен ВИЧ-1, относящийся к широко распространенному в России субтипу А (K8).

Появление резистентных штаммов ВИЧ-1 продолжает оставаться одной из основных причин неэффективности антиретровирусной терапии. На фоне нестабильной и быстро развивающейся эпидемии ВИЧ-инфекции и увеличения масштабов охвата ВИЧ-инфицированных специфической терапией во многих странах мира, в том числе и в России, складываются неблагоприятные предпосылки для развития высокорезистентных циркулирующих вариантов возбудителя. В большинстве регионов ситуация усугубляется длительным применением неадекватных схем АРВТ, а также низкой приверженностью пациентов к терапии, что создает еще более благоприятные условия для распространения резистентных штаммов ВИЧ-1. Кроме того, коррекция терапии без учета данных профиля резистентности приводит к развитию перекрестной устойчивости ВИЧ к большинству известных препаратов, что создает огромную проблему в выборе эффективной схемы лечения.

Ключевой особенностью иммунологии ВИЧ-инфекции у детей раннего возраста является незрелость иммунной системы, обусловленная прежде всего тем, что организм прежде не встречался с чужеродными антигенами, и поэтому полноценный специфический иммунный ответ на ВИЧ невозможен. Установлено, что при перинатальном инфицировании специфические к ВИЧ цитотоксические лимфоциты, уничтожающие инфицированные вирусом клет-

ки и подавляющие репликацию вируса, появляются как минимум к шестому месяцу жизни [8, 11]. Отсутствие полноценного антигенспецифического иммунного ответа на ВИЧ у детей раннего возраста служит основной причиной высокой репликативной активности вируса и, как следствие, более быстрого формирования резистентных штаммов. Другой не менее важной причиной высокого уровня виремии у детей при вертикальном пути инфицирования является передача мутантных штаммов вируса от матери. Поскольку ребенок наследует только половину материнских аллелей HLA, вирус, адаптировавшийся к иммунной системе матери, несет меньше антигенных детерминант, которые способны эффективно взаимодействовать с молекулами HLA ребенка и распознаваться его иммунной системой [10]. Вышеуказанные факторы создают предпосылки для более высокой скорости репликации ВИЧ в организме ребенка, более интенсивных темпов формирования резистентных к АРВП штаммов ВИЧ-1 и, как результат, более быстрому прогрессированию заболевания. Это диктует необходимость раннего назначения АРВТ в педиатрической практике с целью подавления репликативной активности вируса. Вместе с тем более раннее начало терапии у детей, чем у взрослых, создает предпосылки для столь же раннего формирования лекарственной устойчивости ВИЧ-1, что диктует необходимость обязательной оценки профиля резистентности при плановой коррекции схемы АРВТ и перед первым ее назначением, поскольку возможно инфицирование детей первично-резистентными штаммами.

Дополнительными факторами, способствующими формированию множественной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 у детей раннего возраста, являются отсутствие фиксированных дозировок препаратов (расчет на 1 кг массы тела), более низкая приверженность к терапии, чем у взрослых пациентов, трудности с приемом препаратов внутрь и их переносимостью. Кроме того, в странах с ограниченными ресурсами актуальны следующие проблемы: отсутствие детских форм ряда антиретровирусных препаратов, широко применяющихся в педиатрической практике в развитых странах мира, происхождение детей из социально неблагополучных семей (наркомания, алкоголизм у родителей), которые впоследствии порождают низкую приверженность к терапии, а также высокий процент «отказных» детей с ВИЧ-инфекцией. Следует подчеркнуть, что далеко не все препараты, одобренные Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препара-

ратов США для лечения ВИЧ-инфекции, могут применяться к детям раннего возраста, что существенно ограничивает возможности антиретровирусной терапии в педиатрической практике [4].

Подводя итоги проведенного исследования случаев развития множественной лекарственной устойчивости среди вариантов ВИЧ-1, выделенных от инфицированных ВИЧ-1 детей, получающих АРВТ, необходимо отметить, что коррекция схемы АРВТ с учетом профиля резистентности ВИЧ-1 в большинстве случаев приводит к вирусологической эффективности терапии и снижению тяжести иммуносупрессии. Тем не менее в ряде случаев (K1, K5, K10 и K12) смена терапии не привела к достижению вирусологического ответа, у данных пациентов не было зарегистрировано снижения уровня вирусной нагрузки и продолжала развиваться иммуносупрессия. Возможно, для пациентов K5 и K10 отсутствие положительного ответа на изменение схемы АРВТ в первую очередь связано с низкой приверженностью к терапии. К другим причинам, отрицательно влияющим на эффективность терапии, может быть отнесено несвоевременное выявление возникших мутаций устойчивости в геноме ВИЧ-1, изменяющих профиль резистентности вируса, в связи с недостаточно эффективным взаимодействием пациентов и лечащих врачей, а также диагностических лабораторий, проводящих исследования по определению резистентности ВИЧ. Кроме того, важным фактором является и недостаточно полное выявление всех минорных мутаций устойчивости ВИЧ, что связано с чувствительностью метода секвенирования. В данном случае большое значение играет квалификация персонала диагностических лабораторий, так как выявление минорных мутаций требует индивидуального, неформализованного подхода к анализу расшифрованных нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1. В связи с постоянным пополнением знаний о спектре мутаций устойчивости ВИЧ-1, их влиянии на общий профиль резистентности вируса и его репродуктивные характеристики возрастают требования к постоянному повышению уровня квалификации и специальной подготовки врачей-инфекционистов.

Обращает на себя внимание то, что у 11 из 12 пациентов с неэффективной терапией в анамнезе выявлена рекомбинантная форма ВИЧ-1 CRF02_AG/A. В первую очередь это дает основание предполагать, что роль данного генетического варианта ВИЧ-1 в эпидемии ВИЧ-инфекции в России в ближайшие годы будет возрастать. Во-вторых, этот факт подчеркивает

актуальность и необходимость углубленного изучения биологии CRF02_AG/A ВИЧ-1 и патогенеза заболевания, которое вызывает данный генетический вариант ВИЧ-1.

Актуальность генотипирования ВИЧ-1 с оценкой профиля резистентности и ее клинически положительная роль в педиатрической практике перед началом АРВТ или планируемой ее коррекцией при терапии ВИЧ-инфекции у детей не вызывает сомнений. Своевременное качественное определение профиля резистентности ВИЧ-1 при ухудшении клинического состояния ребенка может существенно повысить вероятность вирусологического ответа на ту или иную схему терапии, что в свою очередь позволит назначать пациентам оптимальную комбинацию препаратов.

Работа проводилась с использованием УСУ при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, Государственный контракт № 14.518.11.7062; при финансовой поддержке по гранту НШ-2996.2012.4 по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровский В.В., Соколова Е.В., Юрин О.Г., Ладная Н.Н. и др. Вертикальная передача ВИЧ-инфекции в Российской Федерации // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2008. (3). 24–28.
2. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. Genetic characterization of HIV-1 strains recombinant form AG circulating in Siberia, Russia // Arch. Virol. 2012. <http://link.springer.com/article/10.1007/s00705-012-1442-4/fulltext.html>
3. Clotet B., Menendez-Arias L., Schapiro J.M. et al. Guide to management of HIV drug resistance, antiretrovirals pharmacokinetics and viral hepatitis in HIV infected subjects. 9th ed. 2009. 408 p.
4. Gupta R.K., Gibb D.M., Pillay D. Management of paediatric HIV-1 resistance // Curr. Opin. Infect. Dis. 2009. 22. (3). 256–263.
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
6. <http://hivdb6.stanford.edu>
7. Human retrovirus protocols: Virology and molecular biology / Ed. T. Zhu. Totowa: Human Press, 2005. 495 p.
8. Luzuriaga K., Holmes D., Hereema A. et al. HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses in the first year of life // J. Immunol. 1995. 154. (1). 433–443.
9. MMWR. 1994. 43. (RR-12). 1.
10. Prado J.G., Prendergast A., Thobakgale C. et al. Replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1 transmitted from mother to child is as-

sociated with pediatric disease progression rate // J. Virol. 2010. 84. 492–502.

11. Spiegel H.M., Chandwani R., Sheehy M.E. et al. The impact of early initiation of highly active antiretroviral therapy on the human immunodeficiency

virus type-1-specific CD8 T cell response in children // J. Infect. Dis. 2000. 182. (1). 88–95.

12. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. 24. 1596–1599.

THE CASE OF MULTI-DRUG RESISTANT HIV-1 IN CHILDREN OF NOVOSIBIRSK REGION

Feruza Odilzhonovna MIRDZHAMALOVA^{1,2}, Yulia Vladimirovna MESHCHERYAKOVA¹, Yevgenia Vladimirovna KAZAEVA¹, Ekaterina Borisovna SAVOCHKINA^{1,2}, Vladislav Viktorovich BOGACHEV², Pavel Borisovich BARYSHEV², Yulia Vladimirovna NIKONOROVA², Yuri Andreevich TOPCHIN¹, Naila Yakubovna CHERNOUSOVA¹, Valery Nikolevich MIKHEEV², Nataliya Matveevna GASHNIKOVA²

¹ State Budgetary Health Institution Novosibirsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases
630559, Koltsovo, «Vector», 20

² State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»
630559, Koltsovo

A comprehensive assessment of cases of multidrug-resistant HIV-1 isolated in children aged 1.5 to 6 years in the Novosibirsk region in 2010–2011 has been performed. The genetic diversity of HIV-1, the analysis of mutations in the genome of the virus, which arise in response to antiretroviral therapy were studied and their prevalence was evaluated. It was shown that among the studied variants of HIV-1 most mutations responsible for the formation of resistance are due to nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (M184V, Y181C and K103N). A new recombinant form CRF02_AG / A HIV-1 was revealed in 11 of 12 patients with treatment failure in history. It was found that the correction scheme based on ART resistance profile of HIV-1 in the majority of cases leads to therapy viral effectiveness and immunosuppression severity reduction. However, adherence to therapy and early detection of the full range of mutations of the virus, the correct assessment of the current profile of resistance and genetic characteristics of HIV-1 are also important factors in the success of ART.

Key words: HIV-1, antiretroviral therapy, children, antiretroviral drug resistance, the Novosibirsk Region.

Mirdzhamalova F.O. – infectious diseases doctor, e-mail: fira2709dobs@mail.ru

Meshcheryakova Yu.V. – infectious diseases doctor, e-mail: yuliya_meshcheryakova@list.ru

Kazaeva Ye.V. – infectious diseases doctor, head of department, e-mail: Kazaeva@ngs.ru

Savochkina E.B. – infectious diseases doctor, e-mail: e.savochkina@list.ru

Bogachev V.V. – junior researcher of department of retroviruses, e-mail: sleeepy@ngs.ru

Baryshev P.B. – junior researcher of department of retroviruses, e-mail: pavel1983@ngs.ru

Nikonorova Yu.V. – junior researcher of department of retroviruses, e-mail: jvnik@mail.ru

Topchin Yu.A. – head of department of epidemiology, e-mail: epidhiv_nsk@mail.ru

Chernousova N.Ya. – chief medical officer, e-mail: topnsk@mail.ru

Mikheev V.N. – candidate of medical sciences, deputy director general, e-mail: vn_mikheev@vector.nsc.ru

Gashnikova N.M. – candidate of biological sciences, head of the retroviruses department, e-mail: ngash@vector.nsc.ru

УДК 57.02:001.57

**СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКОЙ
ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ И ПРОГНОЗА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ИКСОДОВЫХ
КЛЕЩЕЙ НА ПРИМЕРЕ ГОРОДА ИРКУТСКА**

**Геннадий Михайлович РУЖНИКОВ¹, Галина Анатольевна ДАНЧИНОВА²,
Роман Константинович ФЕДОРОВ¹, Максим Анатольевич ХАСНАТИНОВ²,
Вячеслав Владимирович ПАРАМОНОВ¹, Александр Валерьевич ЛЯПУНОВ²**

¹ ФГБУН Институт динамики систем и теории управления СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 134

² ФГБУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16

Приводятся материалы по актуальности создания современных систем оценки существующего состояния и прогноза распространения переносчиков опасных заболеваний человека, передающихся через укусы иксодовых клещей. Для эффективного мониторинга целесообразно применение геоинформационных технологий с возможностью доступа к такому сервису всех заинтересованных лиц. На первом этапе разработки технологии раннего выявления известных и новых патогенов предлагается создание единой платформы, которая объединяла бы все необходимые данные и средства анализа. Реализация идеи связана с развитием WEB-, геоинформационных технологий и OLAP-анализа пространственных данных. Полученные прогнозы и модели станут основой обеспечения экологической безопасности населения и принятия компетентных управленческих решений по профилактике инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: непрерывный мониторинг, иксодовые клещи, патогенные микроорганизмы, информационно-аналитическая оценка, прогноз, геоинформационные технологии.

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Иксодовые клещи являются переносчиками возбудителей многих природно-очаговых заболеваний, из которых наиболее опасны клещевой энцефалит и клещевой боррелиоз. Кроме этого известно о других заболеваниях, передаваемых иксодовыми клещами: анаплазмозах, эрлихиозах, Ку-лихорадке, туляремии, бабезиозах, омской и крымской геморрагических лихорадках и др. На территории России встречается около 60 видов иксодовых клещей, основным переносчиком клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза является таежный клещ – *Ixodes*

persulcatus P. Sch., 1930. В Прибайкалье клещи этого вида имеют наибольшее эпидемическое значение [3–6]. Второе место по значимости занимает степной клещ *Dermacentor nuttalli* Ol., 1929. Также отмечаются укусы людей клещами других видов: *Dermacentor silvarum* Ol., 1932, *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844 и даже *Amblyomma americanum* L., 1758 [7].

Ежегодно в Центр диагностики и профилактики клещевых инфекций ФГБУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН обращается примерно 6,5–8 тыс. человек, пострадавших от укусов иксодовых

Ружников Г.М. – к.т.н., зам. директора по информатизации, e-mail: ruginov@icc.ru

Данчинова Г.А. – д.б.н., рук. лаборатории трансмиссивных инфекций, e-mail: dan-chin@yandex.ru

Федоров Р.К. – к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории комплексных информационных систем, e-mail: fedorov@icc.ru

Хаснатинов М.А. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, e-mail: khasnatinov@yandex.ru

Парамонов В.В. – к.т.н., научный сотрудник лаборатории комплексных информационных систем, e-mail: slv@icc.ru

Ляпунов А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, e-mail: liapunov.asp@mail.ru

клещей. Среди них значительную часть составляют люди, подвергшиеся укусам клещей в пределах как городской черты Иркутска, так и его окрестностей, в основном на территории Иркутско-сельского района. Все случаи обращений населения регистрируются в электронных базах вышеуказанного учреждения [1, 2, 12], куда заносятся все данные об обстоятельствах укуса, в том числе отмечается местность, где произошел укус клеща. Подобная информация по фактам укусов людей иксодовыми клещами, проведенным лабораторным исследованиям и профилактическим мероприятиям накапливается в течение многих лет.

Однако для обеспечения более эффективных мер профилактики необходим пространственный и временной анализ распространения клещей, в том числе инфицированных теми или иными возбудителями, в зависимости от естественных факторов и т. д. Отсутствие эффективной технологии раннего выявления известных и новых патогенов и прогнозирования их распространения является одной из важных и острых проблем. И в этой связи одним из наиболее перспективных способов контроля над возбудителями инфекций может стать система непрерывного наблюдения [10]. Первым шагом к созданию подобной системы является пространственный и временной анализ на основе математического моделирования и геоинформационных технологий.

В нашей стране для эффективной организации и управления большим объемом накопленных тематических данных по распространению иксодовых клещей, случаев обращаемости людей с укусами клещей используются единичные базы данных и информационно-справочные системы. Анализируя имеющиеся материалы, можно выделить проблемы, которые, на наш взгляд, необходимо учитывать при формировании современной комплексной информационно-аналитической среды (ИАС): 1) большие объемы разнородных данных, в том числе на бумажных носителях, затрудняют анализ информации; 2) базы данных (БД) локализованы в разных ведомствах и учреждениях, не взаимодействующих между собой, что затрудняет обмен информацией и комплексирование между учреждениями.

В качестве близких по назначению информационных систем можно привести набор сервисов VektorMap [17], предназначенный для мониторинга переносчиков инфекционных заболеваний в глобальном масштабе. В настоящее время данный проект сконцентрирован в основном на комарах [14], однако начата разработка

сервиса для мониторинга клещей. Сейчас этот сервис сосредоточен главным образом на научных исследованиях и не предоставляет возможности прогнозирования эпидемиологической ситуации по клещевым инфекциям [16]. Также существует проект «Кронарос» [18], развиваемый Зоологическим институтом РАН (г. Санкт-Петербург) и направленный на оценку разнообразия кровососущих насекомых и создание информационно-аналитической системы для их мониторинга на Северо-Западе России. Однако этот проект ориентирован на анализ популяций только насекомых и лишь на Северо-Западе России. Какой-либо информации по развитию проекта после 2009 года в открытом доступе не обнаружено.

ОСНОВНАЯ ИДЕЯ

Начальным этапом разработки эффективной технологии раннего выявления известных и новых патогенов и прогнозирования их распространения является создание единой ИАС, которая объединяет все необходимые данные и средства их анализа. Система должна базироваться на информационных и геоинформационных технологиях и обеспечивать открытый доступ к просмотру данных через сеть Интернет и включать следующие базовые компоненты:

- единое хранилище данных и средства загрузки/выгрузки данных;
- методы пространственного и временного анализа;
- отображение данных и результатов анализа.

Кроме того, эта технология должна позволять включать новые методы анализа данных.

Единое хранилище данных. В различных организациях и ведомствах имеются БД, содержащие информацию о заболеваниях, переносчиками которых являются иксодовые клещи, противоклещевых обработках территорий города, метеорологических условиях и пр. Все БД разрознены и не связаны между собой, что затрудняет их использование для определения опасности территорий и прогноза активности иксодовых клещей в зависимости от различных факторов.

Таким образом, в настоящее время возникла необходимость создания единого хранилища данных [8], позволяющего аккумулировать всю тематическую информацию, полученную из разнородных источников, с последующим предоставлением доступа к ней с помощью WEB-технологий всех заинтересованных лиц. Это позволит создать инфраструктуру, обеспе-

чивающую взаимодействие между всеми заинтересованными участниками информационного обмена. Система рассчитана на пополнение ее данных в режиме реального времени.

Необходима разработка инструментальных средств, позволяющих загружать информацию из различных источников. Инструментальные средства должны проводить нормализацию данных, т. е. приведение к структуре, удобной для пространственного анализа. В частности, ввиду того, что информация о местности, где человек подвергся укусу иксодового клеща, является достаточно неформальной (записывается со слов пострадавшего) и не имеет четких географических координат, требуется проведение геокодирования, заключающееся в выделении каких-либо ключевых участков города (а в последующем и территорий Иркутской области), подходящих под введенное определение. В связи с этим необходима разработка сервиса, обеспечивающего загрузку данных и автоматическое выполнение геокодирования. При этом часть данных, геокодирование которых в автоматическом режиме невозможно, будет либо отброшена, либо будет требовать ручной обработки (в зависимости от степени влияния на статистическую погрешность). Для решения данной задачи будут использованы разработанные авторами проекта инструментальные средства по обработке неструктурированных текстовых данных [13]. Разработка сервиса позволит реализовать механизмы интеграции нашей информации, содержащейся в БД [1, 2, 12], а также в БД других организаций, с единым хранилищем данных создаваемой ИАС.

Методы пространственного и временно-го анализа. Геокодирование данных о местах укусов иксодовыми клещами в совокупности с информацией о дате укусов станет основой динамических тематических карт. Сопоставление полученной информации с местностями и датами противоклещевых обработок обеспечит наглядное представление о распространении иксодовых клещей на территории города Иркутска и его окрестностей в разные периоды теплого времени года, а также о наличии клещей и степени опасности этих территорий в отношении риска заражения клещевыми инфекциями.

В рамках ИАС планируется создание сервисов анализа GRID-покрытий (данных на регулярной сетке). Целью работы данных сервисов является анализ регулярных данных (изображений, космоснимков и т. д.), сопоставление изученных ареалов обитания иксодовых клещей с особенностями рельефа и растительности [9]. В частности, планируется реализация сервисов

пространственной статистики (нахождение корреляции между различными компонентами, регрессионные модели).

Применение данных сервисов позволит использовать ИАС для качественного анализа больших объемов данных. Предполагается разработка открытой архитектуры распределенных вычислений для обработки информации, содержащейся в БД ИАС.

Отображение данных и результатов анализа. Для визуализации пространственных данных нами разработан оригинальный сервис, называемый SMDServer, который реализует поддержку стандарта OGC Web Map Server (WMS) [15]. Поддержка WMS позволяет использовать любой клиент визуализации пространственных данных, например, широко распространенный web-клиент OpenLayers или настольная ГИС MapInfo. Основным достоинством SMDServer является возможность работы с векторными данными большого объема на высокой скорости.

В настоящий момент наполнение хранилища данных и его последующее пополнение будут производиться из различных существующих источников, например, ландшафтно-географические характеристики, климатические данные, сведения по фауне, обилию клещей, случаям обращаемости населения с укусами клещей по конкретным территориям. Банк данных должен содержать информацию, необходимую специалистам для моделирования и прогноза распространения инфекций, передаваемых иксодовыми клещами, что на конечном этапе будет иметь не только социальный, но и экономический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, назрела необходимость создания ИАС с развитыми функциями ГИС-технологий и современными средствами анализа данных. С их помощью можно интегрировать имеющуюся информацию, представленную в различных форматах, и проводить ее анализ. Тематические (медико-географические) карты, формируемые в результате работы ИАС, позволят динамически отображать активность иксодовых клещей, ее изменение в течение времени и в зависимости от различных факторов.

Оригинальность предлагаемого сервиса заключается в комплексном подходе к формированию единой БД, развитию технологий удаленного доступа к информации в БД и геоинформационных технологий. Реализация идеи связана с развитием OLAP-, WEB- и геоинформационных технологий. Полученные прогнозы и модели

станут основой обеспечения экологической безопасности населения и принятия компетентных управленческих решений по профилактике инфекционных заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РФФИ: № 11-04-92221_Монг_а и 12-07-98005р_Сибирь_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Петрова И.В. и др. Информационно-справочная система «Пациенты, подвергшиеся укусу клеща, результаты лабораторных исследований их клещей и сывороток крови и меры профилактики» (ИСС «Клещи») // Электронный бюл. – Программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем. 2009. (1). 431–432.
2. Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Петрова И.В. и др. Информационно-справочная система «Пациенты, подвергшиеся укусу клеща, и результаты лабораторных исследований их сывороток крови» (ИСС «Антитела») // Электронный бюл. – Программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем. 2009. (1). 429.
3. Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Злобин В.И. и др. Иксодовые клещи юга Восточной Сибири и Монголии и их спонтанная зараженность возбудителями природно-очаговых трансмиссивных инфекций // Бюл. сиб. мед. 2006. 5. (Прил. 1). 137–143.
4. Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Злобин В.И. и др. Распространение иксодовых клещей и клещевых инфекций на приграничных Российско-Монгольских территориях // Вестн. Рос. Военно-мед. академии. 2008. (2, Ч. II). 586–587.
5. Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Шулунов С.С. и др. Фауна и экология иксодовых клещей Прибайкалья // Актуальные вопросы инвазионной и инфекционной патологии животных: мат. междунар. научн.-практ. конф. Бурятской СХА (27–29 июня 2008 г., Улан-Удэ). Улан-Удэ, 2008. 35–38.
6. Ляпунов А.В., Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А. и др. Риск заражения «клещевыми» инфекциями на территориях северных районов Предбайкалья // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2011. (5). 145–148.
7. Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А., Арбатская Е.В., Данчинова Г.А. Находка клеща *Amblyomma americanum* L., 1758 в Восточной Сибири (Россия) // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. (111). 99–101.
8. Ружников Г.М., Бычков И.В., Хмельнов А.Е. и др. Интеграция информационно-аналитических ресурсов и обработка пространственных данных в задачах управления территориальным развитием. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. 366 с.
9. Фёдоров Р.К., Шигаров А.О. Логико-синтаксический подход к распознаванию изображений с учетом пространственных ограничений // Современные технологии. Системный анализ. Моделирование. 2011. 29. (1). 56–59.
10. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А. Современные способы мониторинга вирусных патогенов и перспективы создания системы эколого-эпидемиологического мониторинга вирусов в окружающей среде // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2011. (5). 195–198.
11. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Unursai-khan U. и др. Характеристика вируса клещевого энцефалита, ставшего причиной летального исхода в Монголии // Вопр. вирусол. 2010. 55. (3). 27–32.
12. Хаснатинов М.А., Ляпунов А.В., Арбатская Е.В. и др. Информационно-аналитическая система «Иксодовые клещи, распространенные в Восточной Сибири, и их патогены» (ИАС «Полевые клещи») // Электронный бюл. – Программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем. 2011. (2). 672.
13. Шигаров А.О., Хмельнов А.Е., Фёдоров Р.К. Преобразование слабоструктурированной табличной информации к реляционному представлению // Всерос. конф. «Математическое моделирование и вычислительно-информационные технологии в междисциплинарных научных исследованиях»: тез. докл. Иркутск, 2011. 121–122.
14. Foley D.H., Wilkerson R.C., Birney I. et al. MosquitoMap and the Mal-area calculator: new web tools to relate mosquito species distribution with vector borne disease // Int. J. Health Geogr. 2010. 9. 11.
15. OGC Web Map Server (WMS). URL: <http://www.opengeospatial.org/standards/wms> (дата обращения 10.04.2012)
16. TickMap. URL: <http://www.tickmap.org/> (дата обращения 03.05.2012)
17. VectorMap. URL: <http://www.vectormap.org/> (дата обращения 03.05.2012)
18. КРОНАРОС. Кровососущие насекомые России. Информационная система. URL: <http://www.zin.ru/projects/kronaros/> (дата обращения 03.05.2012)

MODERN TECHNOLOGIES FOR INFORMATIONAL AND ANALYTICAL EVALUATION OF ACTIVITY AND FORECAST OF SPATIAL DISTRIBUTION OF IXODID TICKS BY THE EXAMPLE OF IRKUTSK CITY

**Gennadyi Mikhailovich RUZHNIKOV¹, Galina Anatolyevna DANCHINOVA²,
Roman Konstantinovich FEDOROV¹, Maksim Anatolyevich KHASNATINOV²,
Vyacheslav Vladimirovich PARAMONOV¹, Aleksandr Valeryevich LYAPUNOV²**

¹ *Institute for System Dynamics and Control Theory SB RAS
664033, Irkutsk, Lermontov str., 134*

² *Scientific center for family health and human reproduction problems SB RAMS
664033, Irkutsk, Timiryazev str., 16*

The materials on the importance of design of modern systems of evaluation of current state and prediction of future spread of invertebrate vectors of human vector-borne diseases are discussed. For effective monitoring it is advisable to design and produce the geoinformational technologies those will be available for all interested persons. At the first stage of technology development for the early detection of known and new pathogens it has been suggested to create the unified platform that would unite the massive of data and the analytical tools. The implementation of the idea is based on the development of WEB, GIS and OLAP technologies. The resulting models and forecasts will form the basis for environmental safety of population and will help to make informed management decisions for prevention of infectious diseases.

Key words: monitoring, Ixodic ticks, pathogenic microorganisms, informational and analytical evaluation, forecast, geoinformational technologies.

Ruzhnikov G.M. – candidate of technical sciences, deputy director, e-mail: ruznikov@icc.ru

Danchinova G.A. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of transmissible infections, e-mail: dan-chin@yandex.ru

Fedorov R.K. – candidate of technical sciences, senior researcher of the laboratory of integration systems, e-mail: fedorov@icc.ru

Khasnatinov M.A. – candidate of biological sciences, leading researcher of the laboratory of transmissible infections, e-mail: khasnatinov@yandex.ru

Paramonov V.V. – candidate of technical science, researcher of the laboratory of integration systems, e-mail: slv@icc.ru

Lyapunov A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of transmissible infections, e-mail: liapunov.asp@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЫСОКОПОЛИМЕРНОЙ РНК ИЗ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

Татьяна Витальевна ЯМКОВАЯ¹, Виталий Иванович ЯМКОВОЙ²,
Лев Евгеньевич ПАНИН³

¹ ООО «Виталанг»

630055, г. Новосибирск, ул. Рубиновая, 4–128

² ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный педагогический университет

630126, г. Новосибирск, ул. Виллюйская, 28

³ ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Разработан новый способ получения амфифильной высокополимерной РНК из сухих пекарских дрожжей. Основным эффектом удешевления и безотходности производства достигают путем использования в качестве литического агента пищевого детергента – олеиновой кислоты в концентрации 1–2 %. В сравнении с известными аналогами, характеризующимися применением высокотоксичного литического агента – 2-этилгексановой кислоты, предложенный способ не требует глубокой очистки конечного продукта. Внесение сухих дрожжей в крутой кипяток раствора литического агента без их предварительного замачивания позволяет подавить активность лизосомальных рибонуклеаз. Безотходность производства заключается в том, что одновременно с высокополимерной РНК получают концентрат кормового белка, низкомолекулярную РНК и природные олигорибонуклеотиды. Экспериментальная проверка противовирусной активности амфифильной высокополимерной РНК проведена на беспородных мышах, зараженных вирусом экстремелии. Показано, что внутримышечное введение препарата мышам в лечебной схеме вызывает выраженную защиту от 10 полужетательных доз (LD_{50}) вируса экстремелии, составляющую в зависимости от дозы от 28,6 до 47,6 %. Введение препарата в профилактической схеме приводит к более значительной защите мышей от инфицирования. Протективное действие препарата носит дозозависимый характер: максимальный эффект наблюдается при дозе 1,0 мг/кг массы тела, в этом случае количество выживших животных в профилактической схеме составляет 61,9 % (в контроле 19,1 %).

Ключевые слова: дрожжи, олеиновая кислота, высокополимерная РНК, вирус экстремелии, противовирусные свойства.

Дрожжевая РНК представляет собой смесь полирибонуклеотидов разных молекулярных масс и включает в себя мРНК, рРНК, тРНК, а также ряд минорных компонентов и, вероятно, фрагменты перечисленных соединений разной длины. Существует препарат высокополимерной дрожжевой РНК с фирменным названием «Полирибонат». Он биологически активен – например, является специфическим стимулятором биосинтеза белка в кроветворных и иммунокомпетентных органах [1]. Этот препарат обладает противовирусными свойствами, стимулирует гемопоэз, является иммуномодулятором и адъювантом; в последнее время широко используется в ветеринарии [2]. Натриевая соль

низкополимерной дрожжевой РНК – «Нуклеинат натрия» – давно применяется в медицине при лечении большого круга заболеваний [3]. Однако этот препарат вводится пациентам в граммовых количествах всегда перорально и механизм его действия включает, скорее всего, поставку мономеров для синтеза эндогенных нуклеиновых кислот [3]. Механизм действия высокополимерной дрожжевой РНК принципиально иной. Она гораздо менее токсична, чем низкополимерная, и вводится животным в миллиграммовых количествах путем внутривенных инъекций, что приводит к избирательной индукции синтеза некоторых белков, например, гемоглобина [4]. В качестве индук-

Ямкова Т.В. – к.б.н., e-mail: yam_tv@mail.ru

Ямковой В.И. – д.б.н., проф. кафедры химии, e-mail: vitalang2@mail.ru

Панин Л.Е. – д.м.н., проф., академик РАМН, директор

тора интерферона используется двуспиральная РНК – «Ридостин», получаемая из некоторых штаммов дрожжей [5]. Последние данные по медицинскому применению РНК приведены в работах [6, 7]. Мономеры РНК в виде нуклеозидов и 5'-мононуклеотидов имеют самостоятельное значение и могут служить исходными соединениями для синтеза олигонуклеотидов, нуклеозид-5'-трифосфатов и некоторых лекарственных препаратов [3]. В бывшем СССР годовое производство дрожжевой РНК измерялось тоннами [8]. В настоящее время в России РНК и препараты из нее вырабатываются в меньшем количестве. Что касается существующей технологии получения наиболее ценной с медицинской точки зрения высокополимерной РНК, то она далека от совершенства. Так, при получении «Полирибоната» используется редкий и высокотоксичный литический агент – 2-этилгексановая кислота, что требует глубокой очистки конечного продукта. Эта технология не экономична, многостадийна и практически не масштабируема.

Целью настоящего исследования является совершенствование способа выделения высокополимерной РНК: сокращение стадийности производства, снижение себестоимости конечного продукта, достижение безотходности и экологической чистоты производства и исследование противовирусных свойств полученной высокополимерной РНК.

Прототипом был выбран метод Дэвиса и Аллена, которые впервые для высаливания РНК из раствора применили NaCl [9]. В качестве объекта противовирусных испытаний был выбран вирус оспы мышей (экстремелии).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе были использованы сухие пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*, Новосибирский дрожжевой завод) с содержанием влаги ~7,4 %, олеиновая кислота (ЗАО «Купавнареактив», марки «ч»), NaCl (ФГУП комбината «СИБСОЛЬ», г. Усолье-Сибирское), 96%-й этанол (ОАО «Спиртовый комбинат», г. Мариинск), додецилсульфат натрия (ДДС-Na) хроматографически чистый (НПФ «ДИА-ФАРМ», г. Белгород), сефароза 4В («Pharmacia», Швеция), контрольный образец высокополимерной дрожжевой РНК с молекулярным распределением 100–500 нуклеотидов, полученный из НИКТИ БАН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Бердск); NaOH, HCl, трихлоруксусная (ТХУ) и гексановая кислоты марки «ч» отечественного производства. Для

приготовления растворов использовали дистиллированную воду.

Оптическую плотность растворов в ультрафиолетовой области спектра измеряли в 1 см прямоугольных кварцевых кюветках на спектрофотометре СФ-26 (ЛОМО, Россия).

Содержание кислоторастворимой фракции (КРФ) в РНК определяли модифицированным методом [10]. Для этого 2 мл водного раствора РНК с концентрацией ~60 D₂₆₀, ед./мл вносили в центрифужную пробирку на 10 мл, добавляли туда же 2 мл 10%-го раствора ТХУ, компоненты в пробирке перемешивали и ставили в ледяную баню на 30 мин, затем центрифугировали (3000 g, 5 мин, температура комнатная). Содержание КРФ в супернатанте определяли по его оптической плотности при 260 нм. Гиперхромный эффект не учитывали.

Прирост КРФ определяли, измеряя содержание ее в водном растворе РНК с концентрацией ~ 60 D₂₆₀, ед./мл до и после инкубации в течение 24 ч при температуре 20–25 °С.

Гель-фильтрацию РНК на сефарозе 4В проводили по методу [10].

Выделение РНК и концентрата кормового белка из пекарских дрожжей. Экстракция РНК. 300 г сухих пекарских дрожжей суспендировали порциями (первые порции по щепотке, первые 2–3 щепотки за несколько секунд до закипания) в течение 3–6 мин в 5 л высокой кастрюле в 3 л кипящей дистиллированной воды, содержащей 20 мл 2,5 М NaOH, оттитрованного 50,3 мл олеиновой кислоты. Температура суспензии не опускалась ниже 98 °С. Суспензию кипятили 40 мин при 98–100 °С, периодически перемешивая. Через 10, 20 и 30 мин после суспендирования последней порции дрожжей в кипящую суспензию добавляли 3 раза по 10 мл 2,5 М NaOH. По окончании экстракции кастрюлю ставили в раковину, суспензию охлаждали до 20–30 °С в 3 сменах холодной воды в течение ~20 мин и затем центрифугировали на центрифуге S70D фирмы «Janetzki», Германия (3000–3200 g, 10 мин, температура комнатная).

Сбор концентрата кормового белка и высаливание высокополимерной РНК хлористым натрием. Супернатант (~1,7 л) сливали в стеклянную емкость на 3 л, а плотный осадок дрожжевого шлама, собирающийся на дне центрифужных стаканов и содержащий до 70 % денатурированного белка, собирали и сушили открытым способом при 58–62 °С. В супернатант добавляли 351 г NaCl и свежую дистиллированную воду до 2 л. Суспензию интенсивно перемешивали до полного растворения соли и

оставляли при комнатной температуре на 20–24 ч для формирования осадка.

Промывка высолённой высокополимерной РНК 3 М раствором NaCl и 96%-м этанолом. Высолённый осадок-шрот, содержащий высокополимерную РНК, отделяли от супернатанта центрифугированием (3000–3200 g, 20 мин, температура комнатная). Супернатант (~2 л) осторожно декантировали (осадок скользкий и держится слабо), осадок-шрот промывали 2 порциями по 0,6 л 3 М раствора NaCl и 5 порциями по 150 мл 96%-го этанола; при этом шрот диспергировали стеклянной палочкой в 3 М растворе NaCl минимум 10 мин, а в 96%-м этаноле минимум 5 мин, затем осаждали центрифугированием (3000–3200 g, 20 мин в случае 3 М раствора NaCl и 2 мин в случае этанола, температура комнатная). При промывке шрота 3 М раствором NaCl супернатант удаляли водоструйным насосом или грушей, так как на этой стадии осадок-шрот еще очень скользкий и при простой декантации «плывет». Серый рыхлый надосадочный гель удаляли по возможности тоже. Промытый шрот сушили на воздухе в течение 2–3 сут до отсутствия запаха спирта.

Регенерация этанола и осаждение из отходов 3 М раствора NaCl низкополимерной РНК соляной кислотой. Отработанный спирт регенерировали двойной перегонкой (возврат 80–90 %). Содержащуюся же в супернатанте (~2 л) после выделения высокополимерной РНК низкополимерную РНК осаждали добавлением 4 мл концентрированной HCl. Сформировавшийся в течение 2 сут при комнатной температуре осадок низкополимерной РНК осаждали центрифугированием (3000–3200 g, 10 мин, температура комнатная), промывали 2 порциями по 200 мл 96%-го этанола и сушили на воздухе при комнатной температуре до отсутствия запаха HCl.

Выделение из сухого шрота чистой высокополимерной РНК. Чистую высокополимерную РНК выделяли по мере необходимости из сухого шрота экстракцией дистиллированной водой (время экстракции 1–2 ч при периодическом перемешивании). Экстракт осветляли центрифугированием (3000–3200 g, 10 мин, температура комнатная), разливали в вials по 1,5 мл (30 мг РНК), замораживали и лиофилизировали. Далее вials закупоривали резиновыми пробками и завальцовывали алюминиевыми колпачками, после чего прогревали их в суховоздушном сушильном шкафу при 110 °C в течение 1 ч. Получался готовый к биологическим и доклиническим испытаниям стерильный препарат (предполагаемое рыночное название – Виталанг-2).

Животные. Для анализа биологической активности полученного препарата использовали здоровых половозрелых животных – беспородных белых мышей обоего пола массой 14–16 г, полученных из питомника лабораторных животных ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Все эксперименты проводились в соответствии с [11].

В эксперименте было использовано 168 мышей, из них 126 животных – в опыте (18 групп по 7 мышей в группе) и 42 – в контроле (6 групп по 7 мышей в группе).

Животных заражали вирусом экстремелии, штамм K-1, полученным из отдела коллекции микроорганизмов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» и наработанным на перевиваемой клеточной линии Vero (клетки почки зеленой мартышки) с титром $9,33 \times 10^5$ БОЕ/мл.

Препарат Виталанг-2 в день проведения эксперимента растворяли в стерильном физиологическом растворе (ФР), встряхивая 15–30 мин.

Испытание противовирусной активности препарата Виталанг-2 в отношении вируса экстремелии (профилактическая схема). Препарат Виталанг-2 вводили мышам внутримышечно трехкратно в течение дня с интервалом в 4 ч (11.00, 15.00 и 19.00) в суммарной дозе 0,1 мг на 1 кг массы тела животного (3 группы по 7 мышей в каждой), 0,5 мг/кг (3 группы по 7 мышей в каждой) и 1,0 мг/кг (3 группы по 7 мышей в каждой) в объеме 200 мкл за одно введение. В качестве отрицательного контроля использовали 3 группы по 7 мышей, которым внутримышечно вводили ФР в объеме 200 мкл за одно введение три раза в течение дня в те же сроки, что и в опыте. Через 1 ч после третьего введения всех препаратов (20.00) животных заражали интраназально под эфирным наркозом летальной дозой (10 LD₅₀, содержащих 2,57 lg БОЕ) вируса экстремелии в объеме 40 мкл/мышь. Гибель животных учитывали ежедневно в течение последующих 16 дней, оценивали процент гибели, коэффициент защиты и среднюю продолжительность жизни. За максимальную величину продолжительности жизни выживших животных принимали 16 сут, т. е. следующий день после прекращения гибели инфицированных мышей. Коэффициент защиты рассчитывали по формуле: % гибели в контроле – % гибели в опыте (табл. 1).

Испытание противовирусной активности препарата Виталанг-2 в отношении вируса экстремелии (лечебная схема). Мышей опытных и контрольных групп инфицировали интраназально под эфирным наркозом летальной дозой (10 LD₅₀, содержащих 2,57 lg БОЕ) вируса экстремелии в объеме 40 мкл на 1 мышь (10.00). Че-

Таблица 1

Изучение выживаемости в экспериментальных группах белых беспородных мышей, получавших Виталанг-2, при заражении вирусом экстремелии К-1 в дозе 10 ЛД₅₀ (профилактическая схема)

Группа мышей	Количество погибших мышей по суткам после заражения вирусом экстремелии (количество; % оставшихся в живых)																Число и % выжив- ших	Число и % пав- ших	СПЖ (сут)	КЗ
	1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	6 сут	7 сут	8 сут	9 сут	10 сут	11 сут	12 сут	13 сут	14 сут	15 сут	16 сут				
Виталанг-2 0,1 мг/кг; n = 21	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	3 (18; 100%)	6 (12; 57,1%)	0 (12; 57,1%)	0 (12; 57,1%)	2 (10; 47,6%)	0 (10; 47,6%)	1 (9; 42,9%)	0 (9; 42,9%)	0 (9; 42,9%)	9; 42,9%	12; 57,1%	12,38 ± 0,16	23,8%
Виталанг-2 0,5 мг/кг; n = 21	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	2 (19; 100%)	0 (19; 90,5%)	2 (17; 80,9%)	0 (17; 80,9%)	4 (13; 61,9%)	0 (13; 61,9%)	2 (11; 52,4%)	0 (11; 52,4%)	0 (11; 52,4%)	11; 52,4%	10; 47,6%	13,71 ± 0,58*	33,3%
Виталанг-2 1,0 мг/кг; n = 21	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	3 (18; 100%)	3 (15; 71,4%)	0 (15; 71,4%)	0 (15; 71,4%)	0 (15; 71,4%)	0 (15; 71,4%)	2 (13; 61,9%)	0 (13; 61,9%)	0 (13; 61,9%)	13; 61,9%	8; 38,1%	13,67 ± 0,22*	42,8%
Контроль, n = 21	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	3 (18; 100%)	2 (16; 76,2%)	0 (16; 76,2%)	0 (16; 76,2%)	2 (14; 66,7%)	0 (14; 66,7%)	10 (4; 19,1%)	0 (4; 19,1%)	0 (4; 19,1%)	4; 19,1%	17; 80,9%	12,76 ± 0,22	

Примечание. Здесь и в табл. 2 СПЖ – средняя продолжительность жизни, $M \pm m$; КЗ (коэффициент защиты) = % гибели животных в контроле (без препарата) – % гибели (животных) в опыте (с препаратом); * – отличие от величины СПЖ в контроле статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 2

Изучение выживаемости в экспериментальных группах белых беспородных мышей, получавших Виталанг-2, при заражении вирусом экстремелии К-1 в дозе 10 ЛД₅₀ (лечебная схема)

Группа мышей	Количество погибших мышей по суткам после заражения вирусом экстремелии (количество; % оставшихся в живых)																Число и % выжив- ших	Число и % пав- ших	СПЖ (сут)	КЗ
	1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	6 сут	7 сут	8 сут	9 сут	10 сут	11 сут	12 сут	13 сут	14 сут	15 сут	16 сут				
Виталанг-2 0,1 мг/кг, n = 21	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	2 (19; 90,5%)	0 (19; 90,5%)	5 (14; 66,7%)	3 (11; 52,4%)	0 (11; 52,4%)	2 (9; 42,9%)	0 (9; 42,9%)	3 (6; 28,6%)	0 (6; 28,6%)	0 (6; 28,6%)	6; 28,6%	15; 71,4%	11,95 ± 1,43	9,5%
Виталанг-2 0,5 мг/кг, n = 21	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	7 (14; 66,7%)	3 (11; 52,4%)	0 (11; 52,4%)	1 (10; 47,6%)	0 (10; 47,6%)	0 (10; 47,6%)	2 (8; 38,1%)	0 (8; 38,1%)	8; 38,1%	13; 61,9%	12,52 ± 0,58*	19,0%
Виталанг-2 1,0 мг/кг, n = 21	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	6 (15; 71,4%)	2 (13; 61,9%)	0 (13; 61,9%)	0 (13; 61,9%)	3 (10; 47,6%)	0 (10; 47,6%)	0 (10; 47,6%)	0 (10; 47,6%)	0 (10; 47,6%)	10; 47,6%	11; 52,4%	12,47 ± 0,41*	28,5%
Контроль, n = 21	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	0 (21; 100%)	5 (17; 80,9%)	4 (13; 61,9%)	6 (7; 33,3%)	0 (7; 33,3%)	3 (4; 19,1%)	0 (4; 19,1%)	0 (4; 19,1%)	0 (4; 19,1%)	0 (4; 19,1%)	4; 19,1%	17; 80,9%	10,86 ± 0,49	

рез 1 ч (11.00) животным вводили препарат Виталанг-2 внутримышечно и затем еще дважды в течение дня с интервалом в 4 ч (15.00 и 19.00) в суммарной дозе 0,1 мг на 1 кг массы тела животного (3 группы по 7 мышей в каждой), 0,5 мг/кг (3 группы по 7 мышей в каждой) и 1,0 мг/кг (3 группы по 7 мышей в каждой) в объеме 200 мкл за одно введение. В качестве отрицательного контроля использовали 3 группы по 7 инфицированных мышей, которым через 1 ч внутримышечно вводили ФР в объеме 200 мкл за одно введение и затем еще дважды в течение дня с интервалом в 4 ч (15.00 и 19.00) в том же объеме. Гибель животных учитывали ежедневно в течение последующих 16 дней, оценивали процент гибели, коэффициент защиты и среднюю продолжительность жизни (табл. 2).

Испытания противовирусной активности препарата Виталанг-2 в отношении вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) (профилактическая схема). Препарат Виталанг-2 вводили мышам внутримышечно трехкратно в течение дня с интервалом в 4 ч (11.00, 15.00 и 19.00) в суммарной дозе 0,1 мг на 1 кг массы тела животного (3 группы по 7 мышей в каждой), 0,5 мг/кг (3 группы по 7 мышей в каждой), 1,0 мг/кг (3 группы по 7 мышей в каждой) в объеме 200 мкл за одно введение. В качестве положительного контроля использовали 3 группы по 7 мышей, которым один раз в день в течение 5 дней перорально вводили противогриппозный препарат озельтамивир (Тамифлю) в дозе 5 мг на 1 кг массы тела мыши в объеме 200 мкл за одно введение. В качестве отрицательного контроля использовали 3 группы по 7 мышей, которым внутримышечно вводили физиологический раствор в объеме 200 мкл за одно введение три раза в течение дня в те же сроки, что и в опыте. Через 1 ч после третьего введения всех препаратов животных заражали интраназально под эфирным наркозом летальной дозой (10 LD₅₀, содержащих 1,49 lg ТЦД₅₀) вируса гриппа птиц A/H5N1 в объеме 40 мкл/мышь. Гибель животных учитывали ежедневно в течение последующих 16 дней, оценивали процент гибели, коэффициент защиты и среднюю продолжительность жизни.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0», используя *t*-критерий Стьюдента, а также *U*-критерий Манна–Уитни. Достоверность различий средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при $p \leq 0,05$.

При проведении статистической обработки результатов исследования для количественных

показателей вычисляли среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$, различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента; при анализе качественных показателей использовали точный критерий Фишера; достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее дешевым и доступным сырьем для промышленного выделения высокополимерной РНК являются дрожжи. Самые продуктивные из них – сухие пекарские (табл. 3). Принципиальным моментом при работе с дрожжами является выбор поверхностно-активного вещества (ПАВ) для лизиса их хитиновых клеточных стенок. Крестфилд и соавт. использовали с этой целью ДДС-На [12]. Однако выделенная с его помощью высокополимерная РНК содержит примесные высокомолекулярные ассоциаты РНК с белками и полисахаридами [10], которые сильно искажают биологические свойства РНК [4]. Альтернативой ДДС-На могут служить щелочные соли жирных кислот. При получении высокополимерной РНК – «Полирибоната» – в качестве лизирующего агента была использована 2-этилгексановая кислота. Как ветеринарный противовирусный препарат, «Полирибонат»

Таблица 3

Относительный выход высокополимерной РНК из разных дрожжей

Дрожжи	Относительный выход, %
Сухие пекарские дрожжи (Новосибирский дрожжевой завод, ГОСТ 28483-90)	100,0
Прессованные пекарские дрожжи (Новосибирский дрожжевой завод, ТУ 9182-001-00367108-04)	55,6
Прессованные пекарские дрожжи (Новосибирский дрожжевой завод, ГОСТ 171-81)	29,1
Кормовая смесь «СКД-плюс» (Мариинский спиртовой комбинат, ТУ 9296-061-00334586-2003)	< 0,4
Отработанные пивные дрожжи (ОАО «Родник», г. Новосибирск)	43,0
Отработанные пивные дрожжи (ООО «Тинькофф», г. Новосибирск)	36,9
Отработанные пивные дрожжи (ООО «Петрович», г. Ставрополь)	18,7
Отработанные пивные дрожжи (Завод «Балтика», г. Новосибирск)	< 3,4

Таблица 4

Относительный выход высокополимерной РНК из пекарских дрожжей при использовании для их лизиса различных детергентов

Детергент	Относительный выход, %
Олеиновая кислота	100,0
ДДС-Na	99,6
Гексановая кислота	21,5

вполне заслуженно занял соответствующий сегмент рынка. Однако для медицинских целей клетки дрожжей желательно лизировать пищевой жирной кислотой. Мы выбрали для этого незаменимый продукт питания – олеиновую кислоту. С ней легче работать, чем с гидрофобными насыщенными жирными кислотами. При ее использовании достигается максимальный выход целевого продукта (табл. 4). Кроме того, олеиновая кислота производится в промышленных масштабах, доступна и стоит недорого.

Для экстракции РНК мы предприняли попытку определить оптимальную концентрацию ПАВ. По экономическим причинам она не должна быть большой. Однако меньше критической точки мицеллообразования добавлять ПАВ тоже нецелесообразно. Принимая во внимание эти требования, в настоящей работе концентрацию олеиновой кислоты при лизисе дрожжей варьировали от 0,75 до 3,8 %. В контрольном эксперименте кипятили дрожжи в дистиллированной воде. Как видно из табл. 5, лизис дрожжей с использованием олеиновой кислоты следует проводить при ее начальной концентрации 1,5 %. Без ПАВ выход высокополимерной РНК ничтожно мал. Оптимальное время экстракции РНК из клеток дрожжей олеиновой кислотой было определено нами в кинетическом эксперименте (рис. 1). Как видно из рисунка, оно равно 40 мин, т. е. совпадает с таковым для ДДС-Na [10].

Следующей процедурой, требующей оптимизации, была очистка перешедшей в раствор РНК от фрагментов разрушенных клеток дрожжей. Одним из способов разделения таких суспензий, широко применяемых на практике, является седиментация. Мы варьировали условия осаждения при седиментации лизата дрожжей от 1000 до 17000 г и нашли, что 3000 г вполне достаточно для образования плотного осадка дрожжевого шлама и количественного отделения от него экстракта РНК. Хороший результат может быть получен также путем простого от-

Таблица 5

Зависимость выхода высокополимерной РНК от концентрации использованной для лизиса дрожжей олеиновой кислоты

Концентрация олеиновой кислоты, %	0	0,75	1,5	2,5	3,8
Относительный выход высокополимерной РНК, %	0,97	79,7	100,0	86,8	83,3

стаивания, но в этом случае время седиментации следует увеличить с 10 мин до 1 сут.

Что касается высаливания высокополимерной РНК из экстракта хлористым натрием и промывки осадка-шрота 3 М раствором NaCl и этанолом, то при выполнении этих процедур мы использовали лучшие методические находки способа [4]. В частности, все операции проводили при комнатной температуре. Заменили только отстаивание на низкоскоростное центрифугирование.

Готовый к биологическим и доклиническим испытаниям препарат Виталанг-2 получали стерилизацией путем прогрева в сухо-воздушном сушильном шкафу в течение 1 ч при 110 °С. При снижении температуры ниже 100 °С и времени прогрева менее 50 мин стерильность не достигалась, а при увеличении температуры выше 120 °С и времени прогрева более 70 мин начиналась дегградация РНК. Альтернативный способ стерилизации полученной в настоящей работе высокополимерной РНК был разработан нами потому, что через

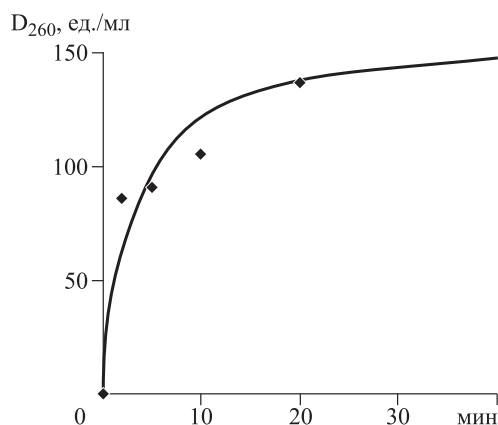


Рис. 1. Кинетика экстракции РНК из клеток пекарских дрожжей (температура +100 °С, концентрация олеиновой кислоты 1,5 %). По оси ординат – концентрация РНК, перешедшей из клеток в раствор

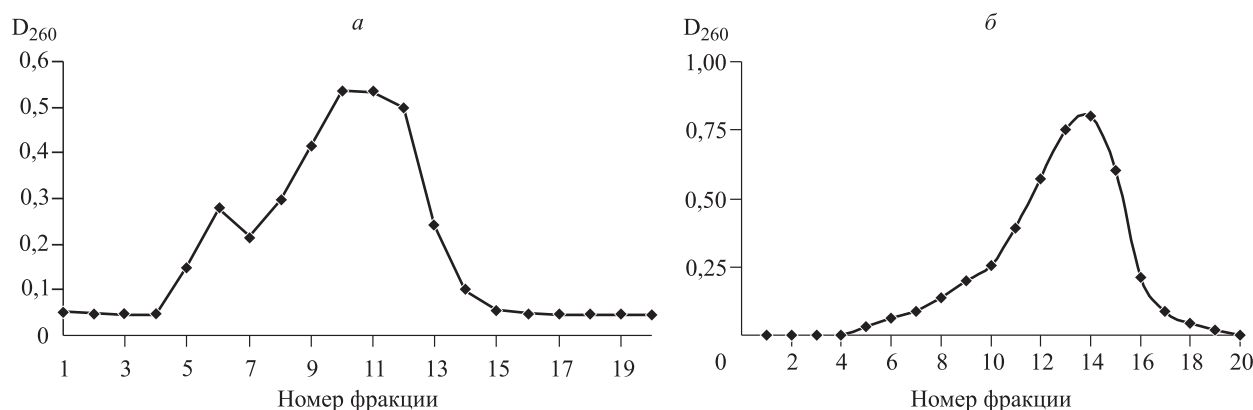


Рис. 2. Гель-хроматография в одинаковых условиях на Сефарозе 4В: а – образца высокополимерной РНК, выделенного из пекарских дрожжей предлагаемым способом, б – контрольного образца высокополимерной дрожжевой РНК с молекулярным распределением 100–500 нуклеотидов

стерилизующие мембраны ее вязкий раствор не проходит. Как видно из рис. 2, это связано с тем, что молекулярная масса нашей высокополимерной РНК значительно превышает такую контрольного образца высокополимерной дрожжевой РНК с молекулярным распределением 100–500 нуклеотидов.

Основные характеристики 6 образцов препарата Виталанг-2, приготовленных для доклинических испытаний, приведены в табл. 6. Здесь же следует отметить, что препарат Виталанг-2 обладает амфифильными свойствами: растворимость в воде – удовлетворительная (если относительно гидрофильный Полирибонат растворяется в воде в течение нескольких секунд, то наш амфифильный препарат – только через 15–120 мин при периодическом перемешивании), водный раствор мылкий, нерастворенные крупинки скользкие. Для сравнения, согласно ТУ 9291-002-44040845-2004 для Полирибоната сорта А: весовая экстинкция, D_{260} , ед./мг ≥ 16 ; содержание КРФ, % ≤ 3 ; спектральные отноше-

ния: D_{230}/D_{260} – данных нет; D_{250}/D_{260} – 0,86–0,95; D_{280}/D_{260} – 0,44–0,50. Для Полирибоната сорта В весовая экстинкция, D_{260} , ед./мг ≥ 14 .

Выход из 300 г сухих дрожжей ценного сопутствующего продукта – концентрата кормового белка с примесью олеиновой кислоты – 250–270 г, низкополимерной РНК – до 2,4 г. Последняя в 3 М NaCl при комнатной температуре находится в растворе, из которого мы осаждали ее соляной кислотой (табл. 7).

Полученный в настоящей работе с помощью олеиновой кислоты препарат высокополимерной дрожжевой РНК биологически активен и малотоксичен ($LD_{50} > 2$ г/кг). Его противовирусные свойства подтверждены патентом [13] и экспериментами с вирусом эктромелии.

В связи с тем что в настоящее время нет ни одного коммерческого противовирусного препарата в отношении поксвирусов, в данных экспериментах не было использовано положительно-го контроля, а в качестве отрицательного контроля использовали ФР. Достоверное преиму-

Таблица 6

Результаты 6 стандартных выделений с помощью олеиновой кислоты высокополимерной РНК из пекарских дрожжей

№ опыта	Выход высокополимерной РНК, г	Весовая экстинкция, D_{260} , ед./мг	Содержание КРФ, %	Прирост КРФ, %	Спектральные отношения		
					D_{230}/D_{260}	D_{250}/D_{260}	D_{280}/D_{260}
1	8,6	17,7	2,33	0,16	0,39	0,89	0,49
2	8,2	17,6	2,32	0,11	0,41	0,91	0,51
3	8,1	18,2	2,20	0,12	0,40	0,91	0,52
4	8,5	18,3	2,25	0,12	0,41	0,90	0,52
5	9,3	17,9	2,21	0,11	0,40	0,90	0,51
6	8,9	17,0	2,33	0,12	0,41	0,91	0,51
Среднее	$8,6 \pm 0,7$	$17,8 \pm 0,8$	$2,27 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02$

Примечание. В эксперимент брали по 300 г сухой биомассы дрожжей.

Таблица 7

Зависимость выхода низкополимерной РНК от количества концентрированной соляной кислоты, добавленной к 2 л ее раствора в 3 М NaCl

Количество добавленной HCl, мл	2	4	8	20	40	80
Относительный выход низкополимерной РНК, %	20,2	100	64,3	18,2	13,3	7,3

щество по количеству выживших животных по сравнению с контролем (19,1 % при профилактической и лечебной схемах) наблюдалось как в группах, получавших Виталанг-2 до заражения, так и в группах, получавших этот препарат после заражения мышей летальной дозой (10 LD₅₀) вируса экстремелии. В данных экспериментах защитный эффект зависел от дозы Виталанг-2 (количество выживших мышей составило 28,6, 38,1 и 47,6 % при использовании лечебной схемы и 42,9, 52,4 и 61,9 % при использовании профилактической схемы при дозах препарата 0,1; 0,5 и 1,0 мг на 1 кг массы тела животного соответственно). Средняя продолжительность жизни при заражении мышей 10 LD₅₀ вирусом экстремелии во всех группах, получавших Виталанг-2 до и после заражения, за исключением одной группы (при дозе препарата 0,1 мг/кг в профилактической схеме), была достоверно выше, чем в контроле (см. табл. 1, 2).

При инфицировании мышей вирусом гриппа птиц (10 LD₅₀) было обнаружено достоверное повышение количества выживших мышей в экспериментальной группе (введение Виталанг-2) по сравнению с контролем (введение ФР). При этом наблюдалась четкая зависимость количества выживших животных от дозы препарата. Следует отметить, что использование в этих экспериментах максимальной из исследованных доз – 1 мг на 1 кг массы тела (суммарная доза 20 мкг на 1 мышь) приводило к защите животных от гриппозной инфекции. Аналогичный эффект при использовании у зараженных мышей коммерческого препарата озельтамвира (Тамифлю) получили при суммарной его дозе на мышь в 25 раз большей (500 мкг на 1 мышь).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный в настоящей работе новый способ получения амфифильной высокополимерной РНК позволяет упростить известные технологии получения высокополимерной РНК, достигнуть масштабируемости производства, его экологической чистоты и безотходности, поскольку предполагает работу при комнатной температуре, использование низкоскоростных центрифуг без охлаждения, а также крупнотон-

нажного и дешевого литического агента – олеиновой кислоты, являющейся к тому же незаменимым продуктом питания. Данный способ защищен патентами на изобретение РФ [14, 15].

Показано, что полученная согласно представленному способу амфифильная высокополимерная РНК (возможное коммерческое название – препарат Виталанг-2) является эффективным средством против вирусов гриппа и оспы и после проведения соответствующих доклинических и клинических испытаний может быть рекомендована для профилактики и лечения заболеваний, вызванных ими. Предварительные экспериментальные исследования показали, что терапевтическая доза – 1 мг/кг массы тела животного или человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Государственный контракт № 5669р/8332 от 31.03.2008) и Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт №16.512.11.2018 от 11.02.2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пат. 2045270 РФ. Специфический стимулятор биосинтеза белка в кроветворных и иммунокомпетентных органах / А.В. Харьковский, Л.Е. Панин; опубл. 10.10.95.
2. Соколов В.Д., Андреева Н.Л., Соколов А.В. Иммуностимуляторы в ветеринарии // Ветеринария. 1992. (7–8). 49–50.
3. Земсков В.М., Лидак М.Ю., Земсков А.М., Микстайс У.Я. Низкомолекулярная РНК: получение, гидролиз и применение в медицине. Рига: Зинатне, 1985. 191 с.
4. Ямковая Т.В., Ямковой В.И., Панин Л.Е. Биологическая активность разных препаратов РНК из пекарских дрожжей // Бюл. СО РАМН. 2006. (3). 117–121.
5. Кнорроз М.Ю., Попова О.М., Давыдова А.А. и др. Сравнительное изучение противовирусной активности природных двуспиральных РНК при экспериментальном клещевом энцефалите // Вopr. вирусол. 1985. 30. (6). 697–700.
6. RNA towards medicine. Series: handbook of experimental pharmacology. Vol. 173 / Eds. V.A. Erd-

mann, J. Brosius, J. Barciszewski. N.Y.: Springer-Verlag, 2006. XII. 464 p.

7. Redis R.S., Berindan-Neagoe I., Pop V.I., Calin G.A. Non-coding RNAs as theranostics in human cancers // J. Cell. Biochem. 2012. 113. (5). 1451–1459.

8. Крылов И.А., Маркина Н.С., Красноштанова А.А. и др. Выбор оптимальной схемы получения дрожжевой РНК в условиях современных биохимзаводов БВК и лизина // Биотехнология. 1992. (2). 81–83.

9. Davis F.F., Allen F.W. Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide // J. Biol. Chem. 1957. 227. (2). 907–915.

10. Ямковая Т.В., Хомов В.В., Загребельный С.Н., Ямковой В.И. Выделение суммарной РНК из пекарских дрожжей // Прикл. биохимия микробиол. 2006. 42. (1). 93–97.

11. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Страсбург, 1986.

12. Crestfield A.M., Smith K.S., Allen F.W. The preparation and characterization of ribonucleic acids from yeast // J. Biol. Chem. 1955. 216. (1). 185–193.

13. Пат. 2436583 РФ. Противовирусное средство / Т.В. Ямковая, С.Н. Загребельный, Л.Е. Панин, В.И. Ямковой; опубл. 20.12.2011.

14. Пат. 2392329 РФ. Способ получения высокополимерной РНК из дрожжей / Т.В. Ямковая, Е.В. Кузовкова, Ю.П. Железнова и др.; опубл. 20.06.2010.

15. Пат. 2403288 РФ. Способ получения высокополимерной РНК из сухих пекарских дрожжей / Т.В. Ямковая, С.Н. Загребельный, Л.Е. Панин, В.И. Ямковой; опубл. 10.11.2010.

ISOLATION AND ANALYSIS OF HIGH-POLYMER RNA BIOLOGICAL ACTIVITY FROM BAKER'S YEAST

Tat'yana Vital'yevna YAMKOVAYA¹, Vitaliy Ivanovich YAMKOVY², Lev Evgen'yevich PANIN³

¹ LLC «Vitalang»

630055, Novosibirsk, Rubinovaya str., 4–128

² Novosibirsk State Pedagogical University

630126, Novosibirsk, Viluykaya str., 28

³ Scientific Research Institute of Biochemistry SB RAMS

630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

A new method for an amphiphilic high-polymer RNA producing from dry baker's yeast is elaborated. The main effect of cheapening and non-waste production is achieved by use of oleic acid (food detergent) as lytic agent at the concentration of 1–2 %. In comparison with known analogues, characterized by the use of 2-ethylhexanoic acid as highly lytic agent, the proposed method does not require a deep cleaning of the final product. The introduction of dry yeast in a cool boiling solution of the lytic agent, without their preliminary soaking can suppress the activity of lysosomal ribonucleases. Non-waste production is that together with the high-polymer RNA, a concentrate feed protein, low molecular weight RNA and natural oligoribonucleotides can be obtained. Experimental verification of the antiviral activity of amphiphilic high-polymer RNA is performed on outbred mice infected with ectromelia virus. It is shown that intramuscular administration of therapeutic doses of preparation to mice causes marked protection from 10 semi-lethal dose (LD50) of ectromelia virus that ranges from 28.6 to 47.6 % depending on the dose. Introduction of preventive doses of preparation leads to greater protection of mice against infection. The protective effect of the preparation has dose-dependent character: the most significant effect is observed at the dose of 1,0 mg/kg of body weight: in this case 61.9 % of animals are survives in experiment, 19.1 % – in control group.

Key words: yeast, oleic acid, high-polymeric RNA, ectromelia virus, antiviral properties.

Yamkovaya T.V. – candidate of biological sciences, e-mail: yam_tv@mail.ru

Yamkovoy V.I. – doctor of biological sciences, professor of the chair for chemistry, e-mail: vitalang2@mail.ru

Panin L.E. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, director

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ ПРИ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

Геннадий Сергеевич ШИШКИН, Нина Витальевна УСТЮЖАНИНОВА,
Валентина Владимировна ГУЛЬТЯЕВА

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

У здоровых молодых рабочих, проживающих в Западной Сибири, проанализированы корреляционные связи показателей внешнего дыхания и определена функциональная организация системы внешнего дыхания в покое и при физической нагрузке. Установлено, что при нагрузке регуляция вентиляции легких переходит на кислородный контур, независимо от исходных параметров внешнего дыхания. Показано, что в обеспечении кислородного запроса эффективность вентиляции играет роль только при легкой физической нагрузке. При умеренной нагрузке, по мере нарастания частоты дыхания, значение коэффициента использования кислорода сводится к нулю и подключается структурный компонент диффузии. Увеличение остаточного объема легких отражает включение в вентиляцию и газообмен резервной ткани респираторных отделов легких и соответствующее повышение диффузионной способности в результате увеличения общей респираторной поверхности. Такую функциональную организацию системы внешнего дыхания можно условно назвать «нагрузочной». В ней сочетаются усиление работы вентиляционной цепочки и мобилизация резервной ткани респираторных отделов легких.

Ключевые слова: система внешнего дыхания, физическая нагрузка, функциональная организация.

В литературе имеются сообщения о том, что при физической нагрузке увеличение кислородного запроса организма, кроме интенсификации вентиляционного ответа, вызывает повышение диффузионной способности легких, которая при тяжелых нагрузках может возрастать в 2–4 раза [1, 2]. Это объясняют снижением диффузионного сопротивления альвеолярно-капиллярной мембраны в результате увеличения газообменной поверхности альвеол из-за сильного растяжения легких на вдохе.

Известно, что диффузионная способность легких пропорциональна альвеолярному объему и его респираторной поверхности легких [3–5]. Однако возникает вопрос о том, достаточно ли для столь большого повышения диффузионной способности при физической нагрузке увеличения объема легких только во время вдоха, т. е. по существу только увеличения емкости вдоха. Расчеты, выполненные нами ранее на основе морфометрической модели E.R. Weibel [6], показали, что при увеличении общей респираторной поверхности основных функциональных микроструктур легочных ацинусов (альвеол и альвеолярных ходов) на 10–15 % объем воз-

духа в респираторных отделах должен быть больше на 20–30 % [7]. Однако даже у тренированных спортсменов разной специализации емкость вдоха при субмаксимальных нагрузках возрастает всего на 5–16 % [8]. Поэтому значительное повышение диффузионной способности легких только за счет их растяжения на вдохе представляется недостижимым. Для разрешения этого несоответствия необходимо проанализировать при физической нагрузке изменения в целом всей функциональной организации системы внешнего дыхания.

Целью данной работы было изучение функциональной организации системы внешнего дыхания в покое и при физической нагрузке у здоровых молодых мужчин, проживающих в Западной Сибири.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены в летнее время у 21 здорового рабочего машиностроительного завода. По антропометрическим показателям они представляли достаточно однородную группу. Рост рабочих составлял $174,9 \pm 0,6$ см,

Шишкин Г.С. – д.м.н., проф., главный научный сотрудник лаборатории физиологии дыхания
Устюжанинова Н.В. – к.б.н., старший научный сотрудник
Гультяева В.В. – к.б.н., старший научный сотрудник

масса тела – $71,6 \pm 0,7$ кг. Возраст варьировал от 20 до 30 лет ($26,9 \pm 0,8$ года). Все они были хорошо развиты физически.

Внешнее дыхание исследовали в покое и при выполнении физических нагрузок, которые давали на велоэргометре КЕ-11 (Венгрия) при скорости педалирования 60 оборотов в минуту. Использовали 2 режима: легкая (1 Вт на кг массы тела) и умеренная (2 Вт/кг) нагрузка. Первая соответствует 32–38 % максимальной аэробной мощности, определенной заранее у этих же испытуемых, а вторая – 50–62 %. Продолжительность нагрузки составляла 3 мин, перерыв между нагрузками разной мощности – 30 мин.

Исследование внешнего дыхания проводили строго по стандарту. Вначале показатели определяли после 20 минут пребывания в состоянии относительного покоя и температурного комфорта в положении сидя. Затем испытуемый раздевался до пояса, садился на велоэргометр и начинал дышать в спирометр с уровня спокойного выдоха. После 3–4 вдохов он начинал выполнять физическую работу.

Спирографию и определение легочных объемов проводили стандартными способами. Использовали оксиспирограф СГ-1М в комплексе с газоанализатором из комплекта ПООЛ-1, позволяющим вместе с записью оксиспирограммы определять гелиевым методом функциональную остаточную емкость. Регистрировали потребление кислорода (ПО_2), показатели вентиляции и газообмена (минутный объем дыхания – МОД; частоту дыхания – ЧД; дыхательный объем – ДО; коэффициент использования кислорода – КИО₂), статические легочные объемы (жизненную емкость легких – ЖЕЛ; емкость вдоха – Евд; резервный объем выдоха – РОвд; остаточный объем легких – ООЛ; функциональную остаточную емкость – ФОЕ). Все показатели, за исключением КИО₂, нормировали, т.е. выражали в % к должным (Д) значениям для мужчин соответствующего возраста, роста и массы тела. Нормативы показателей для жителей Западной Сибири были определены нами ранее [9].

Анализ газового состава выдыхаемого воздуха выполняли газоанализатором спирометрической установки «Спиrolит-2» и получали значения концентрации кислорода и двуокиси углерода в выдыхаемом воздухе. На основе этих показателей и показателей вентиляции, полученных при спирографии, рассчитывали функциональное мертвое пространство (ФМП), минутную вентиляцию мертвого пространства (МВМП) и минутную альвеолярную вентиляцию (МAB). Подробно методы исследования изложены в предыдущих работах [10].

Были также проанализированы взаимосвязи исследованных показателей. Оценку тесноты связи проводили по коэффициенту корреляции Пирсона (r). Значения r меньше $|\pm 0,16|$ (по модулю) приравнивали к нулю. В тексте статьи приводятся только достоверные связи и достоверные различия связей ($p < (0,05–0,01)$). При статистическом анализе динамики количественных показателей, представленных как $M \pm m$ (где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего), использовали парный t -критерий Стьюдента. Достоверность результатов оценивали по уровню значимости $p < 0,02$. Исследование проведено без риска для здоровья людей с соблюдением принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация, 2000 г., Директивы Европейского сообщества 86/609) и одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАМН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что у здоровых молодых мужчин потребление кислорода при легкой физической нагрузке возрастает в 3,5 раза ($p < 0,02$), достигая в среднем $990 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$, или 324 % ДПО₂ (табл. 1). Значительно возрастает и МОД (в 3 раза; $p < 0,02$), составляя в среднем $26,1 \text{ л} \times \text{мин}^{-1}$, или 283 % ДМОД. Некоторое отставание прироста МОД от ПО₂ объясняется тем, что при легкой нагрузке достоверно повышается эффективность вентиляции. Коэффициент использования кислорода увеличивается на 15 % от исходного уровня ($p < 0,02$). Это повышение может быть результатом как улучшения сопряжения альвеолярной вентиляции и кровотока, которое было ранее отмечено рядом исследователей [1, 11, 12], так и увеличения ФОЕ (на 11 % ДФОЕ; $p < 0,02$), т.е. объема функционирующей респираторной ткани и, соответственно, площади респираторной поверхности. Последнее также способствует ускорению массопереноса кислорода в респираторных отделах легких [13].

Увеличение МОД при легкой физической нагрузке на 92 % обеспечивается углублением дыхания. Дыхательный объем становится больше в 2,7 раза ($p < 0,02$), а изменения ЧД не существенны. В связи с большим ДО в 2,5 раза уменьшается разведение вдыхаемого воздуха в альвеолярном газе (ДО/ФОЕ), что соответственно увеличивает парциальное давление кислорода в альвеолярном газе ($P_A\text{O}_2$) и разность между $P_A\text{O}_2$ и парциальным давлением кислорода в венозной крови $P_V\text{O}_2$ ($\Delta P\text{O}_2$), которая является

Таблица 1

Показатели внешнего дыхания у здоровых молодых мужчин в покое
и при физической нагрузке разной тяжести

Показатель	Величина показателя в % к должному ($M \pm m$)		
	В покое	При физической нагрузке	
		1 Вт $\times$ кг ⁻¹	2 Вт $\times$ кг ⁻¹
ПО ₂	94 $\pm$ 2,1	324 $\pm$ 4,9*	527 $\pm$ 9,7*
МОД	94 $\pm$ 3,5	283 $\pm$ 9,8*	494 $\pm$ 16,4*
КИО ₂ ▼	40,4 $\pm$ 2,2	46,6 $\pm$ 2,2*	44,3 $\pm$ 2,5
ЧД	99 $\pm$ 4,3	112 $\pm$ 6,4	145 $\pm$ 8,9*
ДО	97 $\pm$ 3,8	263 $\pm$ 10,6*	358 $\pm$ 17,6*
ЖЕЛ	100 $\pm$ 2,2	101 $\pm$ 2,8	99 $\pm$ 2,8
Евд.	99 $\pm$ 3,0	98 $\pm$ 2,6	96 $\pm$ 3,0
РОВЫД.	102 $\pm$ 3,8	106 $\pm$ 5,6	104 $\pm$ 5,6
ООЛ	102 $\pm$ 4,5	122 $\pm$ 4,3*	128 $\pm$ 6,1*
ФОЕ	103 $\pm$ 3,3	114 $\pm$ 3,2*	116 $\pm$ 3,7*
ДО/ФОЕ ▼	0,17 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,02*	0,58 $\pm$ 0,03*
P _A O ₂ (мм рт. ст.) ▼	106 $\pm$ 2,0	109 $\pm$ 3,0	105 $\pm$ 4,0
P _A CO ₂ (мм рт. ст.) ▼	39,0 $\pm$ 1,2	38,9 $\pm$ 2,0	49,1 $\pm$ 5,3 *

Примечание. ▼ – показатели не нормированы; здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя в покое статистически значимо при $p < 0,02$.

движущей силой диффузии кислорода через аэрогематический барьер.

При умеренной физической нагрузке (2 Вт $\times$ кг⁻¹ массы тела) ПО₂ у рабочих повышается еще сильнее. Через 3 мин оно достигает 1640 мл $\times$ мин⁻¹, или 527 % ДПО₂ от состояния покоя, т. е. возрастает в 5,6 раза. Интенсивно увеличивается и МОД (в 5,2 раза), тоже несколько отставая от роста ПО₂, что можно объяснить повышением эффективности вентиляции (на 10 %; $p < 0,02$) и увеличением ФОЕ на 13 % ДФОЕ ($p < 0,02$). Как и при легкой нагрузке, прирост МОД в основном обеспечивается увеличением ДО, однако роль частоты дыхания при умеренной нагрузке становится больше. Она возрастает на 46 %. При этом отмечается одна существенная особенность – в альвеолярном газе достоверно повышается парциальное давление углекислоты (на 10 мм рт. ст., или на 26 %; $p < 0,05$). Очевидно, что легочная вентиляция в этой ситуации не полностью обеспечивает газовый гомеостаз крови.

Результаты исследования статических легочных объемов, выполненные при физической нагрузке, позволили расшифровать механизм увеличения ФОЕ. При легкой нагрузке РОВЫД не меняется, а ООЛ возрастает на 20 % ($p < 0,02$). Это показывает, что в вентиляцию и газообмен включаются резервные ацинусы, увеличивая, соответственно, респираторную поверхность и

улучшая условия диффузии кислорода в легких. На величины ЖЕЛ и Евд, характеризующие анатомическое развитие и мышечную силу аппарата внешнего дыхания, физическая нагрузка в 1 и 2 Вт $\times$ кг⁻¹ не влияет.

При физической нагрузке изменяются не только значения показателей, но и характер связей между процессами вентиляции и газообмена в респираторных отделах легких (табл. 2). Во-первых, значительно усиливается связь между ПО₂ и МОД. Очевидно, что при физической работе потребность в кислороде играет более важную роль, чем в покое, и регуляция дыхания почти полностью идет через парциальное давление кислорода в артериальной крови. Роль гиперкапнического стимула в регуляции дыхания при этом уменьшается. Связи МОД, ДО и ЧД с парциальным давлением СО₂ в альвеолярном газе (P_ACO₂) наполовину слабее, чем с ПО₂, поэтому их можно рассматривать как вторичные, поскольку P_ACO₂ и ПО₂ коррелируют между собой ($r = 0,44$). В то же время связи ООЛ и ФОЕ с P_ACO₂ ($r = 0,51$ и $r = 0,43$) выражены сильнее, чем с ПО₂ ($r = 0,45$ и $r = 0,31$). Это указывает на то, что при нагрузке происходит раскрытие резервных ацинусов респираторных отделов легких, которое обусловлено как дефицитом кислорода, так и избытком двуокиси углерода в артериальной крови.

Таблица 2

Зависимость между показателями внешнего дыхания у здоровых молодых мужчин в покое и при физической нагрузке разной тяжести

Взаимосвязь	Коэффициент корреляции		
	В покое	При физической нагрузке	
		1 Вт × кг ⁻¹	2 Вт × кг ⁻¹
ПО ₂ – МОД	0,55	0,89 *	0,86 *
ПО ₂ – КИО ₂	0	0,44 *	(0,25)
ПО ₂ – ЧД	0	0,39	0,60 *
ПО ₂ – ДО	0,47	0,77*	0,82 *
МОД – КИО ₂	–0,85	0*	(–0,17)*
ЧД – МОД	0,57	0,58	0,74
ДО – МОД	(0,24)	0,72*	0,77*
ДО – КИО ₂	0	0,51*	(0,26)
ЧД – ДО	–0,53	0*	(–0,27)
ПО ₂ – ООЛ	0	0,49*	0,45*
ПО ₂ – ФОЕ	0	(0,29)	(0,31)
ПО ₂ – ДО/ФОЕ	0,41	0,80*	0,83*
ООЛ – ДО	0	0,42*	0,53 *
ООЛ – МОД	0	0,41 *	0,44*
P _A CO ₂ – МОД	0,37	0	0,42
P _A CO ₂ – ЧД	0	0	(0,36)
P _A CO ₂ – ДО	0	0	0,41 *
P _A CO ₂ – ООЛ	(0,22)	0	0,51*
P _A CO ₂ – ФОЕ	(0,17)	0	0,43*

Примечание. Коэффициенты корреляции в скобках статистически не значимы; значения меньше 0,16 (по модулю) приравнены к нулю.

Во-вторых, при обеих нагрузках достоверно усиливается связь ПО₂ с ДО ($r = (0,77-0,82)$). Дыхательный объем почти полностью обуславливает прирост МОД. Причем важна не только величина ДО, но и степень его разведения в легких (ДО/ФОЕ). Тесная связь этого показателя с ПО₂ ($r = 0,80-0,83$) отражает повышение парциального давления кислорода в альвеолярном воздухе во время вдоха. Различия между легкой и умеренной нагрузкой заключаются лишь во вкладе ЧД в обеспечение изменений МОД. Выраженная связь ПО₂ с ЧД ($r = 0,60$) появляется только при нагрузке 2 Вт × кг⁻¹. Очевидно, что увеличение частоты дыхания используется как резерв второй очереди, когда дальнейшее углубление дыхания становится энергетически невыгодным в результате резкого повышения использования кислорода дыхательными мышцами. Однако повышение ЧД снижает эффективность вентиляции. Поэтому связь КИО₂ с ПО₂ при легкой физической нагрузке сильнее, чем при умеренной. Так же ведет себя связь ДО с КИО₂ ($r = 0,51$), которая при умеренной на-

грузке становится недостоверной. В результате, эффективность вентиляции играет существенное значение в обеспечении изменений ПО₂ только при легкой физической нагрузке. По-видимому, возможности повышения диффузионной способности легких при нагрузке 2 Вт × кг⁻¹ исчерпываются.

При нагрузках исчезают сильные обратные связи между МОД и КИО₂, а также ЧД и ДО, которые характеризуют точность и жесткость регуляции дыхания со стороны дыхательного центра. По-видимому, при очень большом объеме легочной вентиляции (26–48 л · мин⁻¹) точность регуляции, характерная для состояния покоя, теряет свое значение. Изменения МОД в покое в основном базируются на ЧД. При легкой физической нагрузке они обеспечиваются в большей мере за счет ДО, а при умеренной физической нагрузке – за счет обоих показателей.

Включение резервной ткани респираторных отделов легких в газообмен проявляется увеличением ООЛ и ФОЕ. При обеспечении потребления кислорода в условиях относительного по-

кая связи с параметрами респираторного аппарата не выявляются. При физической нагрузке такие связи возникают. Из статических легочных объемов основное значение в обеспечении изменений кислородного запроса организма играет ООЛ, отражающий число ацинусов, участвующих в газообмене. При обеих нагрузках связь PO_2 с ООЛ достоверна ($r = (0,45-0,49)$), так же как и ООЛ с ДО и МОД (см. табл. 2).

Анализ взаимосвязей в системе внешнего дыхания при физических нагрузках позволяет оценить изменения ее функциональной организации. Известно, что роль периферической хеморецепции в рабочем гиперпноэ усиливается и сводится к тонкой настройке альвеолярной вентиляции для минимизации отклонений парциального давления O_2 и CO_2 от уровня покоя [14–16]. Наши результаты это подтверждают.

Приведенные данные показывают, что в состоянии относительного покоя функциональная организация системы внешнего дыхания сводится к простой «вентиляционной цепочке», работающей по принципу «больше-меньше», адекватно потреблению кислорода организмом. Все изменения PO_2 почти полностью обеспечиваются динамикой вентиляции легких. Повышение уровня энергетических процессов в организме приводит к снижению парциального давления O_2 и повышению парциального давления CO_2 в венозной крови, а затем, соответственно, и в артериальной крови (рис. 1). Возникают гиперкапнический и гипоксический стимулы, которые активируют дыхательный центр (ДЦ), что вызывает увеличение ДО и ЧД. В результате МОД и МАВ становятся больше. Возрастание последней восстанавливает градиент кислорода (ΔPO_2)

Согласно закону Фика, скорость диффузии газов в легких определяется произведением ΔPO_2 и диффузионной способности легких (D_L). Первая обеспечивается легочной вентиляцией, вторая – состоянием респираторного аппарата. Коэффициент корреляции между PO_2 и МОД у здоровых мужчин в покое составляет 0,55. Понятно, что это не непосредственная связь. Она опосредована через МАВ, P_{AO_2} и ΔPO_2 , каждая из которых имеет свою вариабельность. Однако, несмотря на это, корреляция хорошо выражена, т. е. связь стабильна. В то же время зависимость PO_2 от диффузионной способности легких очень слабая ($r = 0,24$) и мало достоверна, т. е. ее можно считать несущественной. Таким образом, параметры аппарата внешнего дыхания на изменения кислородного запроса организма в покое фактически не реагируют. Связь PO_2 с КИО₂ не выявляется. Индивидуаль-

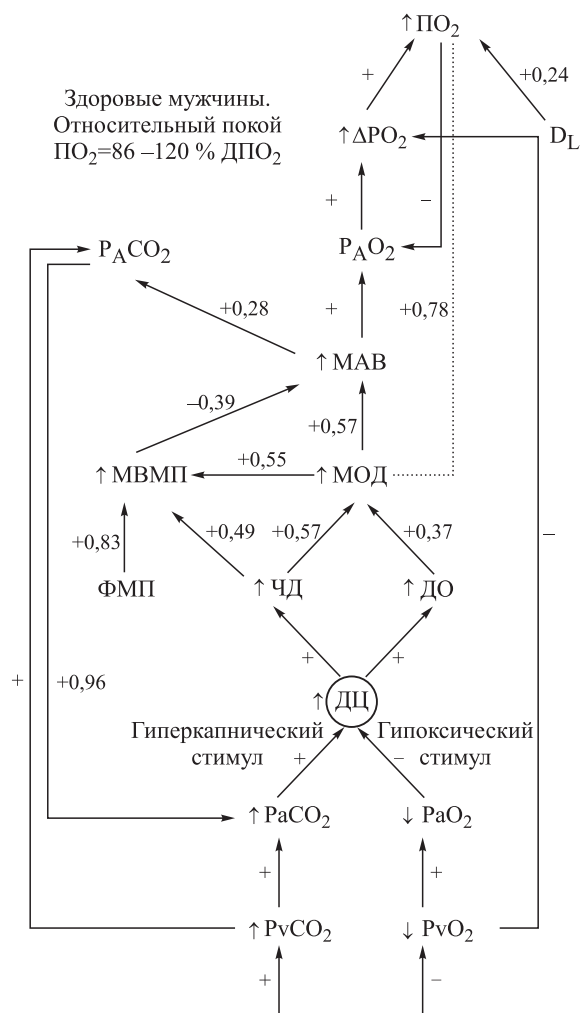


Рис. 1. Схема функциональных связей в системе внешнего дыхания при обеспечении изменений кислородного запроса организма в покое. Здесь и на рис. 2 $\uparrow$ — уровень энергетических процессов в организме, знаками « $\leftarrow$ » и « $\rightarrow$ » обозначен характер связи, цифрами — коэффициенты корреляции между показателями; P_{AO_2} и P_{ACO_2} — соответственно парциальное давление кислорода и двуокси углерода в альвеолярном газе, P_{aO_2} , P_{aCO_2} и P_{vO_2} , P_{vCO_2} — парциальное давление кислорода и двуокси углерода в артериальной и венозной крови соответственно, ΔP_{O_2} = разность P_{AO_2} — P_{vO_2}

ные изменения кислородного запроса организма у здоровых людей почти полностью обеспечиваются увеличением или уменьшением вентиляции легких.

Как известно, корреляция между PO_2 и KIO_2 служит проявлением одновременного сочетания зависимости между PO_2 и двумя структурными параметрами: функциональным мертвым пространством и диффузионной способностью легких, причем с первым связь отрицательная, а со вторым – положительная [17, 18]. Отсутствие

корреляции между PO_2 и KIO_2 подтверждает то, что у здоровых людей в покое связи уравновешивают друг друга и диффузионная способность легких в обеспечении изменений PO_2 не участвует. При физической нагрузке ФМП значительно увеличивается [19]. Поэтому отрицательная составляющая связи PO_2 с KIO_2 становится больше, а сочетанная корреляция должна уменьшаться. Однако происходит наоборот. Регистрируется выраженная сочетанная корреляция. Очевидно, что связь PO_2 с D_L становится преобладающей и сильной.

Соответствие легочной вентиляции уровню энергетических процессов в организме при нагрузках близко к полному. Коэффициент корреляции между ними в среднем равен 0,88. Настройка легочной вентиляции проходит по кислороду, так как такая корреляция указывает на причинно-следственные связи. Увеличение роли кислорода в регуляции дыхания при физической нагрузке обосновано, так как именно нехватка O_2 лимитирует окислительные процессы в мышечной клетке при усилении ее метаболизма [6]. Для нормального функционирования не-

обходимо поддержание внутриклеточного парциального давления кислорода в работающих мышцах в диапазоне от 0,5 до 3,5 мм рт. ст. [20]. Интенсивное выделение двуокиси углерода через аэрогематический барьер в альвеолы и некоторое повышение $P_A CO_2$ (при умеренной нагрузке на 10 мм рт. ст., $p < 0,01$) включает дополнительный контур усиления гиперкапнического стимула.

У здоровых мужчин в условиях относительного покоя регуляция дыхания происходит только путем изменения вентиляции легких. Однако уже при легкой физической нагрузке в регуляцию дыхания включается структурный компонент (рис. 2). Остается открытым вопрос о том, каким образом гиперкапния и гипоксемия вызывают мобилизацию резервных ацинусов. Известно, что при острых воздействиях различных стимулов (например, гипоксии или изменении сопротивления воздухоносных путей) изменяется механика дыхания и, как следствие, легочные объемы. Эти изменения регулируются центральной нервной системой [21]. Можно предполагать, что в ответ на гипер-

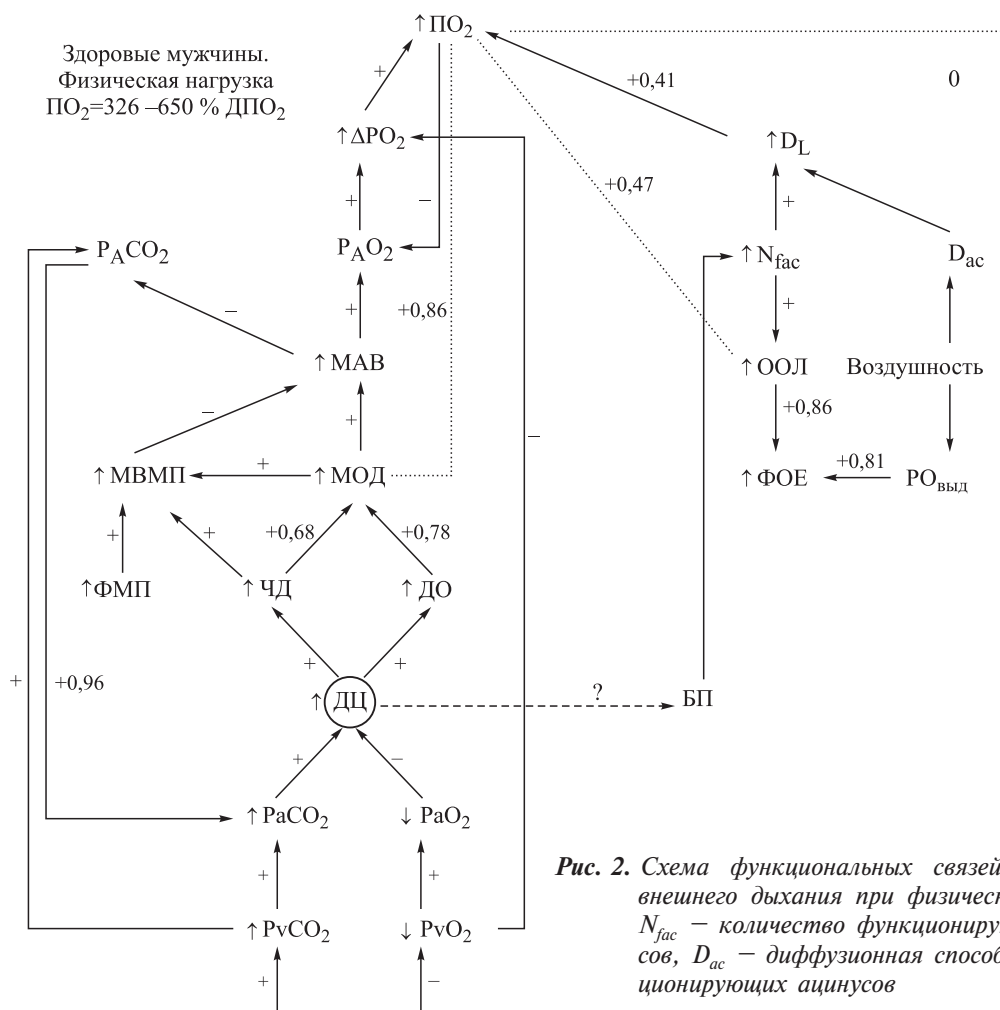


Рис. 2. Схема функциональных связей в системе внешнего дыхания при физической нагрузке. N_{fac} — количество функционирующих ацинусов, D_{ac} — диффузионная способность функционирующих ацинусов

капнию и гипоксемию происходят изменения тонуса гладкой мускулатуры терминальных и внутридольковых бронхиол. По данным Brown, Mitzner [22], Skloot, Toghias [23], углубление дыхания вызывает дилатацию бронхов, и бронхиальная проходимость увеличивается. Во всяком случае мы выявили выраженную связь между P_{ACO_2} и ООЛ ($r = 0,51$), почти такую же, как между P_{ACO_2} и МОД ($r = 0,42$).

Таким образом, схема регуляции дыхания при увеличении кислородного запроса организма включает изменения не только вентиляции и паттерна дыхания, но и легочных объемов. В целом эту схему функциональной организации системы внешнего дыхания можно условно назвать «нагрузочной». В ней сочетается усиление работы вентиляционной цепочки и мобилизация резервной ткани респираторных отделов легких.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая основные результаты данного исследования, можно заключить, что при физических нагрузках, выполняемых при комнатной температуре, регуляция вентиляции легких в основном переходит на кислородный контур, независимо от исходных параметров внешнего дыхания. Ведущим гомеостатируемым параметром становится парциальное давление кислорода в артериальной крови. При этом снимаются все ограничения с легочной вентиляции и отключаются механизмы, направленные на экономию работы дыхания, на что указывает исчезновение связей МОД с КИО₂ и ЧД с ДО. В обеспечении кислородного запроса эффективность вентиляции играет роль только при легкой физической нагрузке. При умеренной нагрузке, по мере нарастания ЧД, значение КИО₂ сводится к нулю. При физических нагрузках к обеспечению кислородного запроса организма подключается структурный компонент диффузии. В результате увеличения ООЛ, которое отражает включение в вентиляцию и газообмен резервной ткани респираторных отделов легких, становится больше альвеолярный объем и его респираторная поверхность, что и приводит к соответствующему повышению диффузионной способности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yasukouchi A. Characteristics of pulmonary diffusing capacity for CO at rest and during exercise // *Ann. Physiol. Anthropol.* 1990. 9. (2). 123–132.
2. Huang Y.C., O'Brien S.R., MacIntyre N.R. Intra-breath diffusing capacity of the lung in healthy indi-

viduals at rest and during exercise // *Chest.* 2002. 122. (1). 177–185.

3. Stam H., Hrachovina V., Stijnen T., Versprille A. Diffusing capacity dependent on lung volume and age in normal subjects // *J. Appl. Physiol.* 1994. 76. (6). 2356–2363.

4. Tsoukias N.M., Wilson A.F., George S.C. Effect of alveolar volume and sequential filling on the diffusing capacity of the lungs: I. theory // *Resp. Physiol.* 2000. 120. (3). 231–249.

5. Tsoukias N.M., Dabdub D., Wilson A.F., George S.C. Effect of alveolar volume and sequential filling on the diffusing capacity of the lungs: II. Experiment // *Resp. Physiol.* 2000. 120. (3). 251–271.

6. Weibel E.R. Gas exchange: large surface and thin barrier determine pulmonary diffusing capacity // *Minerva Anesthesiol.* 1999. 65. (6). 377–382.

7. Шишкин Г.С., Устюжанинова Н.В. Компенсаторное значение повышения воздушности респираторных отделов легких // *Физиология человека.* 2008. 34. (6). 122–126.

8. Евдокимов Е.И., Одионец Т.Е., Голец В.Е. Особенности изменений показателей функции внешнего дыхания под воздействием физической нагрузки // *Физическое воспитание студентов творческих специальностей.* 2008. 4. 64–72.

9. Шишкин Г.С., Уманцева Н.Д., Устюжанинова Н.В. Нормативы показателей внешнего дыхания для мужчин, проживающих в Западной Сибири // *Бюл. физиол. патол. дыхания.* 2005. Вып. 21. 7–12.

10. Шишкин Г.С., Устюжанинова Н.В. Функциональная вариабельность показателей вентиляции и газообмена у здоровых молодых мужчин в Западной Сибири // *Физиология человека.* 2006. 32. (3). 79–83.

11. Coast J.R., O'Kroy J.A., Akers F.M., Dahl T. Effect of lower body pressure changes on pulmonary function // *Med. Sci. Sport Exerc.* 1998. 30. (7). 1035–1040.

12. Sinclair S.E., McKinney S., Glenny R.W. et al. Exercise alters fractal dimension and spatial correlation of pulmonary blood flow in the horse // *J. Appl. Physiol.* 2000. 88. (6). 2269–2278.

13. Гришин О.В., Никольская О.Э. Зависимость между функциональной остаточной емкостью легких и уровнем газообмена при физических нагрузках // *Физиология человека.* 1996. 22 (1). 93–97.

14. Forster H.V., Pan L.G. The role of the carotid chemoreceptors in the control of breathing during exercise // *Med. Sci. Sports Exerc.* 1994. 26. (3). 328–336.

15. Исаев Г.Г. Физиология дыхательных мышц // *Физиология дыхания.* СПб.: Наука, 1994. 7–30.

16. Pan L.G., Forster H.V., Martino P. et al. Important role of carotid afferents in control of breathing // J. Appl. Physiol. 1998. 85. (4). 1299–1306.
17. Nisell O. A flow model of respiration in health and disease // Clin Physiol. 1996. 16. 131–143.
18. Грини М.А. Патология легких. М.: Бином, 2001. 326 с.
19. Hale T., Cox W.J. Changes in alveolar mixing efficiency during exercise // Respir. Physiol. 1991. 86. (3). 283–291.
20. Бреслав И.С., Ноздрачев А.Д. Дыхание. Висцеральный и поведенческий аспекты. СПб.: Наука, 2005. 307 с.
21. Vizek M. Control of end-expiratory lung volume: a component of the control of breathing // J. Physiol. Proc. 1998. 511. 42s–43s.
22. Brown R.H., Mitzner W. Airway response to deep inspiration: role of inflation pressure // J. Appl. Physiol. 2001. 91. (6). 2574–2580.
23. Skloot G., Togias A. Bronchodilation and bronchoprotection by deep inspiration and their relationship to bronchial hyperresponsiveness // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2003. 24. (1). 55–72.

FUNCTIONAL ORGANIZATION OF RESPIRATORY SYSTEM DURING PHYSICAL ACTIVITY

Gennadiy Sergeevich SHISHKIN, Nina Vital'evna USTYUZHANINOVA,
Valentina Vladimirovna GULTYAEVA

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

Functional organization of respiratory system, based on correlations between respiratory indices at rest and during physical activity was examined in healthy young inhabitants of Western Siberia. It is found that oxygen loop regulates pulmonary ventilation during physical activity, independently from baseline respiratory parameters. Ventilatory efficiency is shown to be of great concern in oxygen consumption supplying only during light physical activity. Significance of oxygen utilization coefficient reduces to zero concurrently with breathing frequency increase and connection of structural component of diffusion during moderate physical activity. Residual volume increase reflects that reserve tissue of the respiratory regions of the lungs includes in ventilation and gas exchange and appropriate diffusion capacity rises as a result of respiratory surface enlargement. This functional organization of the respiratory system can be named “physically active”. Ventilatory chain intensification combines with the reserve tissue of respiratory regions mobilization in it.

Key words: respiratory system, physical activity, functional organization

*Shishkin G.S. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher of laboratory of respiratory physiology
Ustyuzhaninova N.V. – candidate of biological sciences, senior researcher
Gulyaeva V.V. – candidate of biological sciences, senior researcher*

ВИДОВОЙ СОСТАВ СПИРОХЕТ *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПОПУЛЯЦИИ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS* НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА

Анатолий Борисович БЕКЛЕМИШЕВ, Александр Владимирович РЯБЧЕНКО,
Алексей Львович МАМАЕВ

ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Цель работы – определить зараженность клещей *I. persulcatus*, отловленных в рекреационной зоне Новосибирска в весенние периоды с 2003 по 2008 г., спирохетами *B. burgdorferi* s. l. Материалы и методы. Обнаружение в клещах и генотипирование боррелий проводили методами ПЦР и анализа полиморфизма длин рестриктных фрагментов ампликонов межгенной области *rrf-rrl*. Результаты. Обследовано 1259 особей взрослых клещей. Зараженность клещей боррелиями в период с 2003 по 2008 г. колебалась в пределах от $20,1 \pm 2,3$ до $31,7 \pm 6,0$ %. В клещах обнаружены спирохеты двух видов: *B. afzelii* и *B. garinii*. Доля спирохет *B. afzelii* являлась относительно постоянной, тогда как в случае вида *B. garinii*, включающего геномные группы NT29 и 20047^T, прослеживается возрастание доли боррелий группы 20047^T. Выявлены особи клещей, инфицированные, предположительно, спирохетами *B. japonica*.

Ключевые слова: клещ *Ixodes persulcatus*, зараженность, ПЦР, вид, *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Лайм-боррелиоз (синонимы: иксодовый клещевой боррелиоз, болезнь Лайма) – одно из самых распространенных природно-очаговых заболеваний в России, возбудителем которого являются спирохеты комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.), относящиеся к роду *Borrelia*, входящему в семейство Spirochaetaceae. В настоящее время охарактеризовано 18 видов спирохет, входящих в состав комплекса *B. burgdorferi* s. l., из которых только три (*B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* и *B. afzelii*) являются патогенными для человека [8, 19]. Все эти виды боррелий были обнаружены на европейской территории России [1, 3, 17]. На территории Европы были выделены из биоптатов кожи пациентов и описаны новые относительно патогенные для человека виды: *B. spielmanii* [18, 21], *B. lusitaniae* и *B. valaisiana* [12, 13, 19]. Долгое время считалось, что в России циркулируют только два генотипа — *B. garinii* и *B. afzelii* с явным преобладанием первого [1, 17]. Однако уже в 2001 г. появились работы, свидетельствующие о циркуляции на европейской части России спирохет вида *B. burgdorferi* s. s. [3, 11]. Описан также случай обнаружения спирохет *B. miyamotoi* от пациентов на террито-

рии Ленинградской области [6]. На территории Сибири и, в частности, Новосибирской области найдено только два патогенных вида боррелий: *B. garinii* (группы 20047^T и NT29) и *B. afzelii* [2, 9, 14, 15]. Однако в 2007 г. в Омской области в популяции клещей *Dermacentor reticulatus* обнаружена ДНК, которая имела высокую степень сходства по межгенному спейсеру *rrfA-rrlB* с ДНК вида *B. spielmani* [4].

Выявление новых видов боррелий на территориях, где ранее их не обнаруживали, может быть обусловлено как увеличением числа исследований в этом направлении с использованием новых более совершенных методов анализа, так и возможным распространением видов боррелий вследствие миграций млекопитающих и птиц. Чтобы ответить на эти вопросы, необходимы обширные систематические исследования зараженности иксодовых клещей.

Целью настоящей работы явилось исследование зараженности клещей *I. persulcatus*, отловленных в рекреационной зоне Новосибирского научного центра (ННЦ) в весенние периоды с 2003 по 2008 г., спирохетами *B. burgdorferi* s. l. и определение их видового состава.

Беклемишев А.Б. – д.б.н., проф., зав. лабораторией, e-mail: beklem@soramn.ru

Рябченко А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: masterbio@soramn.ru

Мамаев А.Л. – научный сотрудник, e-mail: alexeymataev@inbox.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор клещей. Клещей *Ixodes persulcatus* (Schulze) отлавливали флажковым методом в лесопарковой зоне ННЦ в апреле–мае с 2003 по 2008 г. Всего было отловлено и проанализировано 1259 имаго обоих полов. ДНК выделяли только из живых особей клещей.

Выделение суммарного препарата ДНК из клещей. ДНК из живых клещей выделяли методом [10]. Препараты ДНК хранили при -20°C .

Обнаружение ДНК спирохет *B. burgdorferi* s. l. в суммарных препаратах ДНК клещей и их генотипирование. Обнаружение ДНК боррелий и их генотипирование осуществляли с помощью ПЦР и анализа полиморфизма длин рестриктных фрагментов (ПДРФ) межгенной области по методике [16] с некоторыми модификациями [9]. В реакционную смесь объемом 50 мкл вносили по 2–5 мкл препарата ДНК, выделенного из клеща. Температура отжига праймеров с ДНК составляла 64°C , суммарное количество циклов ПЦР – 40. Для определения ложноотрицательных результатов ПЦР, обусловленных присутствием в некоторых препаратах исследуемой ДНК ингибиторов *Taq*-полимеразы, реакцию проводили в присутствии ДНК внутреннего контроля с дополнительной парой соответствующих ей праймеров [9]. Продукты ПЦР анализировали в 6–8 % полиакриламидном геле (ПААГ). Размеры ампликонов, синтезируемых на ДНК внутреннего контроля, составляли 150 пар нуклеотидов (п. н.). ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). В работе использовались ферменты компании «Сибэнзим» (Россия).

Доля позитивных клещей и доля индивидуального вида от общего количества генотипированных образцов определялась как $p \pm SD$ по

формулам: $p = \frac{P}{n} \times 100\%$ и $SD = \sqrt{\frac{p(100-p)}{n}}$,

где p — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение, P — количество позитивных особей в выборке, n — величина выборки.

Электрофорез ДНК проводили в 6 и 16 % ПААГ, в качестве маркерной ДНК использовали ДНК плазмиды pUC19, гидролизованной рестриктазой *MspI* (размеры рестриктов: 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34×2 , 26 п. н.)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обнаружение и генотипирование геномных ДНК боррелий, выделенных из клещей, осуществлялись в два последовательных этапа,

включающих выявление межгенной области генов 5S и 23S рРНК (*rrf-rrl*) методом ПЦР с использованием праймеров, специфичных для спирохет комплекса *B. burgdorferi* s. l., и последующий анализ полиморфизма длин рестриктных фрагментов, полученных гидролизом ампликонов межгенной области *rrf-rrl* рестриктазой *Tru9I* (изошизомер *MseI*). На первом этапе амплифицировали фрагмент межгенной области *rrf-rrl*, длина которого составляет в зависимости от вида 250–270 п. н. В качестве положительного контроля в ПЦР использовали геномную ДНК *B. burgdorferi* s. s. эталонного штамма B31, размер ампликона межгенной области *rrf-rrl* которого составляет 250 п. н. В каждую реакционную смесь вносили ДНК внутреннего контроля с дополнительной парой соответствующих ей праймеров, размер ампликона с которой составляет 150 п. н. На рис. 1 представлены результаты типичного анализа продуктов ПЦР на присутствие в них ампликонов межгенной области боррелий. По наличию ампликонов размером 250–270 п. н. судили о присутствии ДНК боррелий в образцах суммарных препаратов ДНК клещей, т. е. о наличии возбудителя в клеще.

На втором этапе полученные ампликоны межгенной области гидролизовали рестриктазой *Tru9I*. Представителям каждого вида и геномной группы спирохет *B. burgdorferi* s. l. свойственен определенный набор отличающихся по размерам рестриктных фрагментов ампликона межгенной области *rrf-rrl* [16], которые легко можно разделять электрофорезом в 16 % ПААГ. Таким образом, по результатам электрофоретического анализа полученных рестриктов можно судить о видовой принадлежности боррелий, содержащихся в исследуемом клеще. На рис. 2 представлен один из результатов генотипирования межгенной области *rrf-rrl* боррелий.

Судя по картине электрофореза, представленной на рис. 2, семь исследуемых образцов (дорожки 2, 4, 7, 10–13) содержат геномную ДНК спирохет, относящихся к виду *B. garinii* (геномная группа 20047^T); один образец (дорожка 3) — предположительно *B. japonica*; один исследуемый образец (дорожка 6) содержит смесь геномных ДНК спирохет *B. garinii* (геномные группы NT29 и 20047^T); один образец (дорожка 8) — *B. afzelii*; один исследуемый образец (дорожка 9) содержит смесь геномных ДНК спирохет *B. garinii* (геномная группа 20047^T) и, вероятно, *B. japonica*.

Данным методом нами были проанализированы клещи, отловленные в весенние периоды 2003, 2005, 2006 и 2008 гг. Результаты по гено-

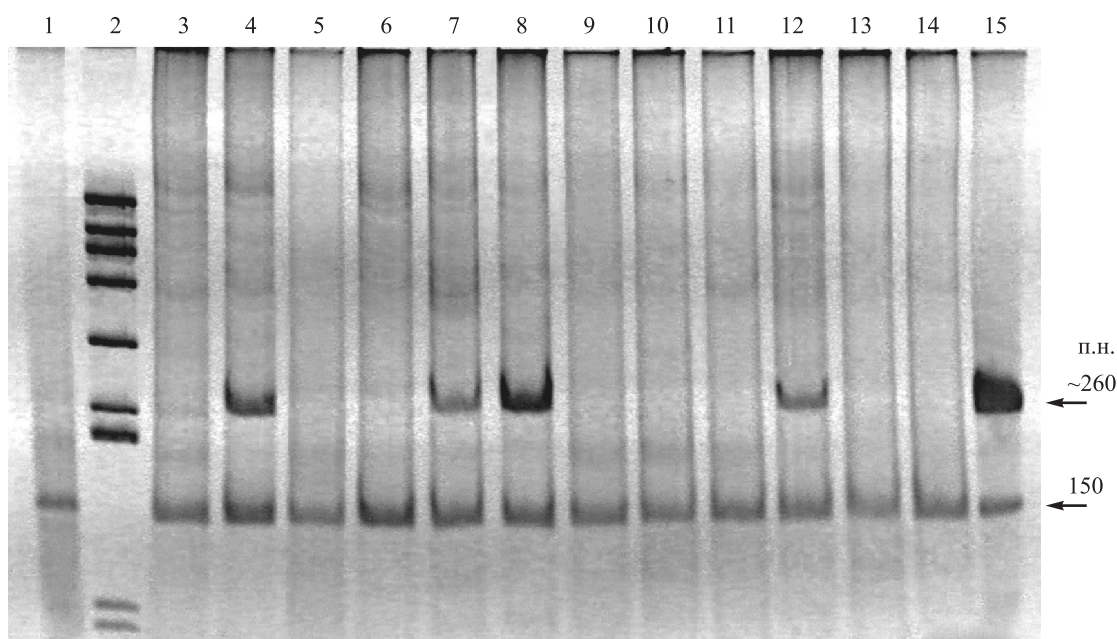


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации межгенной области *rrf-rrl*, полученных методом ПЦР на образцах ДНК, выделенных из клещей. Электрофорез ДНК проводили в 6 % ПААГ. Дорожки: 1 – отрицательный контроль; 2 – маркерная ДНК (pBR 322, гидролизованная рестриктазой *AluI*); 3–14 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК, выделенных из клещей; 15 – продукт ПЦР, полученный на геномной ДНК *B. burgdorferi* s. s. штамм B31 (положительный контроль). Ампликоны размером 150 п. н., наблюдаемые на всех дорожках, являются продуктами ПЦР, полученными на ДНК внутреннего контроля

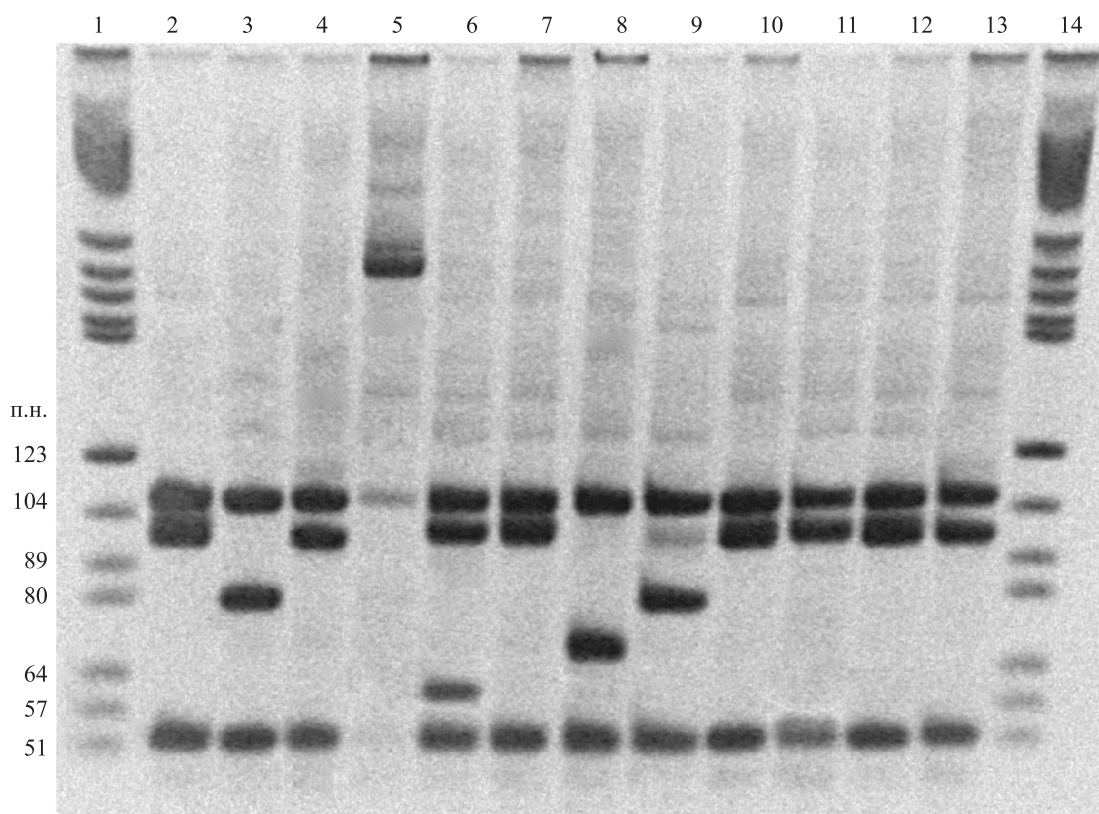


Рис. 2. Электрофореграмма гидролизованных рестриктазой *Tru9I* ампликонов межгенной области *rrf-rrl*, полученных методом ПЦР на препаратах анализируемых образцов ДНК иксодовых клещей. Электрофорез проводили в пластинах 16 % полиакриламидного геля. Дорожки: 1, 14 – маркеры молекулярных масс ДНК (ДНК pBR322, гидролизованная рестриктазой *HaeIII*); 2–13 – продукты гидролиза рестриктазой *Tru9I* ампликонов межгенной области *rrf-rrl* исследуемых образцов ДНК иксодовых клещей

Зараженность взрослых клещей *I. persulcatus*, отловленных в рекреационной зоне ННЦ в весенние периоды времени 2003–2008 гг., различными видами спирохет комплекса *Borrelia burgdorferi* s. l.

Год	Количество клещей	Количество ПЦР-положительных клещей, %	Количество генотипированных ПЦР-положительных образцов ДНК из клещей				
			Всего	<i>B. garinii</i> NT29	<i>B. garinii</i> 20047 ^T	<i>B. afzelii</i>	Смесь видов <i>B. afzelii</i> и <i>B. garinii</i>
2003*	116	31,7 ± 6,0	37	10	14	3	10
2005	306	21,2 ± 2,3	64	8	31	15	10
2006	590	26,1 ± 1,8	154	13	97	20	24
2008	303	20,1 ± 2,3	61	6	53	2	—
Σ	1315	22,2 ± 1,0	316	37 11,7 ± 1,8 %	195 61,7 ± 2,7 %	40 12,7 ± 1,9 %	44 13,9 ± 1,9 %

Примечание: * – результаты по определению зараженности клещей боррелиями и их генотипированию были получены с помощью анализа ДНК культур спирохет, полученных посевом содержимого кишечника исследуемых клещей на селективную среду BSK-2 с последующим культивированием боррелий в течение 2 недель [5]; Σ – суммарные данные за весь наблюдаемый период.

типированию в 2003 г. были получены методом культивирования боррелий. Суммарные результаты исследований за эти годы представлены в таблице.

В результате проделанной работы из патогенных для человека видов спирохет *B. burgdorferi* s. l., выявленных в различных регионах России, в рекреационной зоне ННЦ мы обнаружили только два: *B. garinii* (группы NT29 и 20047^T) и *B. afzelii*. В 2006 и 2008 гг. на территории ННЦ были впервые обнаружены особи клещей *I. persulcatus*, зараженные спирохетами, которые по данным анализа ПДРФ межгенной области *rrf-rrl* соответствовали виду *B. japonica* (6 и 5 клещей, соответственно). Препараты ДНК, содержащие геномные ДНК, предположительно, спирохет вида *B. japonica*, в основном были представлены смесью с образцами геномных ДНК других видов боррелий и при подсчете доли положительных клещей отдельно не учитывались. Спирохеты вида *B. burgdorferi* s. s. не были обнаружены ни в одном из проанализированных клещей на всем протяжении исследований.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе осуществлялся мониторинг зараженности клещей *I. persulcatus* спирохетами *B. burgdorferi* s. l. в период с 2003 по 2008 г. Этот вид иксодовых клещей являлся абсолютно доминирующим на территории рекреационной зоны ННЦ в эти годы. Как можно видеть из таблицы, зараженность иксодовых клещей, населявших рекреационную зону ННЦ, является величиной непостоянной и может изменяться год от года (от 20,1 ± 2,3 % в 2008 г. до 31,7 ± 6,0 % в 2003 г.). В среднем зараженность

клещей за весь наблюдаемый период составила 22,2 ± 1,0 %. Полученные нами данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований на территории Новосибирской области, где были зафиксированы колебания зараженности от 14,0 ± 5,4 % в 1999 г. до 38,0 ± 4,0 % в 2001 г. [9, 14, 15].

На основе анализа зараженности взрослых клещей *I. persulcatus* различными видами спирохет комплекса *Borrelia burgdorferi* s. l. можно определить долю каждого вида (см. таблицу) от всей суммы протипированных образцов ДНК (316 образцов). Эти данные отражают видовой состав спирохет *B. burgdorferi* s. l., циркулировавших в популяции клещей на территории ННЦ в весенние периоды 2003–2008 гг. Из всех патогенных видов комплекса *B. burgdorferi* s. l. подавляющее распространение получили спирохеты вида *B. garinii*, которые были обнаружены в 73,4 ± 2,5 % клещей, причем представители геномной группы 20047^T – в 61,7 ± 2,7 % клещей, а группы NT29 – в 11,7 ± 1,8 % клещей. Спирохеты вида *B. afzelii* были найдены только в 12,7 ± 1,9 % клещей, 13,9 ± 1,9 % исследованных образцов ДНК клещей содержали геномные ДНК одновременно двух видов, *B. garinii* и *B. afzelii*.

Если проанализировать видовое распределение боррелий по каждому году и определить долю каждого вида от всей суммы протипированных образцов ДНК, то можно составить гистограмму, которая отображает динамику видового состава боррелий в популяции клещей *I. persulcatus* (рис. 3).

Из данных по зараженности клещей (см. таблицу) видно, что доля вида *B. afzelii* в популяции клещей являлась относительно постоян-

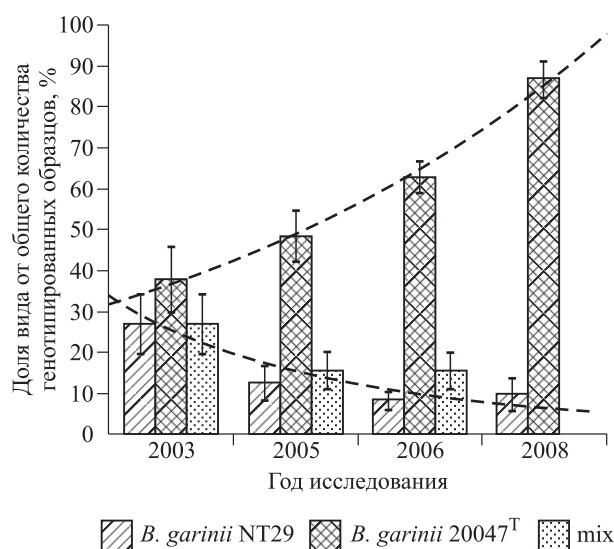


Рис. 3. Доля видов комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, циркулировавших в популяции клещей *Ixodes persulcatus* (Shulze) в весенние периоды 2003–2008 гг. на территории Новосибирского научного центра. Mix — смесь видов *B. afzelii* и *B. garinii*

ной, т. е. никакой динамики не было, в связи с чем на рис. 3 данные не приводятся. В случае вида *B. garinii* (см. рис. 3) ежегодное соотношение между представителями геномных групп NT29 и 20047^T в зараженных боррелиями клещах являлось непостоянным, и в период с 2003 по 2008 г. четко прослеживается возрастание в популяции клещей доли боррелий геномной группы 20047^T. При относительно постоянной величине зараженности клещей 20–32 % это увеличение объясняется снижением доли геномной группы NT29. Кроме того, прирост также объясняется уменьшением доли микст-инфицированных клещей практически до нуля (2008 г.), что хорошо отражено на рис. 3. Повидимому, в микст-инфицированных клещах происходит вытеснение видом *B. garinii* группы 20047^T как вида *B. afzelii*, так и вида *B. garinii* группы NT29, за счет чего падает доля микст-инфицированных клещей и увеличивается доля клещей, зараженных спирохетами геномной группы 20047^T. В целом вид *B. garinii* на всем протяжении исследуемого периода времени являлся доминирующим видом спирохет комплекса *B. burgdorferi* s. l., циркулировавших в иксодовых клещах рекреационной зоны ННЦ. Учитывая тропизм спирохет вида *B. garinii* к нервной ткани [6, 19], можно ожидать, что на территории Новосибирской области у больных Лайм-боррелиозом будут преобладать невралгические формы болезни, что, несомненно, не-

обходимо учитывать при выборе рационального способа лечения.

Спирохеты вида *B. burgdorferi* s. s., выявляемые на территории Европы, в том числе и в европейской части России, на территории ННЦ обнаружены не были. Можно полагать, что процесс распространения боррелий по Евразии, осуществляемый млекопитающими и птицами, протекает сравнительно медленно. Для подтверждения полученных в настоящей работе данных об обнаружении спирохет, которые, судя по результатам анализа межгенной области *rrf-rrl* методом ПДРФ, можно отнести к виду *B. japonica*, требуются дополнительные исследования, в частности, секвенирование межгенной области *rrf-rrl* либо генов иммунодоминантных белков (*OspC*, *OspA* и других). Принято считать, что спирохеты вида *B. japonica* не патогенны для человека. Однако в литературе появились данные о тяжелых поражениях сердечно-сосудистой системы у пациентов Приморского края, инфицированных спирохетами *B. japonica* [7]. Поэтому данный вид боррелий следует рассматривать в качестве потенциального источника болезни и учитывать при проведении эпидемиологических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В весенние периоды с 2003 по 2008 г. в популяции иксодовых клещей, населяющих рекреационную зону ННЦ, циркулировали только два вида боррелий: *B. afzelii* и *B. garinii* (геномные группы NT29 и 20047^T), со значительным преобладанием последнего. Спирохеты вида *B. burgdorferi* s. s. в исследованных иксодовых клещах обнаружены не были. Выявлены особи, инфицированные, предположительно, спирохетами *B. japonica*. Однако для более строгого доказательства обнаружения спирохет *B. japonica* в клещах потребуются дополнительный молекулярно-генетический анализ ДНК этого вида боррелий. Учитывая достаточно высокий уровень зараженности взрослых особей таежного клеща спирохетами *B. burgdorferi* s. l. ($22,2 \pm 1,0$ %), можно прогнозировать высокий риск заражения возбудителями Лайм-боррелиоза лиц, подвергшихся нападению иксодовых клещей в Новосибирской области. В заключение следует добавить, что в последние 3–4 года в пригороде Академгородка появился вид иксодовых клещей *I. pavlovskyi*, который таксономически, морфологически и экологически близок *I. persulcatus* и практически сравнялся по численности с последним. Принимая во внимание высокую эпидемиологическую значимость

Лайм-боррелиоза для населения, исследование зараженности клещей *I. pavlovskyi* спирохетами группы *B. burgdorferi* s.l. представляет несомненный интерес.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горелова Н.Б., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. и др. Изоляция боррелий от клещей *Ixodes trianguliceps* (Ixodidae) и возможное значение этого вида в эпизоотологии иксодовых клещевых боррелиозов // Паразитология. 1996. 30. (1). 13–18.
2. Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Фадеева И.А., Горелова Н.Б. Основные итоги генотипирования боррелий в России // Бюл. сиб. мед. 2006. (Прил. 1). 87–92.
3. Масузава Т., Наумов Р.Л., Кудекен М., Харитоненков И.Г. Обнаружение *Borrelia burgdorferi* sensu stricto в Московской области, Россия // Мед. паразитол. паразитарные болезни. 2001. (2). 52.
4. Рудакова С.А., Коломеец А.Н., Самойленко И.Е. и др. Экспресс-индикация трансмиссивных патогенов как основа дифференцированного подхода к профилактике инфекций, передающихся иксодовыми клещами // Бюл. СО РАМН. 2007. 126. 116–119.
5. Рябченко А.В., Ивлева И.Н., Беклемишев А.Б. Комплексная оценка зараженности клещей *Ixodes persulcatus*, распространенных в рекреационной зоне Новосибирского научного центра, спирохетами *Borrelia burgdorferi* s.l. // Журн. инфекц. патол. 2004. 11. (3–4). 107–110.
6. Скрипченко Н.В., Балинова А.А. Клинико-лабораторные особенности иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, у детей // Журн. инфектологии. 2010. 2. (2). 35–39.
7. Черникова А.А., Гордеев А.В., Терновой В.А. и др. Проявления иксодового клещевого боррелиоза в зависимости от генотипа боррелий в Приморском крае // Тихоокеанский мед. журн. 2009. (4). 26–28.
8. Baranton G., De Martino S.J. *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in human // Curr. Probl. Dermatol. 2009. 37. 1–17.
9. Beklemishev A.B., Dobrotvorskyy A.K., Piterina A.V. et al. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes persulcatus* ticks in West Siberia, Russia // FEMS Microbiol. Lett. 2003. 227. 157–161.
10. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. 162. 156–159.
11. Горелова Н.Б., Коренберг Э.И., Постик Д. и др. Первая изоляция *Borrelia burgdorferi* sensu stricto в России // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2001. (4). 10–12.
12. Hengge U.R., Tannapfel A., Tying S.K. et al. Lyme borreliosis // Lancet. Infect. Dis. 2003. 3. 489–500.
13. Hofmann H. Lyme borreliosis. Cutaneous manifestation // Hautarzt. 2005. 56. 783–796.
14. Livanova N.N., Morozova O.V., Morozov I.V. et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Novosibirsk region (West Siberia, Russia) based on direct PCR // Eur. J. Epidemiol. 2003. 18. 1155–1158.
15. Morozova O.V., Dobrotvorskyy A.K., Livanova N.N. et al. PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick-borne encephalitis virus, and the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia // J. Clin. Microbiol. 2002. 40. 3802–3804.
16. Postic D., Assous M.V., Grimont P.A.D., Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf(5S)-rrl(23S) intergenic spacer amplicons // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. 44. 743–752.
17. Postic D., Korenberg E., Gorelova N. et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates // Res. Microbiol. 1997. 148. 691–702.
18. Richter D., Postic D., Sertour N. et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *B. spielmanii* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. 56. 873–881.
19. Stanek G., Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? // Clin. Microbiol. Infect. 2011. 17. (4). 487–493.
20. Steere A.C. Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut // Wien. Klin. Wochenschr. 2006. 118. 625–633.
21. Wang G., van Dam A., Schwartz I., Dankert J. Phenotypic and genetic characterization of novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis // J. Clin. Microbiol. 1999. 37. 3025–3028.

**SPECIES OF *BORRELIA BURGDOFFERI* SENSU LATO SPIROCHETES,
CIRCULATING IN *IXODES PERSULCATUS* TICKS POPULATION AT THE
TERRITORY OF NOVOSIBIRSK SCIENTIFIC CENTER**

**Anatoly Borisovich BEKLEMISHEV, Aleksander Vladimirovich RYABCHENKO,
Aleksy L'vovich MAMAEV**

*FSBI Research Institute for Biochemistry SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

The aim of the study – to determine the infection rate by spirochetes *B. burgdorferi* sl of *I. persulcatus* ticks, collected in the recreational zone of Novosibirsk in the spring periods from 2003 to 2008. Material and methods. Detection and genotyping borrelia in ticks was performed by PCR and by analysis of restriction fragments length polymorphism of amplicons from *rrf-rrl* intergenic region. Results. A total of 1259 individuals of adult ticks were analyzed. The infection rate of ticks by borrelia in the period from 2003 to 2008 ranged from 20.1 ± 2.3 to 31.7 ± 6.0 %. Two species of spirochetes were found in ticks: *B. afzelii* and *B. garinii*. The proportion of *B. afzelii* spirochetes was relatively constant, whereas in the case of *B. garinii* species, consisting of NT29 and 20047^T genomic groups, observed increase in the proportion of *Borrelia* 20047^T group. It was identified individual ticks infected presumably with *B. japonica* spirochetes.

Key words: *Ixodes persulcatus*, infection rate, PCR, species, *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Beklemishev A.B. – doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory, e-mail: beklem@soramn.ru
Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail: masterbio@soramn.ru
Mamaev A.L. – researcher, e-mail: alexeymamaev@inbox.ru