

УДК 576.36.044:546.11'221.1

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯТОРНОГО ВЛИЯНИЯ  
СУЛЬФИДА ВОДОРОДА НА ПРОГРЕССИЮ ФАЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА****Вячеслав Викторович НОВИЦКИЙ, Елена Григорьевна СТАРИКОВА,  
Любовь Александровна ТАШИРЕВА, Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА***ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
634050, г. Томск, Московский тракт, 2*

Цель исследования: определить молекулярные механизмы влияния сульфида водорода на прогрессию фаз клеточного цикла. Материал и методы. Клетки линии Jurkat служили материалом для проведения данного исследования. Методы исследования включали проточную лазерную цитометрию, вестерн-блоттинг, ПЦР в режиме «реального времени». Результаты и обсуждение. Замедление фазы клеточного цикла G1 при воздействии на клетки линии Jurkat 50 мкМ NaHS сопряжено со снижением содержания фосфорилированной формы белка ретинобластомы. Фосфорилирование последнего возможно при активации циклин-зависимых киназ циклинами. Показано, что сульфид водорода в низкой концентрации вызывает снижение уровня циклина D1 за счет уменьшения экспрессии соответствующего гена.

**Ключевые слова:** сульфид водорода, клеточный цикл, циклин D1, белок ретинобластомы.

Сигнальные свойства сульфида водорода ( $H_2S$ ) были открыты сравнительно недавно. В 1996 г. Abe и Kimura показали, что в клетках мозга присутствуют ферменты, синтезирующие данный газотрансмиттер [3]. В настоящее время определены вазодилататорная и нейротрансмиссионные функции сульфида водорода, мишени (калиевые АТФ-чувствительные каналы) и молекулярные механизмы (сульфидирование, взаимодействие с гемом) действия  $H_2S$  [15]. На разных стадиях клинических испытаний находятся соединения, высвобождающие сульфид водорода [13].

Пристальное внимание исследователей привлекает протекторное влияние  $H_2S$  на клетки при различных патологических состояниях, реализуемое, в частности, за счет восстановительных свойств данного вещества [9, 11]. При этом было показано проапоптотическое действие сульфида водорода в отношении ряда опухолевых линий [5]. Нами установлено, что  $H_2S$  может избирательно индуцировать апоптоз опухолевых клеток, не влияя на «здоровые» клетки [1]. В ряде исследований обнаружено, что сульфид водорода ингибирует прогрессию фаз клеточного цикла, в

частности, за счет активации *p53*-зависимых генов [4, 6]. Chattopadhyay et al. [2012] показали, что  $H_2S$ -высвобождающие нестероидные противовоспалительные агенты эффективно ингибируют рост 11 различных опухолевых клеточных линий за счет ареста фазы клеточного цикла G0/G1 [5].

Регуляция продолжительности фаз клеточного цикла (G1, S и G2) осуществляется на уровне транскрипционного контроля экспрессии циклинов. При этом прогрессия фазы G1 происходит под влиянием циклинов периода G1, которые поддерживают свой синтез на определенном уровне и промотируют прогрессию S-фазы и митотических циклинов, последние репрессируют циклины G1-фазы [14]. Наличие нескольких контрольных «сверочных» точек обеспечивает блок клеточного цикла при повреждении ДНК [8].

Поскольку арест G1-фазы клеточного цикла под действием сульфида водорода может осуществляться как за счет изменения транскрипции генов, кодирующих циклины, так и за счет включения защитных механизмов при повреждении ДНК, необходимо исследование молекулярных механизмов антипролиферативного действия сульфида водорода в отношении опухолевых

*Новицкий В. В.* – д.м.н., проф., академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии, e-mail: rector@ssmu.ru

*Старикова Е. Г.* – к.м.н., интерн кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики, e-mail: to-elen@yandex.ru

*Таширева Л. А.* – интерн кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики, e-mail: lkleptsova@mail.ru

*Рязанцева Н. В.* – д.м.н., проф., зав. кафедрой молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики, e-mail: nv\_ryazan@mail.ru

клеток. Целью настоящего исследования явилась оценка влияния донора  $H_2S$  на экспрессию и содержание циклина D1, уровень циклин-зависимой киназы 4 (Cdk4), фосфорилированной формы белка ретинобластомы (pRb).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клетки линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия) были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Клетки инкубировали при температуре 37 °С в полной питательной среде, содержащей 90 % RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург), инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина. Для определения влияния сульфида водорода на прогрессию фаз клеточного цикла в питательную среду инкубации клеток добавляли донор сульфида водорода (натрия гидросульфид гидрат, «Sigma», США) в концентрации 10 и 1 мМ, 500 и 50 мкМ, продолжительность экспозиции – 24 ч.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили с помощью программного пакета ModFit7 для проточной лазерной цитометрии (Fax Canto2, «Beckton Dickinson», США). Для пермеабилзации и окрашивания клеток использовали набор CycleTestKit («BD Bioscience», США).

Содержание белков-регуляторов клеточного цикла определяли методом вестерн-блот. Равное количество цельноклеточных лизатов подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии 10 % додецилсульфата натрия, затем осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану. Далее мембрану блокировали 1 % желатином, трижды промывали TTBS (20 ммоль/л Tris HCl pH 7,6, 137 ммоль/л NaCl и 0,05 % Tween 20). Затем мембрану инкубировали с первичными антителами к циклину D1, pRb, Cdk4 («Sigma») в течение часа. Трижды промывали TTBS и добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», США). Для визуализации результатов исследования использовали хемилуминесцентный метод («NOVEX ECL Chemiluminescent Substrate Reagent kit», Invitrogen, США). Содержание белков определяли путем подсчета интенсивности полос на рентгеновской пленке с помощью программы TotalLab v.2.01. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфатдегидрогеназу («Chemicon», США), выражая содержание исследуемых протеинов как

отношение сигнала определяемого белка к сигналу глицеро-3-фосфатдегидрогеназы в исследуемых образцах.

Метод ПЦР в режиме «реального времени» использовался для количественного определения уровня мРНК гена, кодирующего циклин D1. Выделение тотальной РНК из клеток осуществляли сорбентно-колоночным методом (QIAmp RNA Blood mini Kit, QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. На следующем этапе синтезировали кДНК на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы. Полученный фрагмент кДНК амплифицировали методом ПЦР в режиме «реального времени» с использованием SYBR Green I («Molecular Probe», США) на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США). Результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации гена «домашнего хозяйства»).

Оценку нормальности распределения полученных результатов проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий ( $p < 0,05$ ) оценивали с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q1–Q3).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Деление клеток состоит из двух основных событий, характеризующихся репликацией ДНК и разделением хромосом на две отдельные клетки. Репликация ДНК происходит в S-фазу интерфазы. Последней предшествует фаза G1, в течение которой клетки подготавливаются к синтезу ДНК. После S-фазы следует G2-стадия, на которой клетки подготавливаются к митозу. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что выбор клеткой пути дифференцировки, пролиферации, апоптоза и старения определяется в течение G1-фазы клеточного цикла. Одним из ключевых различий между «здоровой» и опухолевотрансформированной клеткой является длительность G1. Исследования показывают, что продолжительность G1-фазы опухолевых клеток значительно короче таковой в «нормальных» клетках [10, 12].

Воздействие 50 мкМ и 10 мМ донора сульфида водорода приводило к возрастанию числа клеток, находящихся в G1-фазе клеточного цикла, за счет уменьшения количества Т-лимфобластных лейкоцитов в S-фазе ( $p < 0,05$ ). 24-часовая инкубация клеток с 50 мкМ и 10 мМ NaHS не приво-

дила к изменению числа клеток в G2-фазе клеточного цикла относительно контроля ( $p > 0,05$ ). Распределение клеток по фазам G1, S, G2 клеточного цикла было сопоставимо с таковым в интактной культуре после воздействия 0,5 и 1 мМ NaHS ( $p > 0,05$ ) (см. рисунок). Полученные результаты наводят на мысль о том, что в основе антипролиферативного действия 50 мкМ и 10 мМ сульфида водорода лежат разные молекулярные механизмы. Для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

Переход из одной фазы клеточного цикла в другую происходит в строгом порядке и регулируется рядом внутриклеточных протеинов. Ключевыми белками-регуляторами являются циклин-зависимые киназы (Cdk), представляющие собой семейство серин/треониновых протеинкиназ, активируемых в определенных точках клеточного цикла. В проведенном нами исследовании установлено, что количество циклин-зависимой киназы 4 в интактных клетках линии Jurkat составляло 8,06 (7,65–8,38) усл. ед. Известно, что содержание данного фермента в клетках высококонсервативно и не регулируется на уровне экспрессии [10]. Действительно, воздействие доноров сульфида водорода в обеих концентрациях не влияло на содержание Cdk4 в клетках линии Jurkat ( $p > 0,05$ ) (см. таблицу).

Для активации циклин-зависимых киназ необходимо присутствие циклинов, которые являются необходимыми адаптерами ферментов, активируя их и соединяя с субстратами. Уровень циклинов повышается и снижается по мере прогрессии клеточного цикла, что позволяет данным протеином активировать Cdk в строго определенном порядке [14]. Нами показано, что донор сульфида водорода NaHS в концентрации 50 мкМ снижает содержание белка циклина D1 относительно величины аналогичного параметра в интактной культуре клеток линии Jurkat ( $p < 0,05$ ). В концентрации 10 мМ сульфид водорода вызывал увеличение уровня циклина D1 по сравнению с интактными

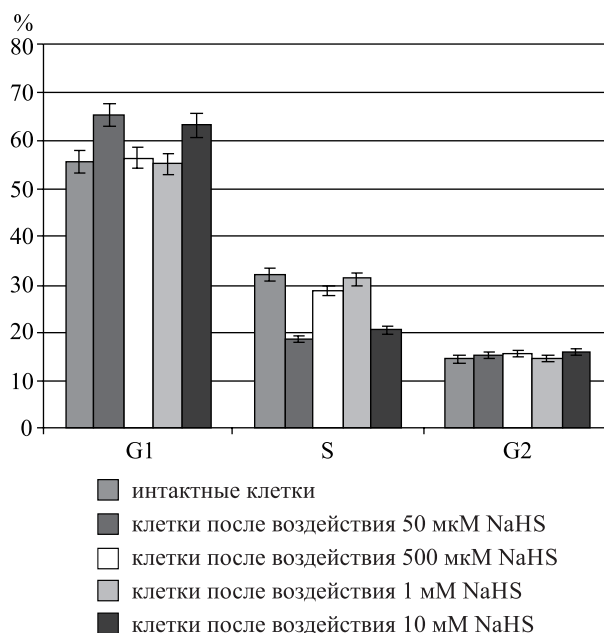


Рис. Распределение клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла под воздействием различных концентраций донора сульфида водорода, Me (Q1–Q3)

клетками ( $p < 0,05$ ) (см. таблицу). Для оценки молекулярных механизмов, лежащих в основе изменения содержания циклина D1 под действием сульфида водорода, сделан анализ ПЦР в режиме «реального времени». В результате показано, что экспрессия мРНК гена, кодирующего изучаемый белок, снижается относительно контроля после обработки клеток NaHS в обеих концентрациях. Таким образом, снижение содержания циклина D1 в клетках при воздействии 50 мкМ донора сульфида водорода опосредовано уменьшением уровня экспрессии соответствующего гена. Установлено, что при действии на клетки 10 мМ NaHS повышается продукция активных форм кислорода, приводящая к эффективному запуску редокс-зависимых сигнальных систем [2]. Возможно, увеличение содержания циклина D1 на

**Таблица**

Содержание белков-регуляторов клеточного цикла и экспрессия мРНК циклина D1 в клетках линии Jurkat после воздействия различных концентраций донора сульфида водорода, Me (Q1–Q3)

Условия эксперимента	Экспрессия мРНК циклина D1, усл. ед.	Содержание pRB, усл. ед.	Содержание Cdk4, усл. ед.	Содержание циклина D1, усл. ед.
Интактные клетки	1,80 (1,321,76)	9,83 (9,22–14,96)	8,06 (7,65–8,38)	9,83 (8,74–15,58)
Клетки после воздействия 10 мМ NaHS	0,62 (0,57–0,69)	24,16* (23,05–25,11)	7,84 (7,52–8,19)	31,09* (27,84–36,48)
Клетки после воздействия 50 мкМ NaHS	0,83 (0,79–0,90)	7,32* (6,90–8,25)	8,31 (8,0–8,59)	0,72* (0,63–0,74)

Примечание. \* – отличие от величины соответствующего показателя интактных клеток статистически значимо при  $p < 0,05$ .

фоне уменьшения экспрессии мРНК соответствующего гена происходит за счет нарушения протеасомальной деградации модифицированного сульфидом водорода и/или активными формами кислорода белка.

После активации Cdk фосфорилируют протеины-мишени, что приводит к дальнейшей прогрессии клеточного цикла. Наиболее изученным субстратом активации комплекса Cdk4/6-циклин D является продукт гена супрессора опухолей (pRb). Ген ретинобластомы локализован на хромосоме 13q14.2 и включает 27 экзонов, занимающих 180 тыс. пар оснований хромосомы 13. Ген продуцирует транскрипт длиной 4,7 тыс. пар оснований, кодирующий 928 аминокислот с молекулярной массой 110 кДа. Rb ингибирует транскрипционные активаторы за счет образования комплекса E2F и инактивации промоторных элементов [7]. В начале G1-фазы pRb становится фосфорилированным, что приводит к распаду комплексов с гистондеацетилазой (HDAC) и высвобождением транскрипционных факторов E2F-1 и DP-1, участвующих в позитивной регуляции генов, продукты которых отвечают за прогрессию S-фазы, включая циклин A, E, CDC 25 [12].

Содержание pRb в клетках после инкубации с 50 мкМ было достоверно ниже, чем в контроле ( $p < 0,05$ ). Следовательно, сульфид водорода в данной концентрации вызывает остановку клеток в G1-фазе клеточного цикла за счет уменьшения фосфорилирования белка ретинобластомы, опосредованного снижением уровня циклина D1 под действием указанного газа. Нами показано, что инкубация клеток линии Jurkat с 10 мМ NaHS приводит к возрастанию содержания фосфорилированного Rb по сравнению со значениями данного показателя в интактной культуре ( $p < 0,05$ ) (см. таблицу). Ранее нами было продемонстрировано, что содержание Cdk4 не изменяется под действием газов, однако концентрация циклина D1, являющегося активатором данного фермента, резко увеличивалась при инкубации клеток с 10 мМ донора сульфида водорода. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в условиях значительного повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода происходит эффективное образование комплексов циклина D1/Cdk4, о чем свидетельствует возрастание содержания фосфорилированного белка ретинобластомы как продукта ферментативной деятельности активированной Cdk4. Однако несмотря на фосфорилирование Rb, отмечено замедление перехода клеток из G1- в S-фазу клеточного цикла под действием сульфида водо-

рода при введении в культуру его донора в концентрации 10 мМ. NaHS в указанной концентрации может вызывать повышение продукции активных форм кислорода, индуцирующих образование двойных разрывов ДНК. Последние активируют сверхочные точки клеточного цикла (пути ATM(ATR)/CHK2(CHK1)-p53/MDM2-p21, ATR/CHK2-CDC25), способные ингибировать прогрессию фаз клеточного цикла [8].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, воздействие сульфида водорода (10 мМ NaHS) на клетки линии Jurkat обуславливает повышение содержания белков, способствующих прогрессии клеточного цикла (циклин D1, pRb). Полученные нами данные об увеличении числа клеток в G1-фазе на фоне возрастания содержания протеинов, промотирующих прогрессию данного этапа клеточного цикла, свидетельствует о том, что сульфид водорода в высокой концентрации обладает генотоксическим эффектом, и задержка клеток в G1-фазе необходима для устранения возникших дефектов.

Донор сульфида водорода в концентрации 50 мкМ вызывал специфическое изменение соотношения белков-регуляторов клеточного цикла, приводящее к задержке клеток в G1 фазе. Данное свойство нуждается в дальнейшем изучении с целью применения доноров сульфида водорода в качестве антипролиферативных агентов.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки России в рамках Федеральных целевых программ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (Государственное соглашение № 8302, Государственный контракт № П1311 и 14.740.11.0932), «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (Государственные контракты № 16.512.11.2087 и № 16.512.11.2282), а также Совета по грантам при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ РФ № 16.120.11.614-НШ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Новицкий В.В. и др. Роль сульфида водорода в регуляции апоптоза клеток // Бюл. эксперим. биол. мед. 2011. 151. (6). 656–659.
2. Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Васильева О.А. и др. Участие редокс-сигнализации в опосредованной газами оксидом азота, монооксидом углерода и сульфидом водорода регуляции апоптоза

и клеточного цикла // Бюл. сиб. мед. 2013. 12. (1). 49–55.

3. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // J. Neurosci. 1996. 76. (3). 1066–1071.

4. Calenic B., Yaegaki K., Ishkitiev N. et al. p53-Pathway activity and apoptosis in hydrogen sulfide-exposed stem cells separated from human gingival epithelium // J. Periodontal Res. 2012. doi: 10.1111/jre.12011.

5. Chattopadhyay M., Kodela R., Olson K.R., Kashfi K. NOSH–aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide- and hydrogen sulfide-releasing hybrid is a potent inhibitor of colon cancer cell growth in vitro and in a xenograft mouse model // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. 419. (3). 523–528.

6. Fan H.N., Wang H.J., Yang-Dan C.R. et al. Protective effects of hydrogen sulfide on oxidative stress and fibrosis in hepatic stellate cells // Mol. Med. Rep. 2012. doi: 10.3892/mmr.2012.1153.

7. Giacinti C., Giordano A. RB and cell cycle progression // Oncogene. 2006. 25. 5220–5227.

8. Kastan M., Bartek J. Cell cycle checkpoints and cancer // Nature. 2004. 432. 316–323.

9. Li L., Rose P., Moore P.K. Hydrogen sulfide and cell signaling // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2011. 51. 169–187.

10. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer // Nature. 2004. 432. (7015). 298–306.

11. Mikami Y., Shibuya N., Kimura Y. et al. Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca<sup>2+</sup> influx // J. Biol. Chem. 2011. 286. 39379–39386.

12. Neganova I., Lako M. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells // J. Anat. 2008. 213. (1). 30–44.

13. Predmore B.L., Lefter D.J. Development of hydrogen sulfide-based therapeutics for cardiovascular disease // J. Cardiovasc. Transl. Res. 2010. 3. 487–498.

14. Sherr C.M., Roberts J.M. Living with or without cyclins and cyclin dependent kinases // Genes. Dev. 2004. 18. 2699–2711.

15. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide // Antioxid. Redox Signal. 2003. 5. 493–501.

## MOLECULAR MECHANISMS OF HYDROGEN SULFIDE REGULATORY INFLUENCE ON CELL CYCLING STATE PROGRESSION

Vyacheslav Viktorovich NOVITSKIY, Elena Grigorievna STARIKOVA,  
Lubov' Aleksandrovna TASHIREVA, Natalia Vladimirovna RYASANTSEVA

Siberian State Medical University of Minzdrav of Russia  
634050, Tomsk, Moskovskiy tract, 2

The aim of the study: identification of molecular mechanisms of hydrogen sulfide influence on cell cycle progression. Material and methods: Jurkat cells were the material of the study. Methods included flow cytometry, western blotting, RT-PCR. Results and discussion: The delay of G1 cell cycle phase connected with the decrease in content of phosphorylated form of retinoblastoma protein in 50 μM NaHS-treated cells. Phosphorylation of retinoblastoma protein takes place when cyclins activate cycline-dependent kinases. It has been shown that hydrogen sulfide in low concentration leads to decrease of cycline D1 level via decrease of respective gene expression.

**Key words:** hydrogen sulfide, cell cycle, cycline D1, retinoblastoma protein.

*Novitsky V.V.* – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, head of the department of pathophysiology, e-mail: rector@ssmu.ru

*Starikova E.G.* – candidate of medical sciences, intern of the department of molecular medicine and clinical laboratory diagnostics, e-mail: to-elen@yandex.ru

*Tashireva L.A.* – intern of the department of molecular medicine and clinical laboratory diagnostics, e-mail: lkleptsova@mail.ru

*Ryasantseva N.V.* – doctor of medical sciences, professor, head of the department of molecular medicine and clinical laboratory diagnostics, e-mail: nv\_ryazan@mail.ru

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПЛАЗМИД МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 1,4 МДа В ШТАММАХ *SALMONELLA ENTERITIDIS*

Алексей Владимирович РАКОВ, Феликс Николаевич ШУБИН,  
Наталья Анатольевна КУЗНЕЦОВА

ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН  
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1

Выполнено ПЦР-типирование 100 штаммов *S. Enteritidis*, содержащих плазмиду молекулярной массой 1,4 МДа (2100 пар оснований), описанную нами ранее в штаммах микроба. Показано ее родство представленной в GenBank плазмиде pJ *S. Enteritidis*, описанной в Чехии. Установлено, что данная плаزمиды в течение 16 лет присутствует в штаммах *S. Enteritidis*, изолированных от больных, из пищевых продуктов и из смывов с объектов внешней среды на административных территориях большинства субъектов РФ в Сибири и на Дальнем Востоке, что подтверждает ее трансконтинентальное распространение.

**Ключевые слова:** *Salmonella Enteritidis*, плазмиды, плазмидный анализ, полимеразная цепная реакция.

Сальмонеллезная инфекция распространена во всех странах мира, причем в последние двадцать пять лет вспышки этой болезни участились, а спорадическая заболеваемость не имеет тенденции к снижению. В большинстве стран мира ведущее значение в заболеваемости сальмонеллезом имеет *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (*S. Enteritidis*).

Для внутривидовой дифференциации сальмонелл используется ряд методов, основанных на исследовании плазмидной и хромосомной ДНК [23]. К первой группе относятся плазмидный анализ и рестрикционный анализ плазмидных ДНК [18, 23]. Вторая группа включает риботипирование [13], IS200-типирование [23], RAPD-типирование [20], пульс-электрофоретическое типирование [23], VNTR-типирование [15] и мультилокусное сиквенс-типирование [12]. При исследовании *S. Enteritidis* методами второй группы была показана высокая клональность популяции микроба [21], что вместе с относительной их дороговизной ограничивает распространение данной группы методов. Поэтому для эпидемиологических исследований часто применяется метод плазмидного анализа [6, 16, 17, 24]. Суть метода состоит в том, что он позволяет дифференцировать бактерии внутри одного серовара по содержанию имеющихся в них мобиль-

ных генетических элементов – плазмид. Каждый отличающийся набор плазмид называется плазмидным типом. При этом *S. Enteritidis*, согласно исследованиям, отличается достаточно большим разнообразием плазмидных типов [5, 14, 17–19]. Плазмидный анализ для типирования сальмонелл характеризуется хорошей воспроизводимостью результатов, достаточной разрешающей силой, сравнительной легкостью выполнения и интерпретации полученных данных, а плазмиды содержатся у большинства штаммов сальмонелл [5, 17]. Была показана устойчивость наследования плазмид в штаммах *S. Enteritidis* на протяжении длительного периода наблюдений [5, 18]. Однако некоторые исследователи утверждали, что плазмиды, являясь мобильными генетическими элементами, могут утрачиваться, приобретаться и передаваться от сальмонелл и обратно к другим видам семейства *Enterobacteriaceae* [7, 22].

Все плазмиды условно можно разделить на высоко- и низкомолекулярные. К высокомолекулярным плазмидам относятся, например, плазмиды вирулентности массой 38 МДа (57 000 пар оснований (п. о.)), встречающаяся у большинства штаммов *S. Enteritidis* [4, 8, 9], и плазмиды антибиотикорезистентности, которые у *S. Enteritidis* выявляются редко [5, 16, 18]. Наибольший интерес представляют низкомолекулярные плазмиды,

**Раков А.В.** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии,  
e-mail: vokar@mail333.com

**Шубин Ф.Н.** – д.м.н., проф., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии, e-mail: shubin@inbox.ru

**Кузнецова Н.А.** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии,  
e-mail: kuznetsovanata@mail.ru

которые могут играть роль эпидемиологических маркеров возбудителя [5, 17, 18]. Наиболее часто встречающейся из них является небольшая плаزمид молекулярной массой 1,4 МДа (2100 п. о.) [5, 10, 24]. Данная плаزمид была исследована нами методом рестрикционного анализа с использованием эндонуклеазы рестрикции TaqI. Был показан одинаковый рестрикционный профиль этой плазмиды как в составе плазмидного типа 38:1,4 МДа, так и в штаммах микроба, содержащих единственную плазмиду 1,4 МДа (2100 п. о.) [5].

Штаммы *S. Enteritidis*, содержащие плазмиду с похожей молекулярной массой, выделялись также в Чехии [10], Турции [24] и Пакистане [19]. Все это свидетельствует о широкой распространенности плазмид данной молекулярной массы в штаммах микроба, однако, несмотря на схожесть по молекулярной массе, их нуклеотидная последовательность может отличаться.

D. Gregorova и соавт. [10] изучали структуру и функции низкомолекулярных плазмид *S. Enteritidis* с использованием методов ДНК-гибридизации и секвенирования. Они разделили их на три группы – ColE1, ColE2 и плазмиды, реплицирующиеся по механизму «катящегося круга». При этом две родственные плазмиды третьей группы pV и pJ с молекулярной массой соответственно 1983 и 2096 п. о. были отнесены к самым маленьким из обнаруженных плазмид у серовара *S. Enteritidis*. Они были похожи по нуклеотидным последовательностям, содержали значительные по протяженности общие консервативные фрагменты, но отличались между собой наличием замков отдельных нуклеотидов и нескольких делеций у плазмиды pV.

Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение плазмид pV и pJ, описанных в GenBank, и выявленных нами плазмид с молекулярной массой 1,4 МДа (2100 п. о.), а также их распространение в штаммах *S. Enteritidis*, изолированных из различных экологических источников в разное время на территории Сибири и Дальнего Востока.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования было отобрано 100 штаммов *S. Enteritidis*, содержащих плазмиду с молекулярной массой 1,4 МДа (2100 п. о.), что было выявлено путем плазмидного анализа. Штаммы были выделены от больных (72 штамма), из пищевых продуктов предприятий промышленного птицеводства и из полуфабрикатов в розничной торговле (20 штаммов), из смывов с объектов внешней среды (8 штаммов) в период с 1997 по

2012 г. в Приморском крае (37 штаммов), Магаданской (1 штамм), Иркутской (56 штаммов), Новосибирской (1 штамм), Омской (1 штамм) областях, Республике Саха (Якутия) (3 штамма) и Республике Бурятия (1 штамм). Идентификацию сальмонелл проводили общепринятыми методами [1].

Определение спектра плазмид в штаммах сальмонелл проводили методом щелочного лизиса [11]. Известные плазмиды RP4 (38 МДа), pBR322 (2,9 МДа) и pVM82 (82 МДа) использовали как стандарты для молекулярной массы.

Плазмидную ДНК для ПЦР выделяли с использованием наборов AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (AxyGen Scientific Inc., США). ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Реакцию выполняли в объеме 25 мкл с использованием набора GoTaq PCR Core System II (Promega Inc., США). Программа состояла из следующих этапов: 1 цикл 94 °С 5 минут, 30 циклов 94 °С 1 минута, 50 °С 1 минута, 72 °С 1 минута и 1 цикл 72 °С 5 минут. Электрофорез продуктов ПЦР вели в 1 % агарозном геле (Serva Electrophoresis GmbH, ФРГ) и в 1× трисборатном буфере. Гели окрашивали в бромистом этидии и фотографировали в УФ-свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat TFX-20M (Франция). В качестве маркера молекулярного веса использовали 100bp+2kb+3kb DNA ladder (СибЭнзим, Россия). В качестве отрицательных контролей для ПЦР было использовано 11 штаммов *S. Enteritidis* плазмидных типов, не содержащих плазмиду 1,4 МДа (2100 п. о.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование штаммов *S. Enteritidis* в плазмидном анализе показало, что они относились к 11 плазмидным типам. Из них 78 штаммов относились к плазмидному типу 38:1,4 МДа, 4 штамма – 38:26:1,4 МДа, 3 штамма – 38:30:1,4 МДа, 2 штамма – 38:2,6:1,4 МДа, 3 штамма – 38:3,2:2,9:1,4 МДа, 2 штамма – 38:3,0:1,4 МДа, 4 штамма – 60:38:1,4 МДа и по 1 штамму плазмидных типов 50:38:1,4 МДа, 38:3,5:1,4 МДа, 2,3:1,4 МДа, 3,4:1,4 МДа. Общим для всех исследованных штаммов было присутствие в них плазмиды молекулярной массой 1,4 МДа (2100 п. о.).

Проведенный анализ базы данных GenBank показал наличие в нем двух плазмид с молекулярной массой, схожей с нашей плазмидой. Это плазмиды pV и pJ молекулярной массой 1983 п. о. (Acc. No. AY178821) и 2096 п. о. (Acc. No. AF268389) соответственно. Их последовательности из GenBank в дальнейшем были использованы для подбора праймеров.

Для первичного исследования, относится ли плазида молекулярной массой 1,4 МДа (2100 п. о.) из исследуемых штаммов *S. Enteritidis* к какой-либо из плазмид рJ или рВ, мы подобрали пары праймеров, расположенные в различных областях плазмид (табл. 1). Подобранные пары праймеров можно разделить на три группы: 1) 2 пары праймеров, общих для обеих плазмид (рВJ1F/рВJ1R и рВJ2F/рВJ2R); 2) специфические праймеры на каждую из плазмид (рВF/рВR и рJF/рJR); 3) дифференцирующие праймеры (рВрJF/рВрJR). Дифференцирующие праймеры были подобраны таким образом, что они находились в консервативных для обеих плазмид областях, а амплифицируемый фрагмент содержал переменную часть, варьирующую по молекулярной массе в зависимости от того, какая плазида содержится в штамме микроба – для плазмиды рВ размер ампликона составил 469 п. о., а для плазмиды рJ – 574 п. о. Эти различия длины ампликонов обусловлены наличием у плазмиды рВ нескольких делеций.

Для проверки специфичности всех пар праймеров были отобраны три штамма *S. Enteritidis*, содержащих единственную плазмиду массой 1,4 МДа (2100 п. о.). Эти штаммы выделены в Приморском крае и в Омской области в 2010 г. от больного и из двух проб продуктов. Все они давали положительную реакцию с праймерами, специфическими для плазмиды рJ, и не реагировали со специфическими праймерами на плазмиду рВ. Реакция с обоими общими праймерами также дала положительный результат. ДНК всех трех исследованных штаммов *S. Enteritidis* в ПЦР с дифференцирующими праймерами рВрJ давала фрагмент молекулярной массой 574 п. о.,

характерный для плазмиды рJ. Таким образом, выделенные нами плазмиды из трех штаммов *S. Enteritidis* являются родственными ранее описанной плазмиде рJ, а не плазмиде рВ.

Следующим этапом было исследование оставшихся отобранных 97 штаммов *S. Enteritidis*. Для этой цели нами была использована пара дифференцирующих праймеров рВрJ. Исследование штаммов *S. Enteritidis* с дифференцирующими праймерами рВрJ показало, что во всех штаммах амплифицировался фрагмент массой 574 п. о., характерный для плазмиды рJ, и ни один из штаммов не дал амплификации фрагмента массой 469 п. о., свойственного плазмиде рВ (табл. 2). Следовательно, плазида массой 1,4 МДа (2100 п. о.), содержащаяся во всех исследованных штаммах *S. Enteritidis* 11 плазмидных типов, относится к плазмиде рJ. Для проверки специфичности реакции ПЦР с дифференцирующими праймерами было исследовано 11 штаммов *S. Enteritidis* других плазмидных типов, не содержащих плазмиду массой 1,4 МДа: 38 МДа, 38:2,3 МДа, 38:2,6 МДа. Ни с одним из этих штаммов не выявили амплификации какого-либо фрагмента.

Плазида массой 1,4 МДа (2100 п. о.) достаточно широко распространена в штаммах *S. Enteritidis*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока [2, 5, 6]. Наиболее полно ее распространение можно проследить на штаммах, выделенных в Приморском крае. Плазида массой 1,4 МДа обнаружена у 30,9 % от всех исследованных штаммов за весь период наблюдений с 1995 г., когда впервые она была выявлена у приморских штаммов [3]. При этом основным плазмидным типом, содержащим данную плазмиду,

Таблица 1

Праймеры, использованные для анализа плазмиды 1,4 МДа

Название праймера	Последовательность	Фрагмент / Место расположения в плазмиде	Характеристика
рВJ1F	CGCGCATCCCCACTTCCACACC	505 п. о. / 580–1086 п. о.	Общие для рВ и рJ
рВJ1R	CCCGACACCCCGTAGCCTGATTC		
рВJ2F	GGGGTGAAAGTCTGTGGATG	500 п. о. / 1701–215 п. о.	Общие для рВ и рJ
рВJ2R	GCCCCGTAGCGCTCATATTC		
рВF	TTCAGGGCTGGATCCGCACAA	732 п. о. / 532–1264 п. о.	Специфичные для рВ
рВR	AACTGGCAGTCGGGGAATCTCACG		
рJF	ACCGCACGACAAACGAACCTAA	236 п. о. / 1200–1435 п. о.	Специфичные для рJ
рJR	CCCACATAATCACCCACAATC		
рВрJ-F	AATCCCCGCCGTTTCTCG	469 п. о. для рВ, 574 п. о. для рJ / 1164–1738 п. о.	Дифференцирующие рВ и рJ
рВрJ-R	TTTTCCCCGTGCCGTCGTCAATC		

Примечание. Праймеры подобраны в лаборатории в соответствии с нуклеотидными последовательностями плазмид рВ (Acc. No. AY178821) и рJ (Acc. No. AF268389).



Таблица 2

Характеристика исследованных штаммов *S. enteritidis*, содержащих плазмиду молекулярной массой 1,4 МДа

Год	Плазмидные типы (МДа)	Количество штаммов	Источник выделения			Размеры ампликонов, образующихся с дифференцирующими праймерами, рВ – 469 п. о. / рJ – 574 п. о.
			больные	продукты	внешняя среда	
1997	38:1,4	3	3	0	0	574
1998	38:3,0:1,4	1	1	0	0	574
1999	38:1,4	1	0	0	1	574
2000	38:1,4	4	2	2	0	574
2001	38:1,4	6	0	6	0	574
2003	38:1,4	5	2	2	1	574
	38:26:1,4	1	1	0	0	574
	38:3,5:1,4	1	1	0	0	574
	38:3,2,2,9:1,4	1	1	0	0	574
2004	38:2,6:1,4	1	1	0	0	574
2005	38:1,4	2	2	0	0	574
	38:26:1,4	1	1	0	0	574
2006	38:1,4	1	0	1	0	574
2007	38:1,4	27	17	5	5	574
	38:26:1,4	1	1	0	0	574
2008	38:1,4	2	1	1	0	574
2009	38:1,4	3	3	0	0	574
2010	38:1,4	8	6	2	0	574
	38:30:1,4	1	1	0	0	574
	38:2,6:1,4	1	1	0	0	574
	38:3,2,2,9:1,4	2	2	0	0	574
	60:38:1,4	1	1	0	0	574
	2,3:1,4	1	1	0	0	574
2011	38:1,4	16	14	1	1	574
	38:30:1,4	1	1	0	0	574
	60:38:1,4	3	3	0	0	574
	3,4:1,4	1	1	0	0	574
2012	38:3,0:1,4	1	1	0	0	574
	38:26:1,4	1	1	0	0	574
	38:30:1,4	1	1	0	0	574
	50:38:1,4	1	1	0	0	574
Всего	11	100	72	20	8	574

является тип 38:1,4 МДа (28,71 % от всех исследованных штаммов). В ПЦР нами исследовано 23 штамма микроба, выделенные в Приморском крае с 1997 по 2011 г. из различных экологических источников – от больных (10 штаммов), из продуктов (11 штаммов) и из смывов с объектов внешней среды (2 штамма). Кроме того, исследовано 55 штаммов, выделенных в других субъектах Сибири и Дальнего Востока на протяжении 9 лет. Во всех случаях в штаммах плазмидного типа 38:1,4 МДа, изолированных от больных, из пищевых продуктов и из объектов внешней среды во всех изученных регионах, они были родственны именно плазмиде рJ.

Кроме того, исследованы штаммы 10 других плазмидных типов, содержащих плазмиду массой 1,4 МДа (см. табл. 2). При этом все 22 штамма были выделены от больных с 1998 по 2011 г., из них 14 штаммов – от больных в Приморском крае, 6 штаммов – от больных в Иркутской области, по одному – от больных из Магаданской области и из Республики Саха (Якутия). Плазмида 1,4 МДа (2100 п. о.) прослежена в штаммах микроба плазмидного типа 38:1,4 МДа на протяжении 16 лет, а в штаммах остальных плазмидных типов – в основном более 3–8 лет. Во всех случаях исследование штаммов в ПЦР с дифференцирующими праймерами рVrJ приводило к

амплификации фрагмента ДНК массой 574 п. о., что указывало на родство плазмиды 1,4 МДа именно плазмиде рJ.

Таким образом, разработанные нами праймеры доказали свою специфичность для плазмиды рJ молекулярной массой 2096 п. о. Все исследованные штаммы *S. Enteritidis* независимо от плазмидного спектра штаммов, времени, места и источника выделения содержали плазмиду массой 1,4 МДа, родственную ранее описанной плазмиде рJ.

Следовательно, можно говорить о трансконтинентальном распространении данной плазмиды на евразийском континенте, поскольку штаммы, содержащие плазмиду рJ, выделены в Чехии, а родственные ей штаммы с плазмидой молекулярной массой 1,4 МДа – в Сибири и на Дальнем Востоке России.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют нам говорить о том, что плаزمида молекулярной массой 1,4 МДа, обнаруженная в штаммах различных плазмидных типов *S. Enteritidis*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке, является родственной плазмиде рJ. При этом плазмиды 1,4 МДа обнаружены в штаммах *S. Enteritidis* различного происхождения (больные, продукты питания, внешняя среда) на протяжении 16 лет наблюдений. Учитывая тот факт, что плазмиды рJ выделены от больных в Чехии, а исследованные нами штаммы – от больных и из продуктов животного происхождения в Сибири и на Дальнем Востоке, можно полагать, что ареал распространения данной плазмиды носит трансконтинентальный характер.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голубева И.В., Килессо В.А., Киселева Б.С. и др. Энтеробактерии. Руководство для врачей. М., 1985. 320 с.
2. Кузнецова Н.А., Шубин Ф.Н., Раков А.В. и др. Возрастная структура сальмонеллеза, вызванного доминирующими плазмидоварами *Salmonella enteritidis*, в г. Владивостоке // Тихоокеан. мед. журн. 2006. (3). 80–82.
3. Раков А.В., Шубин Ф.Н., Иванис В.А. и др. Сравнительная характеристика сальмонеллеза, вызванного различными плазмидоварами *Salmonella enteritidis* // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2001. (5). 50–54.
4. Раков А.В. Микробиолого-клинические параллели при сальмонеллезной инфекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2003.
5. Шубин Ф.Н., Ковальчук Н.И., Кузнецова Н.А. и др. Микробиологический мониторинг за *Salmo-*

*nella enteritidis* в Приморском крае. Фенотипическая и плазмидная характеристика возбудителя // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002. (1). 36–40.

6. Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А. Микробиологический молекулярно-генетический мониторинг за возбудителями кишечных инфекций как составная часть эпидемиологического надзора // Бюл. СО РАМН. 2011. (4). 100–106.

7. Boyd E.F., Hartl D.L. Recent horizontal transmission of plasmids between natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* // J. Bacteriol. 1997. 179. (5). 1622–1627.

8. Boyd E.F., Hartl D.L. *Salmonella* virulence plasmid. Modular acquisition of the *spv* virulence region by an F-plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates // Genetics. 1998. 149. (3). 1183–1190.

9. Chiu C.H., Ou J.T. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay // J. Clin. Microbiol. 1996. 34. (10). 2619–2622.

10. Gregorova D., Matiasovicova J., Sebkova A. et al. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis harbours ColE1, ColE2, and rolling circle-like replicating plasmids // Can. J. Microbiol. 2004. 50. (2). 107–112.

11. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. 1981. 145. (3). 1365–1373.

12. Kotetishvili M., Stine O.C., Kreger A. et al. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains // J. Clin. Microbiol. 2002. 40. (5). 1626–1635.

13. Landeras E., Mendoza M.C. Evaluation of PCR-based methods and ribotyping performed with a mixture of PstI and SphI to differentiate strains of *Salmonella* serotype Enteritidis // J. Med. Microbiol. 1998. 47. (5). 427–434.

14. Liebana E., Garcia-Migura L., Breslin M.F. et al. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting // J. Clin. Microbiol. 2001. 39. (1). 154–161.

15. Ramisse V., Houssu P., Hernandez E. et al. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes // J. Clin. Microbiol. 2004. 42. (12). 5722–5730.

16. Ridley A.M., Threlfall E.J., Rowe B. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis // J. Clin. Microbiol. 1998. 36. (8). 2314–2321.

17. Rivera M.J., Rivera A., Castillo J. et al. Plasmid profile in epidemiological studies of human *Salmonella* infections // J. Chemother. 1993. 5. (Suppl. 1). 288–290.

18. Rychlik I., Karpiskova R., Faldynova M. et al. Computer-assisted restriction endonuclease analysis of plasmid DNA in field strains of *Salmonella enteritidis* // Can. J. Microbiol. 1998. 44. (12). 1183–1185.
19. Sajid S.U., Schwarz S. Plasmid fingerprinting and virulence gene detection among indigenous strains of *Salmonella enterica* serovar enteritidis // J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad. 2009. 21. (2). 83–86.
20. Soto S.M., Guerra B., González-Hevia M.A. et al. Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes // Appl. Environ. Microbiol. 1999. 65. (11). 4830–4836.
21. Spratt B.G., Maiden M.C.J. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1999. 354. (1384). 701–710.
22. Winokur P.L., Vonstein D.L., Hoffman L.J. et al. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. 45. (10). 2716–2722.
23. Winokur P.L. Molecular epidemiological techniques for *Salmonella* strain discrimination // Front Biosci. 2003. (8). c14–c24.
24. Us E., Erdem B., Tekeli A. et al. Investigation of *Salmonella* serotype Enteritidis isolates by plasmid profile analysis and pulsed field gel electrophoresis // Mikrobiol. Bul. 2011. 45. (2). 210–227.

## HETEROGENEITY OF 1.4 MDA PLASMIDS IN *SALMONELLA* ENTERITIDIS STRAINS

Aleksey Vladimirovich RAKOV, Feliks Nikolayevich SHUBIN, Natalia Anatolievna KUZNETSOVA

FSBI «RI for Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov» of SB RAMS  
690087, Vladivostok, Selskaya str., 1

---

The PCR typing of 100 *S. Enteritidis* strains containing plasmid 1.4 MDa (2.100 bp) described earlier in microbe strains has been carried out. Its relatedness to *S. Enteritidis* pJ plasmid from GenBank described in Czech Republic has been revealed. It has been established that this plasmid presents within 16 years in *S. Enteritidis* strains isolated from patients, food, and environmental swabs at administrative territories of majority of Siberia and the Far East of Russian Federation subjects that confirms its transcontinental distribution.

---

**Key words:** *Salmonella* Enteritidis, plasmid, plasmid analysis, polymerase chain reaction.

**Rakov A.V.** – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of molecular epidemiology,  
e-mail: vokar@mail333.com

**Shubin F.N.** – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of molecular epidemiology,  
e-mail: shubin@inbox.ru

**Kuznetsova N.A.** – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of molecular epidemiology,  
e-mail: kuznetsovanata@mail.ru

## ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ НЕКРОТИЗИРУЮЩИЙ ФАКТОР *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, ВОЗБУДИТЕЛЯ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ СКАРЛАТИНОПОДОБНОЙ ЛИХОРАДКИ

Елена Викторовна ПЕРСИЯНОВА<sup>1</sup>, Руслан Ренатович АДГАМОВ<sup>2</sup>,  
Алексей Константинович СУРИН<sup>3,4</sup>, Екатерина Константиновна ПСАРЁВА<sup>1</sup>,  
Светлана Александровна ЕРМОЛАЕВА<sup>2</sup>, Нэлли Фёдоровна ТИМЧЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН  
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1

<sup>2</sup> ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН  
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>3</sup> ФГБУН Институт белка РАН  
142290, г. Пущино, ул. Институтская, 4

<sup>4</sup> ФГБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии  
и биотехнологии Минздрава России  
142279, пос. Оболенск

---

В статье представлены материалы по выделению и очистке цитотоксического некротизирующего фактора *Yersinia pseudotuberculosis*, его идентификации методом масс-спектрометрии, молекулярно-генетической характеристике двух доменов гена этого токсина, в том числе функционально значимого, в штаммах *Yersinia pseudotuberculosis*, изолированных от больных, мелких мышевидных грызунов и из окружающей среды в Российской Федерации.

---

**Ключевые слова:** *Yersinia pseudotuberculosis*, штамм, цитотоксический некротизирующий фактор, белок, ген.

В современных условиях бактериальные инфекции представляют глобальную проблему. Стало очевидным, что остановить процесс их распространения среди населения и существенно повлиять на заболеваемость к настоящему времени не удалось. Более того, имеет место появление новых и возвращение старых инфекций. Ярким примером существования таких проблем служат возбудители чумы и псевдотуберкулеза (*Yersinia pestis* и *Y. pseudotuberculosis*). Это заставляет исследователей искать причины появления такой высокой агрессивности у возбудителей.

В середине XX столетия на Дальнем Востоке России (Приморский край) начали регистрироваться многочисленные вспышки ранее неизвестного заболевания, названного до выяснения его этиологии дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой (ДСЛ) [2]. Как обнаружено, возбудителем этого заболевания, протекающего с тяжелой клинической картиной и рецидивами, является *Y. pseudotuberculosis* [1]. Наблюдения позволили сформулировать положение, что ДСЛ – это острая инфекционная болезнь, характеризующаяся циклическим течением, инток-

---

**Персиянова Е.В.** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экологии патогенных бактерий,  
t-mail: Helen-pers@yandex.ru

**Адгамов Р.Р.** – младший научный сотрудник лаборатории экологии возбудителей инфекций,  
e-mail: bacter@yandex.ru

**Сури́н А.К.** – к.ф.-м.н., научный сотрудник лаборатории физики белка,  
e-mail: alexey\_surin@mail.ru

**Псарёва Е.К.** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенности бактерий,  
e-mail: katehok\_84@mail.ru

**Ермолаева С.А.** – д.м.н., проф., зав. лабораторией экологии возбудителей инфекций,  
e-mail: sveta@ermolaeva.msk.su

**Тимченко Н.Ф.** – д.м.н., проф., зав. лабораторией молекулярных основ патогенности бактерий,  
e-mail: ntimch@mail.ru

сикацией, лихорадкой, экзантемой и преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта, печени и суставов.

Возбудитель ДСЛ продуцирует факторы патогенности с инвазивной, антифагоцитарной и токсической функциями, кодируемыми хромосомными и плазмидными (*pYV*) генами [3]. В этой статье внимание сосредоточено на одном из недавно открытых белковых токсинов *Y. pseudotuberculosis* – цитотоксическом некротизирующем факторе (cytotoxic necrotizing factor, CNF) [9]. Авторы сообщили, что экстракты из *Y. pseudotuberculosis* индуцируют увеличение размеров и многоядерность клеток HEp-2, подобно цитотоксическому некротизирующему фактору *E. coli*. Активность препаратов не зависела от присутствия плазмиды вирулентности (*pYV*) и не ингибировалась антителами, способными нейтрализовать CNF1 *E. coli*. Также было выявлено, что нуклеотидная последовательность гена *cnfY. pseudotuberculosis* на 65,1 % идентична гену *cnfE. coli*.

В следующие 10 лет появились статьи, в которых были представлены материалы по изучению механизмов действия этого токсина иерсиний, его роли в вирулентности бактерий и в развитии патологического процесса при псевдотуберкулезе [5–8, 10]. Стало ясно, что CNF *Y. pseudotuberculosis* является белком молекулярной массой около 115 кДа [6]. Несмотря на достигнутые успехи в изучении CNF *Y. pseudotuberculosis*, остается много вопросов, на которые пока нет ответов. Прежде всего это касается возможной роли данного фактора патогенности в появлении нового клона *Y. pseudotuberculosis* – возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки [4].

В связи с новыми фактами в настоящее время актуально исследование названного фактора патогенности в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих в России, а также его вклада в развитие патологического процесса при псевдотуберкулезе.

Целью работы явился поиск в штаммах *Y. pseudotuberculosis* цитотоксического некротизирующего фактора, выделение и идентификация этого белка, исследование варибельности доменов гена *cnfY*, в том числе функционально значимого.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали 102 штамма *Y. pseudotuberculosis* (коллекция ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН), выделенные от больных людей, мелких мышевидных грызунов,

рыб, из внешней среды в различных регионах России за период 1967–2008 гг. Бактерии выращивали на питательном агаре при температуре +37 °С в течение 20–24 ч. Белок выделяли из *Y. pseudotuberculosis* (штамм 2517, III серовар, коллекция Института им. Л. Пастера, Франция), определяли его молекулярную массу [3].

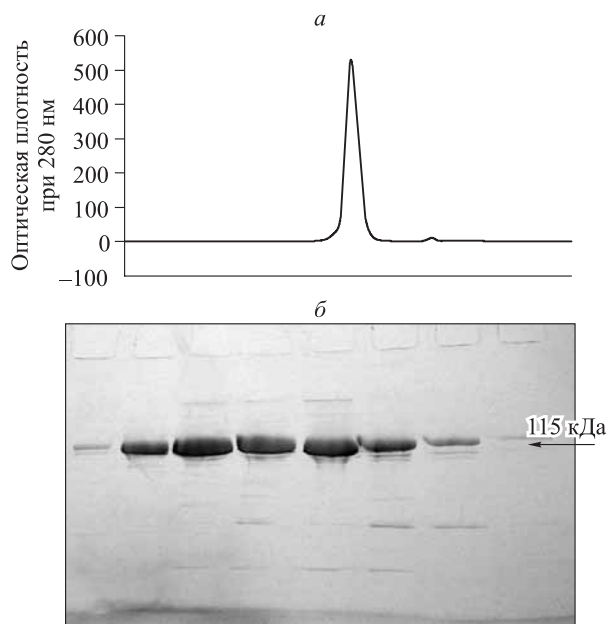
Из окрашенного геля после электрофореза вырезали фрагмент, содержащий интересующий нас белок. Гель отмывали, высушивали на вакуумном концентраторе (Eppendorf 5301, Германия), добавляли раствор протеазы (трипсин) из расчета 1:100 и инкубировали 24 ч. Полученные в результате гидролиза белка пептиды экстрагировали из геля, смесь пептидов наносили на колонку с обращенной фазой, состыкованную с масс-спектрометром (LCQ Deca XP, Thermo Finnigan, Германия). Пептиды смывали градиентом ацетонитрила. Смываемые с колонки пептиды в автоматическом режиме поступали в масс-спектрометр для анализа методом tandemной масс-спектрометрии. В результате для каждого набора пептидов были получены величины их молекулярных масс и масс-спектры фрагментации ионов пептидов. Фрагментацию проводили столкновением с инертным газом (гелием). Данные анализировали с помощью поисковой программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

Для амплификации и секвенирования фрагментов гена *cnfY* использовали две пары праймеров: 5'-GCA-GGT-GGG-AGC-AAC-AAA-GAT (*CnfF*) и 5'-CAG-GAG-CGA-ACA-ACT-AAA-TGG-AA (*CnfR*), 5'-TGC-ATC-GTC-AAT-AAA-AGG-AGT-GTT (*Cnf-1*) и 5'-AAT-TTT-GGT-TTT-ACT-GGT-GGT-TCA (*Cnf-2*). Программы ПЦР – для 1-го фрагмента гена *cnfY* (функционально-значимого домена) [5] и для 2-го фрагмента гена *cnfY* [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографическое выделение CNF *Y. pseudotuberculosis* включало в себя несколько этапов. На первом этапе фракцию белков, полученную из лизата клеток *Y. pseudotuberculosis*, после высаливания 50 % сульфатом аммония наносили на колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенную 10 мМ Tris-HCl буфером, pH 7,3. При элюции в линейном градиенте NaCl (от 0,0 до 0,5 М) фракции CNF обнаруживали в диапазоне концентрации хлорида натрия от 0,2 до 0,5 М. Электрофоретическое исследование этих фракций выявило наличие более 20 белковых компонентов.

Второй этап очистки CNF проведен на колонке с анионитом Mono Q, уравновешенной



**Рис. 1.** Хроматографическое выделение белка CNF *Y. pseudotuberculosis* с помощью высокоэффективной гельфильтрации на колонке Superose 6. *a* – профиль элюции препарата; *б* – электрофореграмма фракций элюируемого пика

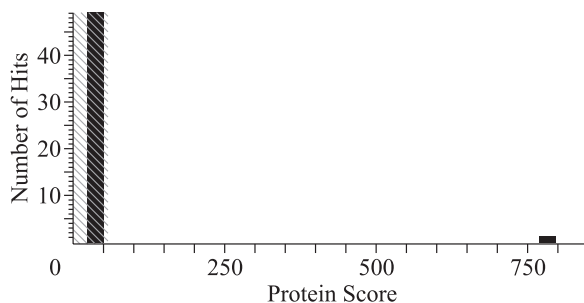
буфером 20 мМ Tris-HCl, pH 7,6. Элюируемый в середине линейного градиента NaCl (от 0,0 до 0,6 М) преобладающий пик содержал CNFY с примесью других белков. Окончательную очистку осуществляли на колонке Superose 6. Буфер содержал 20 мМ Tris-HCl, 0,1 М NaCl, pH 7,6. В результате высокоэффективной гельфильтрации элюируемый (в течение 80 минут) CNF вышел одним симметричным пиком с 34 по 45 минут, а SDS-электрофорез выделенных фракций показал наличие 4–6 минорных белковых компонентов и одного мажорного белка молекулярной массой около 110–115 кДа (рис. 1). Таким образом, нами был получен препарат для дальнейшего исследования его методом tandemной масс-спектрометрии.

При идентификации мажорного белка установлено, что он является цитотоксическим некротизирующим фактором *Y. pseudotuberculosis* молекулярной массой 114479 Да. Как показано на рис. 2, столбец с правой стороны гистограммы соответствует степени достоверности идентификации белка (Protein score), рассчитанной для данного эксперимента. Степень достоверности свидетельствует о полном соответствии искомого белка цитотоксическому некротизирующему фактору, белку из *Y. pseudotuberculosis*.

На рис. 3 представлена последовательность узnanного белка. Курсивом обозначены пептиды, идентифицированные методом масс-

Mascot Search Results:  
Database: NCBIInr 20110924 (15334873 sequences;  
5258635425 residues)  
Taxonomy: Bacteria (Eubacteria) (8877447 sequences)  
Protein hits: cytotoxic necrotizing factor [*Yersinia pseudotuberculosis*]

Mascot Score Histogram:  
Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
Individual ions scores > 58 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**Рис. 2.** Результаты поиска по базе белковых последовательностей для масс-спектров фрагментации ионов пептидов

спектрометрии. Для этих пептидов показано полное соответствие последовательностей, полученных из масс-спектрометрических экспериментов и последовательности белка.

В продолжение развития вопроса о CNF *Y. pseudotuberculosis* с помощью молекулярно-генетических методов исследованы штаммы, выделенные из разных источников и регионов Российской Федерации. Фрагмент гена, кодирующего функциональный домен изучаемого белка, амплифицирован в ПЦР, определена последова-

```

1 MKNQWQHGYF LSYSELVANF PSEKVVSDY IKHKFSTTLP WFGWADPDNL
51 YFIRFTQSRN NNSYTGWDH LGKYAIEITL LTQAAIVNIG SR FDIFDEAN
101 STAGIYKTNN ADSFDETNEA KMLPSEYLYF LRDCDFSNLY NKALS DYWAE
151 NYKFFSTLLQ NYISSAYYL YKDSAISKDE YEFSDAIFN KKSILRYFF
201 DVYGYSSDM FVAMNDNKT M LFIGPATNPF IFADNITDLR DKIK ALISDK
251 NTRELFSKHF SLYDRQDGT YLGVNSMLEQ IVSGVVDYNY IMYSNKNIRE
301 RNVFGSMAPS TRERSFNDGD VIIKSNAEVQ RYALNLVLT ILSLSPIFDI
351 VLPEVSIPI S LGITASSVGI SFDELINGDT YEERRSAPIG LATNTVLLGI
401 SFAIPFLISK AEENKLIINN LVGSDENILN KNNLGDPLEK YNISESDIPE
451 NGSLVINLKN TNVVRLVKL NDEEGEIVAI KGSTLSGIYY EVDTEGYEI
501 LSRRVERTEY NEK IYVTRGG GLKGGQPFNF EGLDIPVYFI DKPYSELASS
551 VELSFVNDSS PLLFPEDMSR LPKPTPELDI KYYSNLSSF KEDTVILMR G
601 TTEEEAWNIA NYKTAGGSNK DLEENFIEAG PQFNLSFSEY TSSINSADTA
651 SRKHFVLIK VQVKYISNDN VLYANHWAI P DEAPVEVLAV VDRRFIPEP
701 PVKPKLSFTQ KIANRFLTEN VAEISSINFR RLNSGNINVL KGRGVFSSRR
751 LREIYLRFDA ANADELRPGD VYVKKTKFDS MGYDSHFYNE GIGINGAPTL
801 NTYTGEYVAD SSSQGATYWL KYNLTNETSI IKVSNSARGA NGIKIALEEI
851 EENKPVVITS GLTGCTVVF ARKGEYFYAV HTGNSESLIG FTSTSGVAKA
901 IEVLSSELSEL EVPALPDVIN NNTLVEYLSL NFDALISYS SSSLKPNMSI
951 NISRENVSTF SYTTDDIQLP SFGTSVTILV RTNDNTVVRS LSESYTMNSN
1001 SSKMVVFNVL QKDF
    
```

**Рис. 3.** Последовательность cytotoxic necrotizing factor из *Y. pseudotuberculosis*. Курсивом выделены части последовательности, которые соответствуют полученным масс-спектрам фрагментации

тельность ампликона. Длина фрагмента гена *cnfY* составила 1041 пару нуклеотидов (п. н.).

При анализе последовательности гена *cnfY* у подавляющего большинства штаммов выявлена делеция фрагмента, кодирующего функциональный Rho-домен, вовлекаемый непосредственно в белок-белок взаимодействие с Rho GTF-зами. Сайт делеции размером 946 п.н. картирован. Полноразмерная копия гена *cnfY* была выявлена только у двух штаммов из всей коллекции. Первый штамм выделен на Дальнем Востоке Российской Федерации (Приморский край) из смыва с капусты, являющейся одним из основных факторов передачи *Y. pseudotuberculosis* при ДСЛ, второй – коллекционный.

Результаты исследования второго фрагмента гена *cnfY* в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, изолированных из разных источников, в том числе и от больных ДСЛ, показали, что большинство изолятов (97,6 % – больные, 84,6 % – окружающая среда, 100 % – грызуны) имели делецию размером 300 пар нуклеотидов в исследуемом участке гена. Размер фрагмента гена этой группы изолятов составил 1800 п. н. Полноразмерная копия данного участка гена *cnfY* (2100 п. н.) выявлена у небольшого числа штаммов (2,4 % – больные, 15,4 % – окружающая среда, 0 % – грызуны).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из *Y. pseudotuberculosis* с помощью ионообменной и гельфильтрационной хроматографии, а также тандемной масс-спектрометрии выделен и идентифицирован цитотоксический некротизирующий фактор-белок молекулярной массой 114479 Дальтон.

При анализе последовательности *cnfY* гена *Y. pseudotuberculosis*, кодирующей функционально значимый Rho-домен в штаммах, изолированных от больных дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой людей, выявлена делеция фрагмента. Сайт делеции размером 931 п. н. картирован. Полноразмерная копия *cnfY* гена обнаружена только у двух из 30 исследованных штаммов.

У подавляющего числа исследованных штаммов *Y. pseudotuberculosis* обнаружена делеция во втором фрагменте гена *cnfY*. Сайт делеции размером 300 п. н.

Полученные данные позволяют поставить вопрос о роли цитотоксического некротизирующего фактора в вирулентности возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки,

и в патогенезе этой новой клинико-эпидемиологической формы псевдотуберкулеза, в гене которого имеют место несколько делеций, в том числе в функционально значимой области. Несомненно, результаты дальнейших исследований в названных направлениях позволят ответить на эти важные вопросы, касающиеся возбудителя псевдотуберкулеза.

Авторы благодарят сотрудников Института белка РАН Нину Владимировну Котову и Виктора Викторовича Марченкова за оказанную помощь при проведении экспериментов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Знаменский В.А., Вишняков А.К. Этиология дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки // Журн. микробиол. 1967. (2). 125–130.
2. Сомов Г.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка. М.: Медицина, 1979. 183 с.
3. Тимченко Н.Ф., Ермолаева С.А., Адгамов Р.Р. и др. Возбудитель дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (псевдотуберкулеза человека) – клон *Yersinia pseudotuberculosis* // Мат. III Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. СПб., 2011. 109–110.
4. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток: Приморский полиграфкомбинат, 2004. 220 с.
5. Timchenko N.F., Adgamov R.R., Ermolaeva S.A. Variability in the functional domains of the Rho-modifying toxins of *Yersinia pseudotuberculosis* // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. 954. 261–266.
6. Blumenthal B., Hoffmann C., Aktories K. et al. The cytotoxic necrotizing factors from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Escherichia coli* bind to different cellular receptors but take the same route to the cytosol // Infect. Immun. 2007. 75. 3344–3353.
7. Hoffmann C., Pop M., Leemhuis J. et al. The *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA // J. Biol. Chem. 2004. 279. 16026–16032.
8. Knust Z., Schmidt G. Cytotoxic necrotizing factors (CNFs)-a growing toxin family // Toxins. 2010. 2. (1). 116–127.
9. Lockman H.A., Gillespie R.A., Baker B.D., Shakhnovich E. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor // Infect. Immun. 2002. 70. 2708–2714.
10. Worsham P.L., Mou S., Cote C.K., Fritz D. Virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in Aerosol Model // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. 954. 217–222.

## **CYTOTOXIC NECROTIZING FACTOR OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, PATHOGEN OF FAR EASTERN SCARLET-LIKE FEVER**

**Elena Viktorovna PERSIYANOVA<sup>1</sup>, Ruslan Renatovich ADGAMOV<sup>2</sup>,  
Aleksey Konstantinovich SURIN<sup>3,4</sup>, Ekaterina Konstantinovna PSAREVA<sup>1</sup>,  
Svetlana Aleksandrovna ERMOLAEVA<sup>2</sup>, Nelly Fedorovna TIMCHENKO<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *FSBI «RI for Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov» of SB RAMS  
690087, Vladivostok, Selskaya str., 1*

<sup>2</sup> *Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. N.F. Gamaleya  
123098, Moscow, Gamaleya str., 18*

<sup>3</sup> *Institute of Protein Research RAS  
142290, Pushchino, Institutskaya str., 4*

<sup>4</sup> *State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Minzdrav of Russia  
142279, Moscow reg., Serpukhov district, village Obolensk*

---

The materials on isolation and purification of the cytotoxic necrotizing factor of *Y. pseudotuberculosis*, its identification by mass spectrometry, a molecular genetic characterization of two domains of its toxin gene, including functionally significant, in strains of bacteria isolated from patients, small rodents and the environment in the Russian Federation have been introduced in the article.

---

**Key words:** *Yersinia pseudotuberculosis*, strain, cytotoxic necrotizing factor, protein, gene.

**Persiyanova E.V.** – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of ecology of pathogenic bacteria, e-mail: Helen-pers@yandex.ru

**Adgamon R.R.** – junior researcher of the laboratory of ecology of pathogens, e-mail: bacter@yandex.ru

**Surin A.K.** – candidate of physical- mathematical sciences, researcher of the laboratory of protein physics, e-mail: alexey\_surin@mail.ru

**Psareva E.K.** – junior researcher of the laboratory molecular bases of pathogenicity of bacteria, e-mail: katehok\_84@mail.ru

**Ermolaeva S.A.** – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of ecology of pathogens, e-mail: sveta@ermolaeva.msk.su

**Timchenko N.F.** – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory molecular bases of pathogenicity of bacteria, e-mail: ntimch@mail.ru



## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА РАЗМНОЖЕНИЕ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Наталья Гаврошевна ЛИ<sup>1,2</sup>, Любовь Степановна БУЗОЛЕВА<sup>1</sup>,  
Марина Леонидовна СИДОРЕНКО<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН  
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1

<sup>2</sup> ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет  
690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8

<sup>3</sup> ФГБУН Биолого-почвенный институт ДВО РАН  
690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостоку, 159

Изучено влияние метаболитов сапрофитных почвенных бактерий на рост и размножение патогенных микроорганизмов *Listeria monocytogenes*. Показано, что все испытываемые культуры обладали избирательным, как ингибирующим, так и стимулирующим, действием на размножение тест-культур. Наибольшую стимулирующую активность в отношении тест-культур проявили бактерии рода *Bacillus*. Стимуляция роста *L. monocytogenes* при взаимодействии с экзометаболитами штамма сапрофита зависела от концентрации метаболитов, от биологических особенностей как штамма сапрофита, так и штамма листерий. Подобрана наиболее оптимальная концентрация экзометаболитов *Bacillus pumilus*, при которой отмечен максимальный стимулирующий эффект.

**Ключевые слова:** *Listeria monocytogenes*, метаболиты бактерий, сапрофитная почвенная микрофлора, стимуляция роста, *Bacillus pumilus*.

Почва является многофакторной системой с множеством разнообразных видов микроорганизмов и связей между ними, что обуславливает сложность изучения всех компонентов микробной экосистемы. Одной из центральной проблем почвенной микробиологии является изучение механизма регуляции жизнедеятельности почвенных микроорганизмов.

Обитание *Listeria monocytogenes* в почве доказано как выделением возбудителей сапрозоонозов из этих субстратов [6, 7, 10], так и в модельных экспериментах [1, 10]. В настоящее время установлено, что на жизнеобитание этих микроорганизмов в почвах оказывают влияние абиотические [1, 16, 17] и биотические факторы среды [15, 20]. Присутствие микроорганизмов в той или иной природной зоне определяется не только условиями внешней среды, но и наличием контроля со стороны других микроорганизмов. Многие исследователи [2–4, 9, 14, 23, 25] считают, что соединения, продуцируемые микроорганизмами,

могут действовать как внутри- или межвидовые регуляторы микробных сообществ. При этом отмечено как стимулирующее, так и ингибирующее действие веществ микробного происхождения на размножение микроорганизмов [15, 17, 24]. Межпопуляционные взаимодействия, осуществляемые через продукты метаболизма, являются определяющими факторами для поддержания стабильности микробных сообществ и управления их видовым составом и продуктивностью [8, 11–13].

Помимо веществ, растворимых в воде [19], среди метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, есть и летучие вещества [21, 22]. Изучение характера взаимоотношений между бактериями в сообществах имеет большое значение для выяснения роли отдельных компонентов в биологических сообществах.

Цель настоящей работы – изучить влияние экзометаболитов почвенных бактерий на размножение *Listeria monocytogenes*.

**Ли Н.Г.** – студентка 5-го курса Школы естественных наук, лаборант-исследователь,  
e-mail: natusik-scorpio@mail.ru

**Бузолева Л.С.** – д.б.н., проф., зав. лабораторией экологии патогенных бактерий, проф. кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии, e-mail: buzoleva@mail.ru

**Сидоренко М.Л.** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории почвоведения и экологии почв,  
e-mail: sidorenko@biosoil.ru

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С целью изучения влияния почвенных бактерий на размножение листерий использовали штаммы сапрофитных бактерий, выделенные нами из естественно сложившейся микробной ассоциации бурой лесной почвы. Образцы почв были взяты в лесной зоне бухты Лазурная, где, по данным литературы, были индцированы листерии [18].

Микроорганизмы выделяли и выращивали для экспериментов на пептонном агаре (1 % пептона («Микроген», Москва), 0,5 % NaCl на дистиллированной воде с 2 % агара, pH 7,4).

Всего было выделено из почвы 32 штамма сапрофитных микроорганизмов, различных по своим культуральным и биохимическим свойствам. Идентификацию активных штаммов сапрофитов проводили с помощью API-тестов производства bioMérieux (Франция) и специфических праймеров в полимеразной цепной реакции.

Всего было поставлено 99 вариантов опыта. Патогенные бактерии *L. monocytogenes* выращивали на казеиново-дрожжевом агаре с 0,1 % глюкозой. Культура, действие летучих веществ которой изучали, далее именуется испытуемой, та, на которой проверялось это действие, – тест-культурой. Все сапрофитные бактерии поочередно исследовались как испытуемые, все патогенные бактерии использовались только в качестве тест-культур. Для экспериментальных исследований было использовано 10 эпидемически значимых штаммов *L. monocytogenes*, взятых из музея НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, типичных по своим культуральным, серологическим и биохимическим свойствам.

Действие газообразных метаболитов испытуемых культур на рост тест-культур исследовали экспресс-методом Л.С. Тирранен [22] в нашей модификации. Воздействие испытуемой культуры на тест-культуру оценивали как положительное (стимулирующее) или отрицательное (ингибирующее), когда размер колоний тест-культур в опыте был соответственно увеличен или снижен на 20 % и более по сравнению с контролем. Действие испытуемой культуры оценивали как нулевое, если размер колоний в опыте отличался от контрольных не более чем на  $\pm 20$  %. Контролем служили чашки с тест-культурами, не подвергавшимся действию летучих продуктов жизнедеятельности испытуемых микроорганизмов. Результаты сравнения размеров колоний выражали в миллиметрах. При проведении статистической обработки данных учитывали среднюю арифметическую величину диаметра колоний ( $M$ ),

ошибку средней арифметической ( $m$ ), результаты представляли в виде  $M \pm m$ .

Наиболее активные штаммы, отобранные с помощью экспресс-метода, в дальнейшем проверяли на активность метаболитов в жидкой среде. Для этого суточную культуру сапрофита смывали физиологическим раствором (5 мл на скошенный агар). Полученную жидкость отделяли от клеток центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин и фильтровали через бактериальный фильтр Millex GP с диаметром пор 0,22 мкм.

Фильтрат добавляли во флаконы с 50 мл фосфатно-буферного раствора Петерсона–Кука, который использовали в качестве среды накопления для листерий. Культуру листерий вносили по 1 мл ( $10^9$  КОЕ/мл), их дальнейший рост наблюдали на спектрофотометре Т70 (PG Instruments, Англия) в течение 11 суток. Контролем служила эмульсия *L. monocytogenes* (1 мл) без добавления фильтрата.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поставленные эксперименты позволили оценить степень влияния летучих метаболитов сапрофитных бактерий на размножение патогенных микроорганизмов при взаимодействии культур. Следует отметить, что большинство штаммов исследуемых сапрофитов в той или иной степени стимулировали рост листерий по сравнению с контролем. Среди них 3 % – отрицательных (случаи, когда летучие метаболиты сапрофитных микроорганизмов подавляли рост испытуемой культуры патогенных бактерий), 90 % – положительных (случаи, когда летучие метаболиты стимулировали рост испытуемой микрофлоры), остальные результаты (7 % случаев) были нулевыми. Наблюдавшиеся в опытах нулевые взаимодействия могут являться слабыми положительными или отрицательными воздействиями, не учитываемыми данным методом исследования.

Полученные данные, представленные в таблице, показывают, что летучие метаболиты одного и того же сапрофитного штамма не одинаково способны стимулировать рост разных штаммов патогенов. Это позволяет предположить, что на метаболическом уровне стимуляция роста листерий в ассоциациях зависит от биологических свойств как *L. monocytogenes*, так и сапрофитных бактерий.

Наибольшее стимулирующее влияние на рост *L. monocytogenes* оказал штамм сапрофита № 7, идентифицированный нами как *Bacillus pumilus*. Летучие метаболиты этого почвенного штамма стимулировали рост всех штаммов

Таблица

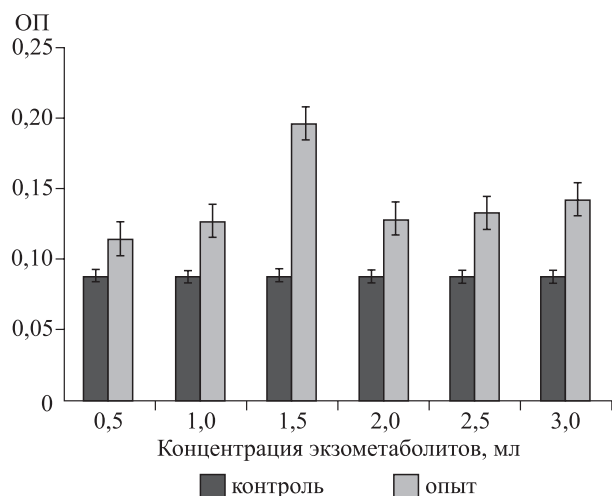
Диаметр роста колоний листерий (мм) под влиянием летучих метаболитов сапрофитных бактерий

Штамм сапрофита	Штамм <i>Listeria monocytogenes</i>									
	37206/4 № 311	8708	9148/1	6144 № 315	4835/6 № 310	15861 № 302	2780 № 318	5642/6 № 313	12731/8-8097	9156/2
1	3 ± 0,01	4 ± 0,04	3 ± 0,03	3 ± 0,03	5 ± 0,03	5 ± 0,04	6 ± 0,02	7 ± 0,03	8 ± 0,04	7 ± 0,04
2	3 ± 0,04	5 ± 0,03	6 ± 0,03	5 ± 0,03	5 ± 0,03	3 ± 0,03	8 ± 0,05	6 ± 0,04	7 ± 0,03	6 ± 0,04
3	3 ± 0,03	3 ± 0,04	5 ± 0,03	6 ± 0,04	7 ± 0,02	3 ± 0,04	6 ± 0,02	4 ± 0,03	8 ± 0,04	8 ± 0,04
4	6 ± 0,04	7 ± 0,03	7 ± 0,03	5 ± 0,03	6 ± 0,04	7 ± 0,05	8 ± 0,04	7 ± 0,04	7 ± 0,03	8 ± 0,03
5	6 ± 0,02	6 ± 0,02	5 ± 0,03	6 ± 0,03	6 ± 0,02	8 ± 0,04	8 ± 0,03	6 ± 0,02	8 ± 0,02	9 ± 0,03
6	6 ± 0,03	7 ± 0,04	6 ± 0,03	5 ± 0,02	8 ± 0,03	7 ± 0,04	6 ± 0,04	7 ± 0,03	9 ± 0,04	8 ± 0,03
7	15 ± 0,05	9 ± 0,02	15 ± 0,04	15 ± 0,03	14 ± 0,05	8 ± 0,04	13 ± 0,03	11 ± 0,04	12 ± 0,03	12 ± 0,03
8	6 ± 0,03	3 ± 0,02	7 ± 0,05	6 ± 0,02	7 ± 0,02	5 ± 0,02	8 ± 0,03	9 ± 0,04	8 ± 0,05	9 ± 0,02
9	3 ± 0,04	6 ± 0,04	7 ± 0,04	5 ± 0,03	5 ± 0,04	6 ± 0,02	7 ± 0,04	6 ± 0,03	8 ± 0,01	6 ± 0,04
10	3 ± 0,03	6 ± 0,04	7 ± 0,05	3 ± 0,04	6 ± 0,01	10 ± 0,04	5 ± 0,05	6 ± 0,03	8 ± 0,02	8 ± 0,03
11	9 ± 0,01	8 ± 0,05	5 ± 0,03	8 ± 0,04	8 ± 0,05	7 ± 0,01	9 ± 0,04	10 ± 0,05	9 ± 0,04	8 ± 0,04
12	8 ± 0,04	5 ± 0,04	6 ± 0,04	6 ± 0,02	6 ± 0,05	6 ± 0,02	7 ± 0,04	7 ± 0,02	10 ± 0,02	9 ± 0,05
13	9 ± 0,03	7 ± 0,03	8 ± 0,01	7 ± 0,05	7 ± 0,05	7 ± 0,03	10 ± 0,04	9 ± 0,02	8 ± 0,03	7 ± 0,04
14	3 ± 0,02	3 ± 0,04	5 ± 0,04	5 ± 0,04	5 ± 0,05	8 ± 0,04	8 ± 0,03	4 ± 0,05	7 ± 0,04	4 ± 0,05
15	4 ± 0,05	5 ± 0,03	5 ± 0,03	5 ± 0,04	6 ± 0,02	6 ± 0,04	7 ± 0,03	7 ± 0,02	7 ± 0,02	5 ± 0,02
16	8 ± 0,04	8 ± 0,04	9 ± 0,04	9 ± 0,03	8 ± 0,04	7 ± 0,04	10 ± 0,05	6 ± 0,03	1 ± 0,02	7 ± 0,03
17	5 ± 0,03	8 ± 0,01	5 ± 0,04	5 ± 0,01	5 ± 0,02	4 ± 0,02	8 ± 0,05	7 ± 0,02	8 ± 0,03	7 ± 0,03
18	5 ± 0,03	7 ± 0,03	4 ± 0,04	8 ± 0,03	7 ± 0,05	8 ± 0,04	7 ± 0,01	6 ± 0,05	7 ± 0,04	6 ± 0,04
19	4 ± 0,02	5 ± 0,01	5 ± 0,04	6 ± 0,04	6 ± 0,04	6 ± 0,04	7 ± 0,04	5 ± 0,02	6 ± 0,03	5 ± 0,03
20	7 ± 0,04	8 ± 0,04	6 ± 0,04	9 ± 0,01	6 ± 0,04	6 ± 0,01	10 ± 0,02	6 ± 0,04	9 ± 0,01	6 ± 0,04
21	6 ± 0,02	8 ± 0,02	6 ± 0,04	8 ± 0,02	7 ± 0,04	7 ± 0,01	8 ± 0,02	5 ± 0,03	7 ± 0,04	8 ± 0,04
22	6 ± 0,03	6 ± 0,04	4 ± 0,04	3 ± 0,03	5 ± 0,05	6 ± 0,04	7 ± 0,03	4 ± 0,02	9 ± 0,04	6 ± 0,02
23	3 ± 0,02	7 ± 0,03	3 ± 0,02	5 ± 0,05	3 ± 0,02	5 ± 0,02	6 ± 0,05	5 ± 0,04	6 ± 0,04	4 ± 0,02
24	8 ± 0,03	6 ± 0,03	8 ± 0,04	7 ± 0,02	9 ± 0,04	8 ± 0,04	9 ± 0,02	8 ± 0,02	8 ± 0,04	7 ± 0,04
25	6 ± 0,03	8 ± 0,04	7 ± 0,02	8 ± 0,04	8 ± 0,04	6 ± 0,02	11 ± 0,03	7 ± 0,04	5 ± 0,02	6 ± 0,04
26	6 ± 0,04	6 ± 0,03	6 ± 0,04	6 ± 0,03	4 ± 0,04	8 ± 0,02	9 ± 0,03	3 ± 0,02	8 ± 0,03	6 ± 0,03
27	7 ± 0,03	8 ± 0,03	8 ± 0,02	8 ± 0,01	8 ± 0,02	8 ± 0,02	8 ± 0,02	7 ± 0,02	8 ± 0,04	7 ± 0,03
28	6 ± 0,03	7 ± 0,04	8 ± 0,04	8 ± 0,02	7 ± 0,02	9 ± 0,04	8 ± 0,04	6 ± 0,02	7 ± 0,04	6 ± 0,02
29	7 ± 0,03	8 ± 0,02	8 ± 0,03	8 ± 0,03	7 ± 0,03	8 ± 0,05	10 ± 0,04	8 ± 0,01	10 ± 0,04	8 ± 0,03
30	7 ± 0,02	9 ± 0,04	6 ± 0,02	8 ± 0,04	8 ± 0,02	9 ± 0,02	9 ± 0,02	9 ± 0,03	9 ± 0,04	10 ± 0,03
31	6 ± 0,04	5 ± 0,02	7 ± 0,04	7 ± 0,02	6 ± 0,02	6 ± 0,03	8 ± 0,02	6 ± 0,03	7 ± 0,04	6 ± 0,02
32	6 ± 0,02	8 ± 0,03	7 ± 0,04	6 ± 0,04	8 ± 0,04	6 ± 0,02	7 ± 0,04	7 ± 0,02	8 ± 0,04	7 ± 0,04
Контроль	4 ± 0,03	3 ± 0,02	3 ± 0,02	2 ± 0,02	3 ± 0,03	4 ± 0,04	6 ± 0,01	3 ± 0,02	4 ± 0,02	3 ± 0,03

*L. monocytogenes*, взятых в эксперимент по сравнению с контролем (см. таблицу).

Максимальной способностью стимулировать рост *L. monocytogenes*, взятых в эксперимент, обладали в основном 4 штамма листерий (37206/4 № 311, 9148/1, 6144 № 315 и 4835/6 № 310). В дальнейшем влияние экзометаболитов *Bacillus pumilus* на размножение листерий в жидкой среде было исследовано на примере штамма 6144 № 315. Одной из задач этого исследования было подобрать их оптимальную стимулирующую

концентрацию. Для этого использовали рабочие концентрации экзометаболитов бацилл 0,5 мл, 1 мл, 1,5 мл, 2 мл, 2,5 мл, 3 мл. Обнаружено, что стимулирование роста культуры листерий наблюдали с максимумом на седьмые сутки для всех концентраций экзометаболитов сапрофита (рисунок). Экзометаболиты в концентрации 0,5 мл в меньшей степени, чем во всех остальных, стимулировали рост листерий (см. рисунок). Как видно из данных, представленных на рисунке, в отличие от остальных испытываемых концентраций, даже



**Рис.** Прирост биомассы *L. monocytogenes* (штамм 6144 №315) под влиянием экзометаболических *B. pumilus* на седьмые сутки опыта

более высоких, стимулирование *L. monocytogenes* (штамм 6144 № 315) экзометаболическими сапрофита в концентрации 1,5 мл оказалось наиболее эффективным (на 123 % относительно контроля на седьмые сутки опыта).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что почвенные бактерии в микробных сообществах с *L. monocytogenes* в большей степени стимулируют, чем угнетают рост патогенов. По результатам скринингового анализа наибольшую биологическую активность в отношении стимуляции роста *L. monocytogenes* проявили сапрофитные почвенные бактерии *B. pumilus*. Стимуляция роста *L. monocytogenes* при взаимодействии с экзометаболическими штамма сапрофит зависела от концентрации последних, а также от биологических особенностей как штамма сапрофита, так и штамма листерий. Подобрана наиболее оптимальная концентрация экзометаболических *B. pumilus* – 1,5 мл, при которой отмечен максимальный стимулирующий эффект роста культуры листерий.

Метаболиты, продуцируемые почвенными сапрофитами, способны стимулировать рост и размножение *L. monocytogenes* в микробных сообществах, что может приводить к появлению эпидемических очагов, представляющих угрозу для человека.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бузалева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Владивосток, 2001.

2. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2010. 12. (4). 347–352.

3. Вахитов Т.Я., Момот Е.Н., Толпаров Ю.Н. Динамика и функции экзометаболических веществ в процессе роста периодической культуры *Escherichia coli* М-17 // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2005. (1). 16–21.

4. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. Регуляторные функции экзометаболических веществ бактерий // Микробиол. 2006. 75. (4). 483–488.

5. Волков М.Ю., Ткаченко Е.И., Воробейников Е.В., Синица А.В. Метаболиты *Bacillus subtilis* как новые перспективные пробиотические препараты // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2007. (2). 75–80.

6. Гершун В.И. Влияние абиотических факторов на жизнеспособность листерий в почве // Сиб. вестн. с-х науки. 1980. (3). 78–81.

7. Гершун В.И. Влияние различных почв на выживаемость возбудителя листериоза // Ветеринария. 1971. (1). 32–33.

8. Егоров Н.С., Ландау Н.С. Биосинтез биологически активных соединений смешанными культурами микроорганизмов // Прикл. биохимия микробиол. 1982. 18. (6). 835–849.

9. Захарченко Н.С., Георгиевская Е.Б., Школьная Л.А. и др. Выделение и характеристика полипептида *Bacillus subtilis* k-1-1 – ингибитора роста фитопатогенных грибов и бактерий // Биотехнология. 2007. (3). 21–26.

10. Кузнецов В.Г., Раковский В.В., Валежанин Т.С., Сомов Г.П. Изучение эпидемиологии дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки в Приморском крае. Сообщение III. Выделение псевдотуберкулезного микроба из почвы и роль почвы в распространении инфекции // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1976. (7). 138–139.

11. Панин А.Н., Малик Е.В., Чупахина Н.А. Исследование антагонистических свойств спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* в отношении кислотолюбивых бактерий *Lactobacillus acidophilus* // Ветеринарный врач. 2009. (3). 11–14.

12. Семенов А.В., Черкасов С.В. Влияние ассоциативных микроорганизмов на антагонистическую активность бактерий // Вестн. НГУ. Сер. Биол. клин. мед. 2011. 9. (3). 20–26.

13. Семенов А.В. Характеристика антагонистической активности *Staphylococcus aureus* при межмикробных взаимодействиях // Вестн. ТГУ. Биология. 2011. (3). 56–66.

14. Сидоренко М.Л., Бузалева Л.С. Характер взаимоотношений сапрофитной микрофлоры почв через газообразные метаболиты // Микробиология. 2008. 77. (2). 273–277.

15. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С. Влияние летучих метаболитов прорастающих семян на размножение бактерий *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. 48. (3). 308–312.
16. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С. Влияние различных видов минеральных удобрений на размножение *Listeria monocytogenes* в почвах // Агрохимия. 2008. (5). 59–64.
17. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С., Костенков Н.М. Влияние свойств почв на сохранение и размножение листерий и иерсиний // Почвоведение. 2006. (2). 237–243.
18. Стародумова С.М., Зайцева Е.А. Серологический мониторинг листериозной инфекции у диких мышевидных грызунов в Приморском крае // Дальневосточн. журн. инфекц. патол. 2012. (20). 84–87.
19. Тамбиев А.Х., Телитченко М.М. Роль летучих и водорастворимых биологически активных соединений биогенного происхождения. М., 1971. 152 с.
20. Терехова В.Е., Айздайчер Н.А., Бузолева Л.С., Сомов Г.П. Влияние метаболитов морских микроводорослей на размножение бактерий вида *Listeria monocytogenes* // Биология моря. 2009. 35. (4). 306–309.
21. Турранен Л.С. Роль летучих метаболитов в межмикробном взаимодействии. Новосибирск, 1989. 104 с.
22. Турранен Л.С., Ковров Б.Г., Черепанов О.А. Характер взаимодействия микроорганизмов через их газообразные метаболиты // Микробиология. 1980. 49. (5). 788–793.
23. Berestetsky O.A., Kravchenko L.V. Volatile products of plant residue decomposition and their effect on soil microflora // Soil. Biol. Conserv. Biosphere. 1984. 1. 419–425.
24. Dreyfuss M.A. Fungicidal and bactericidal gas from the mycelium of a *Paecilomyces* strain // Experientia. 1980. 36. (4). 500–501.
25. Maldonado A., Ruiz-Barba J.L., Jimenez-Diaz R. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of grampositive bacteria // Arch. Microbiol. 2004. 181. 8–16.

## THE EFFECT OF SOIL BACTERIA EXOMETABOLITES ON *LISTERIA MONOCYTOGENES* REPRODUCTION

Natalya Gavroshevna LEE<sup>1,2</sup>, Lyubov' Stepanovna BUZOLEVA<sup>1</sup>, Marina Leonidovna SIDORENKO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> FSBI «RI for Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov» of SB RAMS of Medical Sciences  
690087, Vladivostok, Sel'skaya str., 1

<sup>2</sup> The Far Eastern Federal University  
690950, Vladivostok, Sukhanova str., 8

<sup>3</sup> Institute of Biology and Soil Science, Far East Division, Russian Academy of Sciences  
690022, Vladivostok, Stoletiya Vladivostoka av., 159

The influence of metabolites of saprophytic soil bacteria on the growth and reproduction of pathogens *Listeria monocytogenes* has been investigated. It has been shown that all investigated cultures have elective both inhibitive and stimulative effect on the test cultures reproduction. The Bacillus bacteria have revealed the highest catalytic activity to test cultures. The stimulation of *L. monocytogenes* growth in interaction with saprophyte strain exometabolites depended on the metabolite concentration, biological peculiarities of both saprophyte strain and listeria strain. The most optimal concentration of *Bacillus pumilus* with the revealed maximal stimulating effect has been selected.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, bacteria metabolites, saprophytic soil microorganisms, stimulation of growth, *Bacillus pumilus*.

Lee N.G. – 5th-year student of the School of Natural Sciences, e-mail: natusik-scorpio@mail.ru  
Buzoleva L.S. – doctor of biological sciences, head of the laboratory for pathogenic bacteria ecology, professor of the chair biochemistry, microbiology and biotechnology, professor; e-mail: buzoleva@mail.ru  
Sidorenko M.L. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of soil science and soil ecology, e-mail: sidorenko@biosoil.ru

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛОВ, ЗАРАЖЕННЫХ ХАНТАВИРУСОМ

Ирина Николаевна ЛЯПУН<sup>1</sup>, Наталья Геннадьевна ПЛЕХОВА<sup>1,2</sup>,  
Галина Геннадьевна КОМПАНЕЦ<sup>1</sup>, Илья Сергеевич СМИРНОВ<sup>2</sup>,  
Лариса Михайловна СОМОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН  
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1

<sup>2</sup> ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет  
690950, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27

Приведены данные по определению функциональной активности нейтрофилов, зараженных хантавирусом. Исследовались ферменты: 5'-нуклеотидаза, аденозинтрифосфатаза, лактатдегидрогеназа, миелопероксидаза, цитохромоксидаза и катионные белки. Выявлено, что хантавирус способен инфицировать нейтрофилы, оказывает выраженное воздействие на их кислородзависимую активность. При этом в клетках обнаружена тенденция к анаэробному пути энергопродукции, что согласуется с повышением активности лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, тогда как малая активность миелопероксидазы в нейтрофилах, инфицированных хантавирусом, указывает на подавление защитной реакции клетки на внедрение этого вируса. Способность хантавируса адгезировать к поверхности нейтрофилов и изменять их морфофункциональные характеристики подтвердила сканирующая электронная микроскопия.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, ферменты, сканирующая электронная микроскопия, хантавирус.

Иммунная функция нейтрофилов при инфекционных заболеваниях главным образом ассоциируется с фагоцитозом и продукцией цитотоксических компонентов, в том числе активных форм кислорода и азота радикальной и нерадикальной природы [7].

На данный момент для нейтрофилов обозначены три основные бактерицидные системы: 1) кислородзависимая система, в состав которой входит ряд ферментов дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, цитохромоксидаза), НАДФН-оксидазный комплекс и миелопероксидазная система; 2) нитроксидобразующая система, включающая активные формы азота, производные NO-синтазы; 3) система белков нейтрофильных гранул (антимикроб-

ные белки, протеазы, сериновые протеиназы, металлопротеиназы) [4, 12].

Выявлено, что в нейтрофилах под воздействием вируса иммунодефицита человека синтезируются свободные кислородные радикалы, протеиназы, бактерицидные протеины и цитокины, которые как по отдельности, так и в совокупности оказывают влияние на регуляцию иммунного ответа организма [10].

Присутствие в периферической крови достаточного количества нейтрофилов и их наличие практически во всех органах обуславливают вероятность контактирования этих клеток с вирусами одними из первых. Ранее сообщалось о способности нейтрофилов взаимодействовать с вирусом иммунодефицита человека, цитомегало-

*Ляпун И.Н.* – младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии, e-mail: irina-lyapun@list.ru

*Плехова Н.Г.* – д.б.н., зав. лабораторией патоморфологии и электронной микроскопии, e-mail: pl\_nat@hotmail.com

*Компанец Г.Г.* – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагической лихорадки с почечным синдромом, e-mail: galkom@inbox.ru

*Смирнов И.С.* – аспирант междисциплинарной лаборатории электронной микроскопии и обработки изображений, e-mail: smirnov@letoi.phys.dvfu.ru

*Сомова Л.М.* – д.м.н., проф., главный научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии, e-mail: l\_somova@mail.ru

вирусом, вирусом гриппа и Эпштейна – Барр, а также установлена индукция апоптоза нейтрофилов данными вирусами [8].

В настоящее время низкомолекулярные лизосомные катионные белки (полипептиды) нейтрофильных гранулоцитов названы дефенсинами (от англ. defense – защита, оборона). Они обладают антимикробной активностью в отношении различных организмов, таких как бактерии, грибы и оболочечные вирусы [2]. В нейтрофилах человека  $\alpha$ -дефенсина хранятся в гранулах и секретируются из них при инфекционных и воспалительных состояниях [11]. Установлено, что под воздействием дефенсинов увеличивается поглощение вируса гриппа нейтрофилами, ингибируется его репликация и синтез белков в этих клетках. Указанные белки также ингибируют способность сурфактантного белка D увеличивать выработку  $H_2O_2$  нейтрофилами при инфицировании их данным вирусом.

В современной вирусологии к роду *Hantavirus* относят этиологические агенты двух тяжелых заболеваний человека: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и хантавирусный легочный синдром. Обе болезни распространяются грызунами-переносчиками. Вирусы геморрагической лихорадки с почечным синдромом переносятся грызунами Восточного полушария, в частности, полевой мышью *Apodemus agrarius*, а вирусы хантавирусного легочного синдрома – грызунами Западного полушария. Хантавирусы являются серологически-родственными членами семейства *Bunyaviridae*. Это вирусы с геномом из РНК отрицательной полярности, которая разделяется на три сегмента – Б, С и М, кодирующие соответственно вирусную транскриптазу, гликопротеины и белки нуклеокапсида. Первой стадией при вирусном инфицировании является адгезия вирусных частиц к специфическим рецепторам – гликопротеинам [13]. Для хантавируса клетками-мишенями служат моноциты и макрофаги [4, 9].

Целью нашего исследования являлось определение влияния хантавируса на морфофункциональную активность нейтрофилов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Первичную культуру нейтрофилов морских свинок получали, вызывая внутрибрюшинное воспаление путем введения стерильного 1 % мясопептонного бульона (5 мл). Через 18 ч перитонеальную полость животных промывали 10 мл холодной средой 199 с гепарином 5 ед/мл. Полученный лейкоконцентрат собирали, концентрацию клеток доводили до  $4 \times 10^6$  кл/мл и разлили во флаконы с покровными стеклами по 1 мл

и плоскодонные планшеты по 100 мкл на лунку. Для адгезии взвесь нейтрофилов оставляли в  $CO_2$ -инкубаторе, через 40 мин монослой нейтрофилов отмывали дважды от неадгезированных клеток.

Для заражения нейтрофилов был взят выделенный на клетках Vero-6 из суспензии легких инфицированной полевой мыши вирулентный штамм 308 геноварианта Far East вируса *Hantaan*. В экспериментах использовали супернатантную вирусосодержащую жидкость культуры клеток Vero-6 и СПЭВ, включавшую не менее 5 инфекционных единиц на нейтрофил, исходя из посадочной концентрации клеток и величины титра вируса, используемого для заражения. Затем продолжали инкубировать в среде 199, содержащей 20 % эмбриональной сыворотки коровы, 2 мкМ глутамина, 0,2 мкМ гентамицина и 100 ед/мл пенициллина. Время контакта нейтрофилов с вирусосодержащей жидкостью составило от 5 мин до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 18, 24, 48 ч. Эксперименты проводили трижды.

Предметные стекла с адгезированными на них клетками высушивали на воздухе и фиксировали в течение 30 с по собственной модификации в холодном 96° этаноле. Это позволило сохранить вирусный антиген на плазматической мембране клеток. Затем применяли стандартную постановку непрямого метода флуоресцирующих антител. Для определения вирусного антигена обработку монослоя клеток, зараженных хантавирусом, проводили с использованием гомологичной иммуноасцитической жидкости к вирулентному штамму хантавируса в разведении 1:64 и объеме 5–20 мкл. В качестве флуоресцирующей сыворотки для выявления антигена вируса использовали Zenon Labeling Kit Alexa Fluor 546 против иммуноглобулина мыши IgG1 (Sigma).

При исследовании поверхности нейтрофилов, зараженных вирулентным штаммом 308 хантавируса, клетки на покровных стеклах подвергали специальной обработке для исследования методом сканирующей электронной микроскопии [5], изображения образцов были получены на электронном микроскопе Ultra 55 (Carl Zeiss, Германия) с ускоряющим напряжением 0,8–1 кВ.

Определение активности АТФазы и 5'-нуклеотидазы (аденозинмонофосфатазы) проводили путем добавления к монослою клеток 20 мкл субстрата – соответственно 8 мг АТФ на 1 мл трис-HCl-буфера, pH 7,8, содержавшего 87 мг NaCl, 28,7 мг KCl, 52 мг  $MgCl_2$  на 6  $H_2O$ , и 4 мг АМФ на 1 мл такого же буфера, содержавшего 87 мг NaCl и 70 мг  $MgCl_2$ . Выявление активности лактатдегидрогеназы проводили по методу Лойда в собственной модификации [3].

Определение активности миелопероксидазы и цитохромоксидазы проводили путем добавления к монослою клеток 100 мкл раствора – соответственно 4 мг о-фенилендиамина на 10 мл фосфатно-цитратного буфера, рН 5,0, с добавлением 500 мкл 0,33 % перекиси водорода, и 2 мг/мл 3,3-диаминобензидина на основе 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,5, с добавлением 1 г  $MnCl_2$  и 300 мкл 33 % перекиси водорода. Выявление активности катионных белков (КБ) проводили при добавлении к монослою клеток 50 мкл раствора зеленого прочного (1 мг прочного зеленого на 1 мл метанолового трис-буфера, рН (8,0–8,2)).

Количество продуктов реакции вычисляли по поглощению раствора на спектрофотометре Labsystem Multiscan RC (Финляндия) при соответствующих для определяемых субстратов длинах волн.

Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимуляции, который вычислялся в процентах как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции зараженных нейтрофилов и интактных клеток, к среднему показателю оптической плотности раствора для интактных клеток. Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ), и представляли в виде  $M \pm m$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью непрямого метода флуоресцирующих антител после 1 ч контакта хантавируса с нейтрофилами выявлялось специфическое свечение цитоплазмы в виде глыбок, и его интенсивность достигала  $42,6 \pm 5,6$  усл. ед., максимальная величина составила  $234,6 \pm 15,7$  усл. ед. после 4 ч инкубации, затем она кратковременно снижалась (5 ч) и вновь нарастала до 24 ч наблюдения, оставаясь на значительном уровне. В дальнейшем, к 2 сут наблюдения, количество антигенпозитивных нейтрофилов было минимальным вследствие деградации клеток.

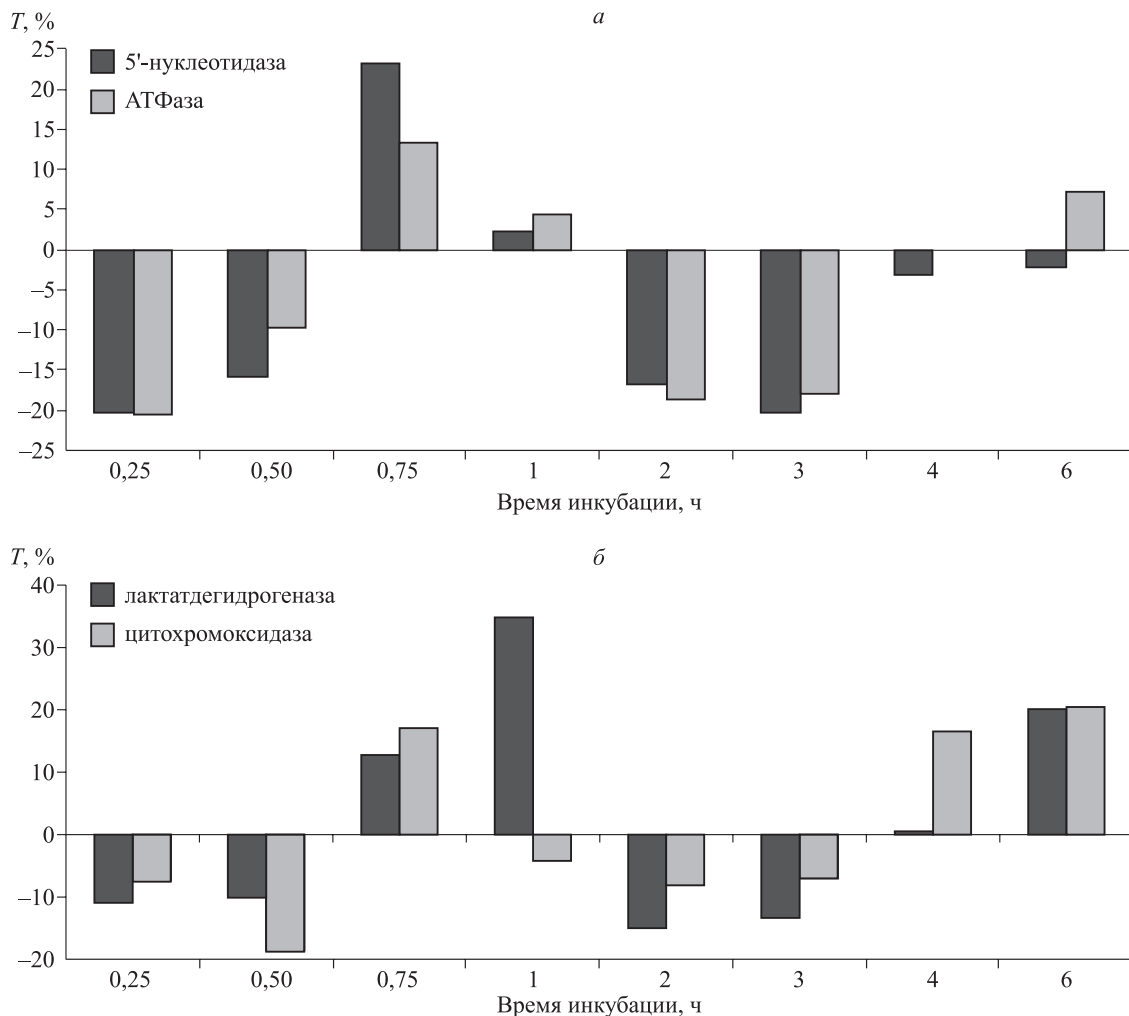
Известно, что при хемотаксисе плазматическая мембрана нейтрофилов пространственно преобразуется, и данный процесс находится в прямой зависимости от активности ее эктоферментов – 5'-нуклеотидазы и АТФазы. Для дифференцировки активированных и покоящихся нейтрофилов исследователями используется тест по определению внутриклеточного содержания этих ферментов – оно высоко в покоящихся и крайне мало в активированных клетках [1]. Нами

выявлено, что динамика изменения активности АТФазы в нейтрофилах, зараженных хантавирусом, совпадает с изменением активности 5'-нуклеотидазы (рис. 1, а). Так, индекс стимуляции 5'-нуклеотидазы достигал минимального значения через 15 мин и 3 ч после заражения ( $-20,30 \pm 0,65$  %), максимального – через 45 мин ( $23,07 \pm 0,69$  %). Данные показатели указывали на выраженную стимуляцию нейтрофилов при их заражении хантавирусом.

Характерной особенностью метаболизма нейтрофилов является их способность под влиянием различных факторов мгновенно генерировать кислородные радикалы. Известно, что при проникновении и размножении вируса в клетках выявляется стимуляция кислородзависимых ферментных систем, к которым относятся митохондриальные ферменты третьего порядка – лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Нами установлено, что при заражении хантавирусом нейтрофилов динамика показателей активности лактатдегидрогеназы носила волнообразный характер (см. рис. 1, б). Так, индекс стимуляции данного фермента снижался до  $-10,90 \pm 0,30$  % (15 мин), затем повышался до  $34,80 \pm 0,35$  % (1 ч), повторное его уменьшение отмечалось через 2 ч ( $-15,01 \pm 0,2$  %) с последующим увеличением до конца срока наблюдения ( $20,12 \pm 0,9$  %). В то же время индекс стимуляции цитохромоксидазы в зараженных клетках снижался до  $-18,7 \pm 0,4$  % (30 мин), затем повышался до  $12,7 \pm 0,35$  % (45 мин) и вновь уменьшался до  $-8,12 \pm 0,2$  % (1–3 ч) с последующим увеличением до конца срока наблюдения ( $20,44 \pm 0,4$  %). Образование богатых энергией фосфорных соединений путем анаэробного гликолиза свидетельствует об интенсификации энергообеспечения нейтрофилов. Этот путь окисления может быть расценен как компенсаторный механизм адаптивной реакции нейтрофилов на воздействие стимула. Обнаруженную нами в начальные сроки после заражения хантавирусом повышенную активность лактатдегидрогеназы в нейтрофилах, на наш взгляд, следует расценивать как увеличение энергетического потенциала клетки, который служит проявлением адаптивной реакции нейтрофила на внедрение вируса. Активность фермента может также служить достоверным показателем уровня окислительного метаболизма в клетках.

Миелопероксидаза – гемопротейн, присутствующий в азурофильных гранулах нейтрофилов, выходящий при активации клетки в фаголизосому. Этот фермент принимает участие в преобразовании супероксидного анион-радикала  $O_2^{\bullet-}$  в следующий мощный окислительный компонент – гипохлорную кислоту (HOCl), осуществ-





**Рис. 1.** Изменение активности 5'-нуклеотидазы, АТФазы (а) и лактатдегидрогеназы, цитохромоксидазы (б) в инфицированных ХВ нейтрофилах первичной культуры

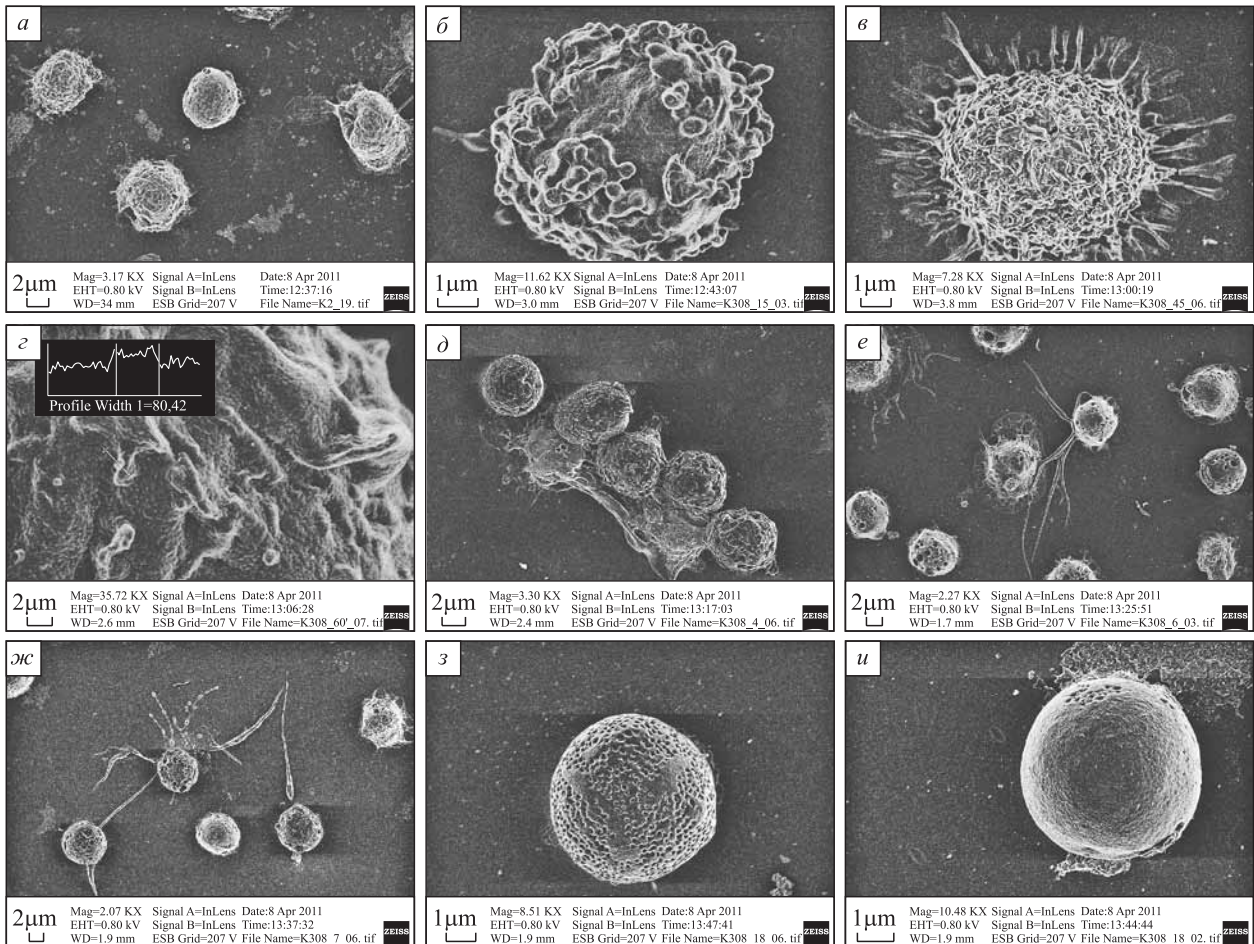
вляя тем самым защиту клетки от избыточного количества реактивных посредников кислорода [12]. Выявлено, что при заражении хантавирусом нейтрофилов на начальных сроках индекс стимуляции миелопероксидазы имел низкие значения  $-26,80 \pm 0,60\%$  (15 мин – 3 ч), увеличиваясь только к концу срока наблюдения (4–6 ч), когда он составил  $47,03 \pm 0,45\%$ . Таким образом, повышенная активность миелопероксидазы в зараженных нейтрофилах в конце срока наблюдения отражала защитную реакцию клетки на внедрение данного вируса.

Дефенсины (катионные белки) относятся к специфическим маркерам нейтрофилов, и выявление их активности при патологических состояниях дает представление о состоянии кислороднезависимой бактерицидной системы. Нами установлено, что показатели активности катионных белков в нейтрофилах, зараженных хантавирусом, возрастали на начальных сроках после заражения  $12,09 \pm 0,14\%$  (15 мин), затем снижа-

лись  $(-4,42 \pm 0,2\%)$  до конца срока наблюдения. Эти данные указывают на первоначальную стимуляцию кислороднезависимой системы нейтрофилов в ответ на внесение вируса с последующей дегрануляцией.

С помощью сканирующей микроскопии мы исследовали изменение поверхности нейтрофилов в процессе инфицирования их хантавирусом. В трехмерном пространстве неактивированные клетки имеют характерные треугольной формы выросты на поверхности, и, в целом, поверхность мембраны гладкая с небольшими выемками. При адгезии на стекле выросты исчезают, поверхность мембраны сглаживается, нейтрофилы становятся округлыми, и по их периметру наблюдаются псевдоподии сглаженной формы. Между клетками могут формироваться контакты посредством псевдоподий фибриллярного типа (рис. 2).

После 15 мин контакта с хантавирусом обнаруживались признаки активной стимуляции нейтрофилов. Это проявлялось возникновением



**Рис. 2.** Изменение архитектуры поверхности нейтрофилов под воздействием хантавируса: а – контроль; б – 15 мин контакта; в – 45 мин контакта; г – 1 ч контакта; д – 4 ч контакта; е – 6 ч контакта; ж – 7 ч контакта; з, и – 18 ч контакта

многочисленных округлой формы складок на поверхности клеток, которые свидетельствовали о специфической активации клеток. На поверхности нейтрофилов наблюдались вирусные частицы. Также обнаруживались группы клеток, находящиеся в плотном контакте посредством многочисленных вытянутых псевдоподий. Через 45 мин специфическая стимуляция клеток была более выражена, складчатость поверхности нейтрофилов увеличивалась, а также усиливалась адгезия клеток к поверхности, что приводило к уплощению клеток.

Нейтрофилы с наличием на поверхности экзотитированных компонентов обнаруживались через 1 ч контакта с хантавирусом. Поверхность отдельных клеток сглаживалась в результате исчезновения складок, и появлялись группы нейтрофилов, находящиеся в плотном контакте друг с другом. Это указывало на хемотаксическую активность клеток под воздействием вируса. С течением времени количество клеток со сглаженной поверхностью увеличивалось, помимо

этого появлялись сильно уплощенные клетки, на поверхности которых обнаруживалось большое количество вирусных частиц. Отмечалось еще большее округление нейтрофилов в результате практически полного исчезновения псевдоподий и складок на их поверхности, а также увеличение количества клеток, находящихся в плотном контакте друг с другом. После 6 ч контакта с хантавирусом все нейтрофилы округлялись, и их поверхность приобретала пенный вид в результате появления многочисленных выемок. Причем в местах прикрепления нейтрофилов к поверхности также происходило округление границ цитоплазмы. Данные изменения клеток с течением времени нарастали, наряду с этим появлялись немногочисленные фибриллоподобные псевдоподии, которые соединяли нейтрофилы между собой. В некоторых клетках количество таких псевдоподий было больше чем 1–2, и они были несколько иной формы, более утолщенной с пузырьвидными образованиями. После 18 ч инфицирования хантавирусом общее количество

клеток падало вследствие их деградации, оставшиеся нейтрофилы были округленной формы без псевдоподий, либо обнаруживались клетки с наличием межклеточного вещества на поверхности. Через 24 культура нейтрофилов полностью разрушалась.

Таким образом, установлено, что хантавирус способен адгезировать к поверхности нейтрофилов и оказывать влияние на их ферментативную активность. При этом в клетках обнаружена тенденция к анаэробному пути энергопродукции, что согласуется с повышением активности лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Подавление защитной реакции клетки на внедрение хантавируса выразилось в малой активности миелопероксидазы в нейтрофилах. Способность хантавируса адгезировать и изменять архитектуру поверхности нейтрофилов была подтверждена с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.740.11.0182).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кириличева Г.Б., Соловьева М.С., Батурина И.Г. и др. Чувствительность к мышиному токсину и уровень активности 5-нуклеотидазы макрофагов // Бюл. эксперим. биол. мед. 1992. (3). 296–297.
2. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006.
3. Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И. и др. Изменение метаболической активности макрофагов под влиянием вируса клещевого энцефалита // Биохимия. 2007. 72. (2). 236–246.

4. Плехова Н.Г., Ляпун И.Н., Сомова Л.М. и др. Реактивность клеток врожденного иммунитета в патогенезе хантавирусной инфекции // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2012. 85. (3). 296–300.

5. Ровенский Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. М.: Медицина, 1979.

6. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // Blood. 1997. 89. 3503–3521.

7. Kennedy A.D., DeLeo F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection // Immunol. Res. 2009. 43. 25–61.

8. Larochelle B., Flamand L., Gourde P. et al. Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils // Blood. 1998. 92. 291–299.

9. Sadeghi M., Eckerle I., Daniel V. et al. Cytokine expression during early and late phase of acute Puumala hantavirus infection // BMC Immunol. 2011. 12:65. doi:10.1186/1471-2172-12-65.

10. Salmen S., Montes H., Soyano A. et al. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathways // Clin. Exp. Immunol. 2007. 150. 539–545.

11. Tesfaldet T., White M.R., Gantz D. et al. Human neutrophil defensins increase neutrophil uptake of influenza A virus and bacteria and modify virus-induced respiratory burst responses // J. Immunol. 2007. 178. 8046–8052.

12. Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha L. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects // Lab. Invest. 2000. 80. 617–653.

13. Yrlid U., Jenkins C.D., MacPherson G.G. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions // J. Immunol. 2006. 176. 4155–4162.

## **MORPHOFUNCTIONAL ACTIVITY OF THE NEUTROPHILS INFECTED BY HANTAVIRUSES**

**Irina Nikolaevna LYAPUN<sup>1</sup>, Natal'ya Gennad'evna PLEKHOVA<sup>1,2</sup>,  
Galina Gennad'evna KOMPANETS<sup>1</sup>, Il'ya Sergeevich SMIRNOV<sup>2</sup>,  
Larisa Mikhailovna SOMOVA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *FSBI «RI for Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov» of SB RAMS  
690087, Vladivostok, Selskaya str., 1*

<sup>2</sup> *Far Eastern Federal University  
690091, Vladivostok, Otyabrskaya str., 27*

---

The data on definition of the functional activity of the neutrophils infected by the Hantaviruses have been presented. The enzymes – 5'-nucleotidase, adenosine triphosphatase, lactate dehydrogenase, myeloperoxidase, cytochrome c oxidase and the cationic proteins have been studied. It has been revealed that the Hantavirus is capable to infect the neutrophils, has evident influence to their oxygen forming activity. Thus the tendency to anaerobic energy production pathway in the cells has been revealed, that agrees with the increase in the LDH и CCO activity. Whereas a low MPO activity in the neutrophils infected by the Hantavirus indicates the suppression of the cell protection reaction upon the virus introduction. The Hantavirus ability to adhere to the neutrophils surface and change their morphological and functional characteristics was confirmed by the scanning electron microscopy.

---

**Key words:** neutrophils, enzymes, scanning electron microscopy, hantavirus.

*Lyapun I.N. – junior researcher of the laboratory of pathomorphology and electron microscopy,  
e-mail: irina-lyapun@list.ru*

*Plekhova N.G. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of pathomorphology and electron microscopy,  
e-mail: pl\_nat@hotmail.com*

*Kompanets G.G. – candidate of medical sciences, leading researcher of the laboratory of hemorrhagic fever with  
renal syndrome, e-mail: galkom@inbox.ru*

*Smirnov I.S. – postgraduate student of the laboratory interdisciplinary of electron microscopy and image processing,  
e-mail: smirnov@lemoi.phys.dvgu.ru*

*Somova L.M. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher of the laboratory of pathomorphology  
and electron microscopy, e-mail: l\_somova@mail.ru*

## ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОКОАГУЛЯЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ И ИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ ИХ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В РЕГИОНЕ ЦИРКУЛЯЦИИ НЕСКОЛЬКИХ СЕРОТИПОВ ХАНТАВИРУСА

Виктория Игоревна АФАНАСЬЕВА<sup>1</sup>, Ирина Геннадьевна МАКСЁМА<sup>2</sup>,  
Виктория Александровна ИВАНИС<sup>1</sup>, Раиса Александровна СЛОНОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздрава России  
690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

<sup>2</sup> ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН  
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1

Изменения в системе гемостаза, особенно «феномен тромбоцитопении», являются характерным и в то же время малоизученным синдромом при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС). С целью изучения роли IL-17 в патогенезе гемокоагуляционных нарушений при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в динамике заболевания проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 60 пациентов, находившихся на стационарном лечении в инфекционных стационарах Приморского края в период 2008–2012 гг. Выявлено достоверное повышение содержания сывороточного IL-17 при ГЛПС, ассоциированной с разными серотипами хантавируса, коррелирующее с уровнем тромбоцитов периферической крови. Отмечено значимое увеличение концентрации растворимых фибрин-мономерных комплексов в сыворотке крови обследованных пациентов при остальных неизмененных показателях функционирования системы гемостаза.

**Ключевые слова:** геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), интерлейкин 17, гемостаз, тромбоциты, гемокоагуляционные нарушения, иммунопатогенез.

Общепризнано, что ключевым моментом инфекционного процесса при ГЛПС является не авторитарная роль вируса, а инициация им иммунного ответа, играющего ведущее значение в активации эндотелиальных клеток, развитии сосудистых дисфункций и, как следствие, деструктивных процессов в тканях и полиорганной недостаточности. По данным ряда исследователей, ведущую роль в патогенезе ГЛПС играет клеточный иммунный ответ [4, 7]. Однако на сегодняшний день обсуждается его двойственная роль (как защитная, так и иммунопатогенная) [14].

Как известно, геморрагический синдром – один из ведущих в клинике ГЛПС, выраженность его зачастую определяет исход заболевания. Одним из нерешенных вопросов, касающихся изменений в системе гемостаза при ГЛПС, является «феномен тромбоцитопении». Раннюю

тромбоцитопению связывают в основном с имобилизацией тромбоцитов для участия в иммунном ответе в качестве эффекторных клеток (образование тромбоцитарных агрегатов, иммунных комплексов), с разрушением клеток при репликации возбудителя, секвестированием в селезенке, перераспределением циркулирующего и пристеночного пулов тромбоцитов [1, 3]. Первоначальные исследования, направленные на выяснение этиологии тромбоцитопении, касались преимущественно связи тромбоцитопении с изменениями в системе гемостаза. Как показали Л.А. Ибрагимова и соавт., у всех больных ГЛПС имеет место синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) различной степени. При этом интересным замечанием авторов стало отсутствие связи числа тромбоцитов со стадией ДВС-синдрома. Также авторы выявили

*Афанасьева В.И.* – аспирант кафедры инфекционных болезней, e-mail: victory\_21@mail.ru

*Максёма И.Г.* – старший научный сотрудник лаборатории ГЛПС, e-mail: irinaluna@inbox.ru

*Иванис В.А.* – проф. кафедры инфекционных болезней, e-mail: ivanis2003@bk.ru

*Слонова Р.А.* – зав. лабораторией ГЛПС, e-mail: slonova@inbox.ru

повышение функциональной активности тромбоцитов, что, вероятно, приводит к их потреблению с развитием тромбоцитопении [3]. Помимо значения тромбоцитов в процессе коагуляции как компонента первого звена гемостаза (сосудисто-тромбоцитарного) в развитии ДВС-синдрома, данные клетки, безусловно, являются и важным компонентом иммунопатогенеза заболевания [2, 4]. По мнению В.А. Иванис и соавт., тромбоциты периферической крови следует считать потенциальной клеткой-мишенью хантавируса [2]. Тромбоциты, подобно макрофагам и другим эффекторным клеткам, обладают поверхностными F<sub>сe</sub>-рецепторами, с участием которых осуществляется их антителозависимая клеточная цитотоксичность, ассоциированная с IgE [6, 8, 9].

По данным Р.Т. Мурзабаевой и соавт., тромбоцитопения у больных ГЛПС связана с образованием агрегатов из тромбоцитов и их адгезией к эндотелию микрососудов, а также связыванием тромбоцитарными рецепторами продуцируемых В-лимфоцитами IgG с последующим их лизисом [7]. Данный взгляд разделяют В. Denecke et al., предполагая, что тромбоцитопения при ГЛПС может быть основана на иммунологически опосредованном разрушении тромбоцитов, учитывая положительный эффект применения кортикостероидов при данном состоянии [10]. О. Laine et al. считают, что тромбоцитопения в процессе острой эпидемической нефропатии связана с уменьшением количества естественных антикоагулянтов (антитромбин, протеины С и S), укорочением тромбинового времени и фибринолизом [15]. Как показали последние исследования И.Н. Гавриловской и соавт., патогенные хантавирусы могут связывать тромбоциты через β3-интегрин-зависимый механизм с поверхностью эндотелиальных клеток, в то время как непатогенные для человека хантавирусы не обладают данным свойством. Исследователи также сообщают, что вирусы, обнаруженные на поверхности эндотелиальной клетки, привязывают к ней покоящиеся тромбоциты. Это фундаментально меняет внешний вид эндотелиальных клеток и является потенциалом к изменению активности тромбоцита и функции эндотелиальных клеток, вызывая повышенную сосудистую проницаемость [11, 12]. Данные авторов, вероятно, базируются на результатах недавних исследований, установивших, что β3-интегрины являются главной мишенью вируса на эндотелиальных клетках [16]. Е. Maskow et al. сообщают, что на поверхности тромбоцита содержатся аналогичные рецепторы интегринов, которые также могут служить мишенью для хантавируса [16]. Как показали исследо-

вания M.J. Raftery et al., патогенные хантавирусы инфицируют клеточные линии мегакариоцитов. После индукции дифференцировки мегакариоциты останавливают пролиферацию и переключаются с низкого уровня продукции хантавируса на высокий одновременно со снижением регуляции генов, вовлеченных в антивирусный врожденный ответ. Инфекция выражается в увеличении экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I класса на клеточной поверхности, что повышает уязвимость к цитотоксической атаке. Таким образом, хантавирус-специфический иммунный ответ против инфицированных мегакариоцитов приводит к элиминации с помощью цитотоксических Т-клеток, редуцированному мегакариопоэзу и снижению продукции тромбоцитов [17].

Учитывая доказанный иммуноопосредованный патогенез заболевания, вполне обоснованным является рассмотрение взаимосвязи между изменениями гемостаза и состоянием иммунных механизмов их регуляции.

Группа цитокинов, включающая разновидности IL-17, привлекла всеобщее внимание в связи с открытием особой субпопуляции Т-хелперов – Th17, участвующей в развитии некоторых повреждающих форм воспалительных реакций, в частности, при аутоиммунных процессах. Эти цитокины продуцируются Th17, Т-клетками CD8<sup>+</sup>, эозинофилами, нейтрофилами. Рецепторы для IL-17 экспрессируются многими клетками: эпителиальными, фибробластами, клетками иммунной системы, в частности нейтрофилами [5, 9]. Высокие концентрации IL-17 могут способствовать развитию воспаления с деструкцией тканей и аутоиммунными расстройствами [6, 8, 9, 13].

Цель исследования – изучение роли IL-17 в патогенезе гемокоагуляционных нарушений при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в динамике заболевания.

#### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 60 пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, находившихся на стационарном лечении в инфекционных стационарах г. Владивостока в период 2008–2012 гг. Средний возраст группы составил 39 ± 3,6 года. Среди пациентов 79 % составили мужчины (47 человек) и 21 % – женщины (13 человек). Диагноз ГЛПС установлен на основании комплекса анамнестических, эпидемиологических данных, результатов клинического, инстру-

ментального и лабораторного видов обследования. У 100 % больных диагноз был подтвержден серологически с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител регистрацией нарастания титра специфических антител в 4 раза и более в парных сыворотках крови, взятых с интервалом 10–12 дней, а также обнаружением антител в моче этим же методом в ранние сроки болезни. Контрольную группу, по среднему возрасту сопоставимую с контингентом больных ГЛПС (36 ± 3,2 года), составили 40 практически здоровых добровольцев. Половой состав контрольной группы также соответствовал группе обследованных больных (2/3 мужчин и 1/3 женщин). Все больные были разделены на 3 группы по этиологическому признаку, а именно в зависимости от серотипа/генотипа хантавируса, вызвавшего заболевания: Seoul-инфекция, Hantaan-инфекция, Amur-инфекция. В дальнейшем каждая из трех групп была разделена также на три подгруппы по степени тяжести заболевания: легкая, среднетяжелая, тяжелая.

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 критерия Манна–Уитни, достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ . Связь между различными признаками в исследуемой

выборке определялась с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В общей группе больных содержание сывороточного IL-17 было достоверно повышено в 4 раза ( $4,14 \pm 0,54$  пг/мл при  $0,94 \pm 0,09$  пг/мл в контроле,  $p = 0,013$ ). При этом степень увеличения концентрации данного цитокина значительно различалась в зависимости от этиологии и степени тяжести заболевания (табл. 1).

Максимальный сывороточный уровень IL-17 отмечен при ГЛПС, ассоциированной с серотипом Amur ( $7,14 \pm 0,13$  пг/мл при  $0,94 \pm 0,09$  пг/мл в контроле,  $p < 0,001$ ), величина показателя возрастала с повышением тяжести заболевания. Менее выраженное увеличение наблюдалось при Seoul-инфекции ( $4,91 \pm 0,94$  пг/мл при  $0,94 \pm 0,09$  пг/мл в контроле,  $p < 0,001$ ). При ГЛПС, ассоциированной с хантавирусом Hantaan, концентрация IL-17 в сыворотке крови составила  $3,65 \pm 0,21$  пг/мл (в контроле  $0,94 \pm 0,09$  пг/мл,  $p < 0,005$ ). При этом также отмечалось нарастание содержания IL-17 с повышением тяжести заболевания.

В динамике заболевания регистрировалось достоверное снижение содержания сывороточного IL-17 наряду с нормализацией количества тромбоцитов периферической крови (табл. 2).

Таблица 1

Содержание IL-17 (пг/мл) в сыворотке крови пациентов геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в зависимости от серотипа хантавируса и степени тяжести заболевания

Степень тяжести заболевания	Amur ( $n = 15$ )	Hantaan ( $n = 20$ )	Seoul ( $n = 25$ )
Легкая	$3,54 \pm 0,07^*$	$1,93 \pm 0,02^*$	$2,04 \pm 0,73^*$
Средняя	$5,41 \pm 0,46^*$	$2,49 \pm 0,05^*$	$3,06 \pm 0,95^*$
Тяжелая	$12,46 \pm 0,18^*$	$6,54 \pm 0,32^*$	$9,64 \pm 0,14^*$

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

Таблица 2

Содержание сывороточного IL-17 и количества тромбоцитов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в динамике заболевания

Показатель	Фаза заболевания	
	Ранняя (5–7 день болезни)	Поздняя (15–19 день болезни)
Содержание IL-17, пг/мл	$5,24 \pm 0,43^*$	$2,83 \pm 0,64^{*#}$
Содержание тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	$122,54 \pm 3,51^*$	$243,85 \pm 6,17^{*#}$

Примечание. # – отличие от величины соответствующего показателя в раннюю фазу заболевания статистически значимо при  $p < 0,05$ .

Учитывая возможность аутоиммунного генеза тромбоцитопении при ГЛПС, признаваемой рядом авторов, был проведен корреляционный анализ между сывороточным уровнем IL-17 и количеством тромбоцитов периферической крови. Выявлена сильная обратная корреляционная связь между указанными показателями ( $r = -0,805$ ,  $p < 0,001$ ), что свидетельствует в пользу роли аутоиммунных механизмов в развитии тромбоцитопении при данном заболевании.

В большинстве исследований, в том числе касающихся изменений гемостаза при ГЛПС, тромбоцитопения рассматривается в рамках ДВС-синдрома. Для проверки данной гипотезы мы сравнили показатели гемостазиограммы и корреляционные связи между ними с количеством тромбоцитов периферической крови, а также сыворотным уровнем IL-17 у обследованных больных. Параметры гемостазиограммы оценивались в ранние сроки заболевания (5–6 день от начала заболевания, что соответствовало 1–2 суткам пребывания пациента в стационаре).

Основным показателем, характеризующим внешний путь свертывания крови, как известно, является ПВ (протромбиновое время). Среднее значение ПВ у обследованных больных не изменено (табл. 3). При этом корреляции между величиной ПВ и содержанием IL-17 ( $r = -0,143$ ;  $p = 0,67$ ), а также количеством тромбоцитов периферической крови ( $r = 0,21$ ;  $p = 0,53$ ) не выявлено.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) относится к основным маркерам нарушений внутреннего пути свертывания крови и одним из первых подвергается фазовым

изменениям при развитии синдрома ДВС. Среднее значение АЧТВ у обследованных пациентов находилось в пределах нормы (см. табл. 3). Корреляции между уровнями АЧТВ и IL-17 ( $r = 0,406$ ;  $p = 0,19$ ), АЧТВ и количеством тромбоцитов ( $r = -0,309$ ;  $p = 0,37$ ) также не выявлено.

Выявленное время агрегации с универсальным индуктором (УИА) (см. табл. 3) свидетельствует о сохраненной агрегационной функции тромбоцитов при ГЛПС, даже при тромбоцитопении. В пользу отсутствия связи между количеством тромбоцитов и их функциональной активностью при ГЛПС свидетельствует также значение коэффициента корреляции между количеством тромбоцитов периферической крови и временем агрегации с УИА ( $r = -0,408$ ;  $p = 0,21$ ).

Концентрация РФМК (растворимых фибриномономерных комплексов) у обследованных пациентов была значительно повышена (см. табл. 3). При этом корреляции между количеством тромбоцитов периферической крови и концентрацией РФМК ( $r = 0,23$ ;  $p = 0,59$ ), а также между содержанием сывороточного IL-17 и РФМК ( $r = 0,12$ ;  $p = 0,76$ ) не выявлено. Как известно, РФМК являются маркером тромбинемии при внутрисосудистом свертывании крови. Таким образом, данный результат свидетельствует об активации свертывания крови при ГЛПС в ранние сроки заболевания независимо от этиологической характеристики и степени тяжести инфекции.

Величины остальных показателей гемостазиограммы у обследованных пациентов оставались в пределах нормальных значений и также не коррелировали с количеством тромбоцитов периферической крови и содержанием сывороточного IL-17 (см. табл. 3).

Таблица 3

Основные показатели гемостаза у обследованных пациентов в раннюю стадию ГЛПС

Показатель	Ранняя стадия ГЛПС (n = 60)	Норма
Протромбиновый индекс, %	90,8 ± 0,84	85–105
ПВ, с	16,09 ± 1,24	12–17
Содержание фибриногена, г/л	3,79 ± 0,63	2–4
АЧТВ, с	39,09 ± 1,5	35–42
Содержание РФМК, мг/100 мл	14,62 ± 0,15	До 4
ХП-а-зависимый лизис, мин	8,13 ± 0,20	4–10
Спонтанный лизис, мин	215 ± 2,1	180–240
Этаноловый тест	Отрицательный	Отрицательный
Активность фибриназы, %	71,13 ± 1,2	50–100
Количество тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	122 ± 3,27	180–400
Время агрегации с УИА, с	17,5 ± 1,32	14–18



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлен ряд ранних маркеров гемокоагуляционных сдвигов у больных ГЛПС, которые лежат в основе геморрагического синдрома. Установлено достоверное повышение уровня IL-17 в зависимости от серотипа хантавируса и тяжести заболевания, коррелирующее с количеством тромбоцитов периферической крови. Также у обследованных пациентов зарегистрировано достоверное повышение концентрации РФМК при неизмененных остальных показателях функции системы гемостаза. Данные критерии могут служить ранними маркерами нарушений системы гемостаза и разветвления ДВС-синдрома у больных ГЛПС, что способствует своевременному распознаванию угрозы развития жизнеугрожающих состояний и проведению неотложной терапии у больных ГЛПС.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабушкина Ф.А. Особенности гемостаза при геморрагической лихорадке с почечным синдромом // Казанский мед. журн. 2003. 83. (3). 194–197.
2. Слонова Р.А., Ткаченко Е.А., Иванис В.А. и др. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Владивосток, 2006. 246 с.
3. Ибрагимова Л.А. Сравнительная оценка показателей центральной гемодинамики и взаимосвязь гемодинамических изменений с вегетативной регуляцией у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Мед. вестн. Башкортостана. 2008. 3. (2). 50–54.
4. Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника и иммунокорректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в регионе циркуляции различных серотипов хантавируса: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Владивосток, 2004.
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб., 2008. 552 с.
6. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А. Иммунология. М., 2007. 568 с.
7. Мурзабаева Р.Т. Состояние иммунной и интерфероновой систем у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Эпидемиол. инфекц. болезни. 2003. (5). 40–43.
8. Черешнев А.В., Юшков Б.Г., Климин В.Г., Лебедева Е.В. Иммунофизиология. Екатеринбург, 2002. 257 с.
9. Ярилин А.А. Иммунология. М., 2010. 752 с.
10. Denecke B., Bigalke B., Haap M. Hantaviruses infection: a neglected diagnosis in thrombocytopenia and fever? // Mayo Clin. Proc. 2010. 11. 1016–1020.
11. Gavrilovskaya I., Gorbunova E., Mackow E. Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells // Abstr. VIII Int. Conf. of HFRS, HPS and hantaviruses: Athens, 2010. 172.
12. Gavrilovskaya I.N., Gorbunova E.E., Mackow E.R. Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells // J. Virol. 2010. 84. (9). 4832–4839.
13. Kimura A., Kishimoto T. Th17 cells in inflammation // Int. Immunopharmacol. 2011. 11. (3). 319–322.
14. Krüger D.H., Schönrich G., Klempa B. Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection // Hum. Vaccin. 2011. 7. (6). 685–693.
15. Laine O., Joutsu-Korhonen L., Mäkelä S. et al. Thrombocytopenia during acute nephropathia epidemica associates with thrombin generation and fibrinolysis // Abstr. VIII Int. Conf. of HFRS, HPS and hantaviruses: Athens, 2010. 151.
16. Mackow E., Gavrilovskaya I. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2001. 256. 91–115.
17. Raftery M.J., Lutteke N., Lalwani P. Switch to high-level Hantaan virus replication in megakaryocytic cells after stimulation of differentiation through the Ras/MAPK pathway // Abstr. VIII Int. Conf. of HFRS, HPS and hantaviruses: Athens, 2010. 68.

## **THE ASSESSMENT OF HEMOCOAGULATION DISORDERS AND IMMUNE MECHANISMS OF THEIR REGULATION AT HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN REGION OF CIRCULATION OF SEVERAL SEROTYPES OF HANTAVIRUSES**

**Viktoriya Igorevna AFANAS'EVA<sup>1</sup>, Irina Gennad'evna MAKSEMA<sup>2</sup>,  
Viktoriya Aleksandrovna IVANIS<sup>1</sup>, Raisa Aleksandrovna SLONOVA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Vladivostok State Medical University of Minzdrav of Russia  
690002, Vladivostok, Ostryakov av., 2*

<sup>2</sup> *FSBI «RI for Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov» of SB RAMS  
690087, Vladivostok, Selskaya str., 1*

---

Hemorrhagic disorders, especially the «phenomenon of thrombocytopenia», are typical and, at the same time, unknown syndrome in hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). The aim: to study the role of IL-17 in the pathogenesis of gemocoagulation disorders in hemorrhagic fever with renal syndrome in the course of the disease. Materials and methods: a comprehensive clinical and laboratory examination of 60 patients with hemorrhagic fever with renal syndrome, taking place in infectious hospitals of Vladivostok in 2008–2012 has been done. Results: a significant increase IL-17 in serum of patients with HFRS, associated with different serotypes of hantavirus, which correlates with the level of platelets in peripheral blood are revealed. Also the significant increase in the concentration of soluble fibrin-monomer complexes in the patients serum with the other unchanged rates of the haemostatic system.

---

**Key words:** hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), interleukin 17, hemostasis, thrombocytes, hemocoagulation disorders, immunopathogenesis.

*Afanas'yeva V.I. – postgraduate student of the chair of infectious diseases, e-mail: victory\_21@mail.ru*

*Maksema I.G. – senior researcher of the laboratory of HFRS, e-mail: irinaluna@inbox.ru*

*Ivanis V.A. – professor of the chair of infectious diseases, e-mail: ivanis2003@bk.ru*

*Slonova R.A. – head of the laboratory of HFRS, e-mail: slonova@inbox.ru*

## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА МОРСКИХ ЕЖЕЙ – ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Сергей Петрович КРЫЖАНОВСКИЙ

Медицинское объединение ДВО РАН  
690022, г. Владивосток, ул. Кирова, 95

В обзоре изложены современные представления о биологической активности гонад морских ежей и метаболитов, выделенных из этих морских беспозвоночных животных. Показан их антиоксидантный, антигиперлипидемический, противовоспалительный, противоопухолевый и антибактериальный эффекты. Представлены материалы об оригинальных лекарственных препаратах, полученных учеными Дальнего Востока на основе хиноидных пигментов морских ежей. Обсуждаются перспективы получения новых лекарственных препаратов и БАД на основе метаболитов иглокожих, а также возможности расширения области применения гистохрома при других нозологических формах.

**Ключевые слова:** морские ежи, гонады, хиноидные пигменты, эхинохром, гистохром, антиоксидантная, противовоспалительная активности.

Биологическое разнообразие Мирового океана составляет неограниченный ресурс в области создания новых физиологически активных соединений. Биологически активные вещества (БАВ), выделенные из морских животных, водорослей и бактерий, обладают широким спектром биологической активности по отношению к различным биосистемам, включая антибактериальную, антикоагулянтную, противогрибковую, противоопухолевую, проапоптотическую и антигиперхолестеринемическую активности [2–4, 30, 41]. Благодаря адаптации к разнообразным факторам окружающей среды ряд морских животных и растений выработал способность к продукции уникальных вторичных метаболитов, многие из которых обладают экстремально высокой фармакологической активностью [41, 52]. В настоящем обзоре даны современные представления о спектре биологической активности БАВ из морских ежей и о лекарственных препаратах, в частности, рекомендованных при ассоциированных с атеросклерозом заболеваниях.

Морские ежи – донные животные, обитающие практически во всех морях и океанах (за исключением слабосоленых), относятся к классу иглокожих – Echinoidea [32]. Уже более 100 лет гонады морских ежей (икра) используются в качестве экспериментальной модели в исследовании различных аспектов биологии раннего развития. Этому способствует возможность получения

больших партий зрелых гамет, синхронность развития зародышей, легкость инкубирования эмбрионов [5]. Эмбрионы морских ежей в настоящее время широко применяют для тестирования различных фармакологических препаратов, для исследования влияния на эмбриональное развитие токсикантов внешней среды, оказывающих вредное воздействие на организм [23, 44, 68].

Традиционно для ихтиофауны и многих других морских организмов к понятию «икра» относят только гонады самки. У морских ежей – гонады самца и яичники самки.

Гонады морского ежа широко используются в современной медицине или в виде нативного продукта, или в составе различных биологически активных добавок. Для жителей Японии гонады морского ежа – национальное лакомство. Ежегодно они употребляют в пищу свыше 5000 тонн икры морских ежей в чистом виде и в качестве добавок к различным блюдам. Именно с частым использованием икры морского ежа связывают в этой стране одну из самых высоких в мире продолжительность жизни.

Морские ежи содержат большой набор биологически активных веществ [17, 42]. В состав белка гонад морских ежей входят все незаменимые аминокислоты в количествах, соответствующих полноценному белку. В период размножения масса гонад (икры) достигает 20 % живой массы морских ежей.

*Крыжановский С.П. – к.м.н., главный врач*

Другим важным компонентом икры являются жиры, составляющие 4,3–4,5 %. Основные классы липидов в гонадах ежей – триглицериды и фосфолипиды. Липидный комплекс икры морских ежей включает насыщенные, мононенасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты, количество которых существенно смещено в сторону незаменимых полиненасыщенных. Доминируют эйкозопентаеновая и эйкозотетраеновая кислоты, способствующие нормализации липидного обмена [42]. Липидный состав икры представлен также холестерином, свободными жирными кислотами, ди- и триглицеридами и эфирами стерина. Среди фосфолипидов морских ежей идентифицированы лецитин, фосфатидилсерин, сфингомиелин, кефалин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин [14]. В икре ежей около 30 % полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), включая омега-3 и омега-6 ПНЖК. Она обладает широким спектром необходимых микроэлементов в легкоусвояемой форме и несколько повышенным содержанием йода.

Икра морских ежей содержит жирорастворимые витамины А, D, E и водорастворимые витамины С, В1, В2, В6, В12 [61]; витамина А в ней в 20 раз больше, чем в корне женьшеня. Концентрация микроэлементов в тканях и икре иглокожих в 10 раз выше, чем у рыб, и более чем в 50–100 раз – чем у наземных животных. В иглокожих обнаружено свыше 36 микро- и макроэлементов, в том числе медь, цинк, кобальт, железо, никель, хром, марганец, натрий, калий, магний.

К настоящему времени известно более 100 болезней, возникновению которых способствует гиперпродукция в организме свободных радикалов. Среди них диабет, атеросклероз, рак, ревматоидный артрит и др. В связи с этим большое внимание в последние десятилетия привлекают экзогенные БАВ с антиоксидантным потенциалом, получаемые из морских гидробионтов – водорослей, беспозвоночных, животных, рыб [60, 70]. Эти соединения способны блокировать реакции свободнорадикального окисления, восстанавливая окисленные макромолекулы [7, 31, 35, 39, 50, 58, 69].

Морские ежи давно признаны источниками антиоксидантов, что обусловлено наличием в их составе большого числа БАВ, которые могут прерывать цепные реакции перекисного окисления в клетках несколькими способами: перехватывать свободные радикалы, хелатировать металлы-катализаторы перекисации, ингибировать липоксигеназы, а также способны синергически активироваться фосфолипидами плазматических мембран [15, 46, 47, 59, 63, 70]. Антиоксидантными свойствами обладают также внутренние

органы и ткани, а также панцири и иглы морских ежей [47]. На проявление антиоксидантной активности влияет метод экстракции [59, 64].

Важную роль в инактивации свободных радикалов отводят внутриклеточным и внеклеточным ловушкам, обеспечивающим обрыв цепи свободнорадикального окисления. Эффективными перехватчиками радикалов являются фенольные антиоксиданты, в частности, простые фенолы, нафтолы и окси-производные других ароматических соединений. К настоящему времени выделено несколько тысяч фенолов, среди которых выраженным антиоксидантным эффектом обладают витамины E и K, убихиноны, триптофан и фенилаланин, а также большинство растительных и животных пигментов, в частности, каротиноиды, флавоноиды, оксифенилкарбоновые кислоты.

В экстрактах из гонад и внутренних органов морских ежей присутствуют каротиноиды, обладающие антиоксидантными свойствами [34, 38, 48]. Основным каротиноидом стенок кишечника морских ежей является фукоксантинол, гонад, панциря и игл –  $\alpha$ -эхинонен и  $\beta$ -каротин [9]. По своей химической природе каротиноиды относятся к сильноненасыщенным соединениям терпенового ряда преимущественно с 40 углеродными атомами в молекуле, построенным по единому структурному принципу. Присутствие большого количества (11 и более) двойных связей придает каротиноидам высокую биологическую активность, которая проявляется в торможении процессов перекисного окисления липидов и определяет такие их биологические функции, как предотвращение раковых и возрастных повреждений, радиационных поражений, сердечно-сосудистых заболеваний. Регуляторные эффекты каротиноидов обусловлены их способностью встраиваться в мембранные фосфолипидно-белковые структуры, изменять текучесть мембран в жидкокристаллическом состоянии. Это сопровождается модификацией контактов взаимодействия липидов, белков и может быть существенным фактором проявления антиоксидантной активности каротиноидов [48].

Присутствующие в гонадах морских ежей фосфолипиды [14, 27, 46, 47, 61] являются необходимыми структурными элементами клеточных мембран, структура и функции которых нарушаются под действием любых повреждающих факторов. Повреждения могут приводить к образованию физических дефектов в мембранах и выходу наружу содержимого клеток. В связи с этим представляется оправданным использование фосфолипидов или продуктов, содержащих их, для замещения дефектов и восстановления нарушенной барьерной функции мембран, по-

сколькo фосфолипиды стабилизируют мембранные белки.

Кроме антиоксидантного действия экстракты гонад морских ежей и тканей внутренних органов оказывают множество других эффектов, в частности, обладают противоопухолевой активностью. Так, дихлорметановый экстракт гонад морского ежа *Strongylocentrotus nudus* подавлял рост мышинных лейкемических лимфобластов [64]. Китайские ученые [10] выделили сульфатированные полисахариды из гонад морского ежа *Hemicentrotus pulcherrimus*. Установлено, что они содержатся в покрывающей гонады желеобразной оболочке [36, 53–57]. Содержание сульфата во фракциях составляло 57,7 %. Полисахариды ХВ-1 и ХВ-3 обладали противоопухолевой активностью. ХВ-1 дозозависимо ингибировал рост клеточных культур А549, МСF-7 и HeLa (63,2, 18,2 и 42,08 % соответственно) в дозе 50 мкг/мл. Фракция ХВ-3 в такой же дозе подавляла рост клеток HeLa (35,15 %).

Ранее [37] было показано противоопухолевое действие сульфатированных полисахаридов. По-видимому, в составе икры эти биополимеры, покрывающие желеобразной оболочкой гонады ежей, тоже проявляют свои многочисленные полезные свойства [45].

Чрезвычайно важным является свойство икры морских ежей нормализовать липидный профиль сыворотки крови. Наши исследования показали, что маристим – БАД на основе икры морских ежей – обладает антидислипидемическим действием [16]. В его состав входят следующие ингредиенты: жиры – 20 % (триглицериды – 60–75 %, фосфолипиды – 22–36 %, в составе фосфолипидов преобладает лецитин – 61–67 %), ПНЖК омега-3 – более 20 %, сиалогликолипиды, каротиноиды, витамины (С, В1, В2, В12, РР, К1 и др.), макро- и микроэлементы (йод, железо, медь, кобальт и др.) в легкоусвояемой форме, незаменимые аминокислоты, нуклеиновые кислоты. БАД маристим разрешена к применению (санитарно-эпидемиологическое заключение Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 77.99.20.916Б.000796.04 от 01.06.2004.). Маристим рекомендован в качестве дополнительного источника антиоксидантов.

В экспериментах на мышах, получавших атерогенную диету, было установлено, что под влиянием маристима происходит нормализация показателей липидного обмена: снижение содержания холестерина липопротеинов низкой (ХС ЛПНП) и очень низкой плотности, триглицеридов, коэффициента атерогенности. Важно отметить, что одновременно повышался уровень

ХС липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). При этом показатели холестерина обмена у животных, получавших маристим на фоне атерогенной диеты, восстанавливались в большей степени по сравнению с мышами, получавшими БАВ после развития гиперхолестеринемии.

Полученные результаты дали основание для включения маристима в качестве средства сопровождения базисной терапии пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Под нашим наблюдением находились 45 пациентов (18 мужчин и 27 женщин) в возрасте от 45 до 70 лет (средний возраст –  $60,2 \pm 4,2$  года) с диагнозом «ишемическая болезнь сердца: стабильная стенокардия напряжения 2–3 функционального класса». Все обследуемые находились на стационарном лечении в терапевтическом отделении Медицинского объединения ДВО РАН. Диагноз устанавливали на основании критериев ВОЗ, функциональный класс стенокардии – по классификации Канадского кардиологического общества. В ходе исследования были сформированы следующие группы пациентов: 1-я группа – 15 больных, получавших базовую терапию, включавшую аторвастатин в дозе 20 г в сутки; 2-я группа – 15 больных, получавших базовую терапию, включавшую маристим в дозе 4,5 г в сутки; 3-я группа – 15 больных, получавших базовую терапию, включающую аторвастатин (10 мг в сутки) и маристим в дозе 4,5 г в сутки. Лечение проводили в течение 4 недель. Все группы были сопоставимы по полу, возрасту и функциональному классу стенокардии.

У пациентов всех групп наблюдения отмечался липидснижающий эффект. Гиполипидемическое действие маристима отмечено и в условиях монотерапии. Так, снижение уровня общего ХС в этом случае было сопоставимо с эффектом монотерапии аторвастатином. Более значительное уменьшение содержания общего ХС при комбинированной терапии определенно связано с маристимом, тем более что пациенты 3-й группы получали аторвастатин в половинной дозе. Действие маристима на уровень ХС ЛПНП (2-я группа) уступало эффекту аторвастатина (в дозе 20 мг). Однако в комбинации даже с половинной дозой аторвастатина (10 мг) липидснижающее действие было достоверно выше, чем при монотерапии большей дозой статина.

Наиболее значимым было действие маристима на уровень триглицеридов. При монотерапии он оказался в 3 раза эффективнее аторвастатина, а при комбинированной терапии – в 2 раза. Коэффициент атерогенности во всех группах был примерно одинаковым. Известно, что кроме атерогенных липидов (ХС ЛПНП) установлена причинно-следственная связь между низким

содержанием ХС ЛПВП и прогрессированием атеросклероза. Отмечаются особые трудности в повышении уровня этого ХС, в то время как положительный эффект в этом направлении – путь к снижению смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Здесь особенно наглядно проявлялось действие маристима, который повышал содержание ХС ЛПВП в крови, что было отмечено как при монотерапии, так и при комбинированном лечении. Степень повышения концентрации ХС ЛПВП в крови была в первую очередь связана с маристимом, так как аторвастатин в этой группе пациентов применялся в меньшей дозе, чем при монотерапии. Маристим можно использовать в качестве эффективного средства сопровождения базисной терапии пациентов с ИБС, включающей статины, а также для профилактики дислипидемии при гипертонической болезни.

Отмечен противовоспалительный эффект экстрактов икры морских ежей. Так, водный экстракт гонад проявлял противовоспалительное действие при адьювантном артрите крыс – снижал интенсивность симптомов артрита на 55 %. Более сильный эффект наблюдался при использовании дихлорметанового экстракта (75 %). Экстракты не оказывали токсического действия на гепатоциты крыс [64].

Из икры морских ежей выделены также регуляторные пептиды [28]. Известно, что в числе современных геропротекторных средств регуляторные пептиды, не имеющие существенных побочных эффектов, занимают заметное место. Большинство из них получено из органов и тканей млекопитающих. Получение регуляторных пептидов из беспозвоночных животных, в частности из морских ежей, может быть альтернативой использования тканей наземных животных. В икре морских ежей обнаружен Са-связывающий белок – кальмодулин, играющий ведущую роль в формировании панциря на ранних этапах развития организма. Кальмодулин – одноцепочечный белок, присутствующий во всех организмах животного и растительного мира. Он состоит из 148 аминокислотных остатков, 25 % из которых – остатки Глу и Асп, а 10 % – Лиз и Арг. Как полагают А.Ю. Соловьев и др. [28], последующая деградация кальмодулина в протеосомах приводит к образованию пула эндогенных регуляторных ди-, три- и тетрапептидов, входящих изначально в состав кальмодулина в форме заряженных блоков и кластеров. Это является основанием для поиска и выделения из икры морских ежей регуляторных пептидов, обладающих регулирующей и геропротекторной активностью. Эти же авторы показали, что пептидные препараты, выделенные из икры морских ежей, оказывают стимулирую-

щее действие на эксплантаты в органотипической культуре различных тканей. Наиболее выраженное действие щелочных пептидов было на кору головного мозга крыс, кислых пептидов – на ткани репродуктивной системы.

Когда-то изобретение антибиотиков во всем мире считалось прорывом. Однако почти сразу же стали появляться микроорганизмы, нечувствительные к действию этих лекарств. В настоящее время антибиотикоустойчивость микробов начинает приобретать масштабы катастрофы. По прогнозу ВОЗ уже через 10–20 лет практически все существующие микроорганизмы станут устойчивыми к существующим антибиотикам.

В связи с этим огромное значение приобретают исследования ученых, связанные с получением антимикробных (антибактериальных и антигрибковых) препаратов из морских гидробионтов, в том числе, из морских ежей. В литературе достаточно много данных, посвященных этому вопросу [33, 62, 63], ниже приведены лишь некоторые из них.

Так, установлена антибактериальная активность метанольного экстракта из панцирей морских ежей *Temnopleurus alexandri* [67]. В качестве тест-микробов были взяты *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (грамположительные микроорганизмы) и *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* (грамотрицательные микроорганизмы). Все микроорганизмы были чувствительны к экстракту, причем зона подавления роста увеличивалась с возрастанием концентрации экстракта. Наиболее чувствительными микроорганизмами были *B. subtilis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* и *P. vulgaris*. В экстракте было установлено присутствие следующих компонентов: пентадекан, гептадекан, эйкозан, хенэйкозан, докозан. Каждый из этих компонентов может представлять интерес для дальнейшего изучения в качестве антимикробного соединения.

Целомическая жидкость и экстракт целомочитов морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* представлены в качестве нового антибиотика [40].

Ткани морских ежей также содержат антибактериальные вещества. Хлороформные и метаноловые экстракты, полученные из кишечника, гонад, шипов этих животных, обладали высокой антибактериальной активностью. В качестве тест-микробов использовали *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Shigella sonnei* и *P. aeruginosa*. Одновременно экстракты испытывали на гемолитическую активность против эритроцитов человека. Бактерии были чувствительны к обоим экстрактам, полученным из гонад и кишечника морских ежей [33].

Доказано антибактериальное действие пептида, выделенного из эффекторных клеток морского ежа *Paracentrotus lividus* [65]. Пептид препятствовал образованию пленки *Staphylococcus epidermidis* DSM 3269 и *S. aureus* ATCC2913. Применение таких пептидов может быть новой стратегией в антимикробной терапии.

Таким образом, все ткани морских ежей содержат антибактериальные вещества, которые лучше всего экстрагируются метанолом и этанолом.

К сожалению, на фармацевтическом рынке еще нет лекарственных антибактериальных средств, полученных на основе БАВ из морских ежей. Во-первых, и это самое главное, в настоящее время трудно получить из гонад и тканей внутренних органов этих животных стандартные антимикробные препараты и, во-вторых, для создания одного антибиотика требуется не менее 10 лет и значительные денежные средства.

Завершая обсуждение эффективности БАВ из гонад и тканей внутренних органов морских ежей, следует отметить большой полезный потенциал этих соединений, которые в дальнейшем могут стать основой для создания лекарственных препаратов антиоксидантного, противовоспалительного, противоопухолевого, антидислипидемического, геропротекторного действия. Кроме того, эти БАВ могут быть кандидатами в новые антибиотики, в которых сейчас так нуждается медицина.

Огромный интерес представляют исследования биологической активности пигментов морских ежей.

Эхинохром и спинохромы А, В, С, D и Е – хиноидные пигменты морских ежей, которые получают из панцирей и игл этих животных, – относятся к нафтохинонам. От нафтохинонов других морских животных они отличаются присутствием в молекуле хинона большого числа свободных гидроксильных групп и ярко выраженными антиоксидантными свойствами [43, 63]. Наиболее активен эхинохром А – 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон. Как и экстракты гонад и тканей внутренних органов ежей, этот пигмент ценен тем, что он может прекращать цепные реакции перекисного окисления липидов в клетках. Было установлено, что эхинохром способен нейтрализовать основные инициаторы неферментативного процесса окисления мембранных липидов – катионы железа, накапливающиеся в зоне ишемического повреждения ткани. Высокий антиоксидантный потенциал выделяет пигменты морских ежей среди других антиоксидантов как перспективные соединения для создания на их

основе новых лекарственных препаратов для терапии широкого спектра заболеваний.

На основе природного липофильного эхинохрома, который был переведен в растворимое состояние при сохранении его свойств, в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН были созданы новые эффективные лекарственные препараты «Гистохром для кардиологии» и «Гистохром для офтальмологии», которые широко применяются в настоящее время во многих регионах РФ [11–13, 18–20, 25]. Новые свойства препарата позволяют активным молекулам проникать непосредственно к мишени действия, что дало возможность использовать его при целом ряде болезней, в частности, ИБС и остром инфаркте миокарда. Учеными Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН найден доступный природный источник эхинохрома – один из видов плоских морских ежей. Кроме того, разработаны препаративные способы полного синтеза эхинохрома, дающие целевое соединение с высоким выходом [29].

Известно, что важной причиной реперфузионного повреждения миокарда является продукция свободных радикалов в миокарде, превышающая способность кардиомиоцитов их нейтрализовывать. На ранних стадиях реперфузии активация перекисного окисления липидов носит взрывной характер и концентрация его продуктов возрастает в 3–4 раза. В этих условиях гистохром зарекомендовал себя как безопасный эффективный препарат для лечения пациентов с такими нарушениями. Гистохром имеет близкий к физиологическому окислительно-восстановительный потенциал и может брать на себя функцию переносчика электронов в дыхательной цепи митохондрий. Отмечено не только антиоксидантное, но и кардиометаболическое действие гистохрома, который уменьшает зону некроза при инфаркте миокарда на 57 %, восстанавливает сократительную способность левого желудочка, уменьшает частоту реперфузионных желудочковых аритмий [20].

У больных с геморрагическим инсультом [19] введение гистохрома сопровождается более быстрым уменьшением перифокального отека, нарушений микроциркуляции, выраженности ишемии и воспалительной реакции, что проявлялось опережающим по сравнению с контрольными животными уменьшением неврологических симптомов и улучшением поведенческих реакций.

Полигидроксиафтохинон эхинохрома А, выделенный из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, будучи сильным антиоксидантом, оказывает выраженное корригирующее действие при гиперлипидемии и аллоксановом диабете.

Особенностью биополимера является высокая растворимость в воде, что делает возможным перехват водорастворимых радикалов, в частности, супероксидного анион-радикала. Эхинохром А не только перехватывает пероксирадикалы, но и уменьшает концентрацию инициатора окисления путем хелатирования ионов  $Fe^{2+}$ . Эффекты эхинохрома А связаны с его высоким окислительно-восстановительным потенциалом. При окислении полигидроксиафтохинона кислородом в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  образуется перекись водорода, которая в оптимальных физиологических концентрациях может играть роль вторичного посредника во внутриклеточной сигнализации и передаче сигналов для межклеточного взаимодействия. Кроме того,  $H_2O_2$  исполняет роль сигнальной молекулы, вызывая резкое усиление синтеза главных регуляторов углеводного и липидного обменов PPAR (рецепторы-активаторы пролиферации пероксисом).

Механизм противовоспалительного действия эхинохрома А по разным внутриклеточным биохимическим путям описан О.А. Кривошапко и А.М. Поповым [15]. Авторы показали, что PPAR ингибируют синтез ферментов (фосфолипазы А2, циклооксигеназы, липоксигеназы), участвующих в образовании эйкозаноидов, вследствие чего уменьшается содержание лейкотриенов, простагландинов, обладающих провоспалительными свойствами, а также ингибируют транскрипционные факторы, модулирующие экспрессию провоспалительных генов (циклооксигеназы-2, индуцибельной NO-синтазы, фактора некроза опухоли- $\alpha$  и интерлейкинов 1 $\beta$  и 6).

Как показали М. Mueller et al. [51], при гиперлипидемии и сахарном диабете имеют место признаки воспаления. Поэтому, как считают О.А. Кривошапко и А.М. Попов [15], изменяя в рационе питания соотношение количеств ПНЖК семейств омега-3 и омега-6, полученных из морских гидробионтов и, в частности, из морских ежей, можно значительно уменьшить воспалительные явления. Одновременно, поскольку морские ежи являются источниками биоантиоксидантов, можно ингибировать пути индукции воспалительных процессов в организме, нейтрализовать активные формы кислорода и блокировать цепные реакции.

Широкое применение гистохром (другая лекарственная форма) нашел в офтальмологии, в частности при патологиях, связанных с кровоизлияниями в стекловидное тело и сетчатку, дегенеративными и воспалительными заболеваниями роговой, сосудистой и сетчатой оболочек глаза [18, 20]. Показана высокая регенерирующая способность гистохрома при лечении ожогов глаз

[6]. Клинические наблюдения показали, что гистохром оказывает положительное действие при глаукоме, катаракте. Получены убедительные результаты, подтверждающие эффективность гистохрома при пролиферативных процессах, дегенерации и гемофтальмах различного генеза. Препарат оказывает геморезорбционное, ретинопротекторное действие, обладает антиоксидантными свойствами. Все это открывает новые возможности в лечении большого числа глазных заболеваний.

В последние годы хабаровскими учеными проведена серия интересных исследований эффективности эхинохрома при легочных заболеваниях у детей [11–13]. Установлено, что у детей с хроническими воспалительными заболеваниями легких в стадии ремиссии с пороками развития легких препарат эффективно реализует свои антиоксидантные свойства и значительно снижает интенсивность свободнорадикального окисления.

Эхинохром обладает и противоопухолевыми свойствами [8]. В экспериментах на мышах-гибридах F1(C57Bl $\times$ CBA), получавших эхинохром, было установлено торможение перевитой животным карциномы Эрлиха (к 15-му дню торможение составило 60 % при внутрибрюшинном введении). Введение эхинохрома вызывает подавление гиперпродукции активных форм кислорода нейтрофилами крови мышей с опухолью, приближая их уровень к таковому у здоровых животных, при этом одновременно снижается образование нитратов и нитритов (на 29,2 и 95 % соответственно по сравнению с мышами, не получавшими эхинохром). Результаты исследования свидетельствуют о способности эхинохрома в дозах, далеких от токсичных, замедлять рост аденокарциномы Эрлиха у мышей. Замедление роста опухоли, вероятнее всего, происходит за счет модулирующего действия эхинохрома на антиоксидантный статус мышей.

Наиболее распространенным экзотоксикантом является свинец. Е.Ю. Приезжева и др. [26] в экспериментах на крысах установили, что однократное пренатальное воздействие нитрата свинца вызывает деструктивные изменения в почках, регистрируемые в отдаленных периодах постнатального органогенеза. Основным биохимическим механизмом токсического воздействия нитрата свинца является декомпенсированная активация свободнорадикального окисления на органном и организменном уровне. Эхинохром А полностью устранял нарушения в системе «генерация свободных радикалов – детоксикация свободных радикалов» в почках 40-суточных белых крыс, обусловленные пренатальным воздействием нитрата свинца. Эти данные обоснованы



ываают возможность применения эхинохрома А для пренатальной профилактики и коррекции нарушений свободнорадикального статуса почек, обусловленных воздействием экзотоксиканта.

Гистохром нашел применение при реабилитации больных после косметических операций [22]. У таких пациентов наблюдается стимуляция лимфотока, нормализация лимфодренажа, восстановление микроциркуляции в регионе орбиты, устраняется эндотоксикоз на регионарном, органном и системном организменном уровне.

Эхинохром служит также источником получения других биологически активных веществ, в частности, пурпурогаллина, который является цитопротектором для клеток печени, почек, клеток миокарда, способен ингибировать синтез ДНК некоторых опухолевых клеток, проявляет антибактериальное действие по отношению к грамположительным микроорганизмам, в частности, *S. aureus* [24]. Это БАВ также является ловушкой супероксидных анион-радикалов, пероксида водорода и гидроксильных радикалов. Кроме того, пурпурогаллин нормализует состав крови у больных ИБС.

На основе эхинохрома в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН разработана биологически активная добавка к пище Тимарин [1, 21]. Тимарин при курсовом пероральном применении в дозе 1 мг эхинохрома А оказывает мягкое модулирующее влияние на различные системы организма: оптимизирует липидный спектр крови, что приводит к снижению риска развития атеросклероза и характерных для этого патологического процесса заболеваний, обладает иммуностимулирующим действием – увеличивает субпопуляцию естественных киллеров, усиливает экспрессию мембранных маркеров активации иммунокомпетентных клеток (рецепторов IL-2 и антигенов HLA-DR).

Таким образом, эхинохром и его лекарственные формы в настоящее время используются в качестве эффективных антиоксидантов при различных патологических состояниях организма. Задачей на последующие годы является расширение области клинического использования этих лекарственных средств.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюков А.А., Попов А.М., Цыбульский А.В. и др. Фармакологическая активность эхинохрома А отдельно и в составе БАД «Тимарин» // Биомед. химия. 2012. 58. (3). 281–290.
2. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. Природный модификатор функций врожденного иммунитета (ДНК из молок дальневосточных лососей). Владивосток: Медицина ДВ, 2010. 192 с.
3. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Макаренко И.Д. и др. Сульфатированные полисахариды водорослей – модификаторы функций врожденного иммунитета при бактериальных, вирусных и паразитарных болезнях // Успехи соврем. биол. 2011. 131. (5). 503–517.
4. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С. Новые агонисты рецепторов врожденного иммунитета из морских гидробионтов // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2011. (5). 98–106.
5. Варешин Н.А. Влияние электромагнитных полей и некоторых веществ на процессы раннего эмбриогенеза морских ежей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2008.
6. Гусева М.Р., Беспанеева М.Б. Клиническое обоснование эффективности применения антиоксидантного отечественного препарата «гистохром» // Вестн. офтальмол. 2010. (3). 37–39.
7. Даниленко А.О. Регуляция свободнорадикальных процессов и апоптоза при окислительном стрессе: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 2012.
8. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Ильницкий А.П. и др. Действие природного антиоксиданта эхинохрома на рост подкожно перевитой аденокарциномы Эрлиха // Рос. онкол. журн. 2005. (3). 32–36.
9. Задорожный П.А. Влияние среды и состояния организма на содержание каротиноидов у морских ежей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2003.
10. Интернет-ресурс: <http://www.tumorres.com/tumor-stem-cell/699.htm>.
11. Козлов В.К., Козлов М.В., Лебедев О.А. и др. Клинико-экспериментальное обоснование применения эхинохрома А для коррекции и профилактики структурно-метаболических нарушений в системе органов дыхания на ранних этапах онтогенеза // Дальневосточн. мед. журн. 2009. (2). 58–61.
12. Козлов В.К., Козлов М.В., Гусева О.Е. и др. Антиоксидантная активность эхинохрома А при хронических воспалительных заболеваниях легких у детей // Тихоокеан. мед. журн. 2009. (3). 106–107.
13. Козлов В.К., Козлов М.В., Лебедев О.А. и др. Влияние эхинохрома А на некоторые параметры системного свободнорадикального статуса и Т-клеточного иммунитета у детей с хроническими воспалительными заболеваниями легких в стадии ремиссии // Дальневосточн. мед. журн. 2010. (1). 55–58.
14. Костецкий Э.Я., Веланский П.В., Санина Н.М. Фосфолипиды органов и тканей иглокожих и оболочников залива Петра Великого (Японское море) // Биология моря. 2012. 38. (1). 65–71.
15. Кривошапко О.А., Попов А.М. Лечебные и профилактические свойства липидов и антиоксидантов, выделенных из морских гидробионтов // Вопр. питания. 2011. (2). 4–8.

16. Крыжановский С.П., Яцкова М.А., Головачева В.Д. Гиполипидемическое действие БАД к пище из икры морских ежей в монотерапии и комбинации с аторвастатином // Тихоокеан. мед. журн. 2012. (1). 29–31.
17. Лебская Т.К., Шаповалова Л.А. Биохимические особенности баренцевоморского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* и аспекты его переработки. Мурманск, 2008. 146 с.
18. Мищенко Н.П., Федореев С.А., Догдодова Л.П. Препарат гистохром для офтальмологии // Вестн. ДВО РАН. 2004. (3). 111–119.
19. Мищенко Н.П., Федореев С.А., Гусев Е.И. и др. Влияние гистохрома на динамику неврологических нарушений и МРТ-картины при экспериментальном геморрагическом инсульте // Журн. неврол. Инсулт. 2005. (15). 61–66.
20. Пат. 2134107 РФ. Препарат «гистохром» для лечения воспалительных заболеваний сетчатки и роговицы глаз / Г.Б. Еляков, О.Б. Максимов, Н.П. Мищенко и др.; опубл. 10.08.99.
21. Пат. 2340216 РФ. Биологически активная добавка к пище и способ ее получения / А.А. Артюков, В.П. Глазунов, Э.П. Козловская; опубл. 10.12.08.
22. Пат. 2366413 РФ. Способ реабилитации больных после косметических операций / В.И. Братко, В.В. Атаманов, А.В. Кулаков; опубл. 10.09.09.
23. Пат. 2375710 РФ. Способ определения экологического статуса территорий на содержание стронция / С.Ф. Тютиков, В.В. Ермаков; опубл. 25.09.08.
24. Пат. 2396244 РФ. Способ получения пурпурогаллина / А.А. Артюков, В.В. Маханьков, Е.В. Купера и др.; опубл. 10.08.10.
25. Попов А.М. Биологическая активность и механизмы действия вторичных метаболитов из наземных растений и морских беспозвоночных: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Владивосток, 2003.
26. Приезжева Е.Ю., Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Козлов В.К. Влияние эхинохрома А на процессы свободнорадикального окисления в почках 40-суточных белых крыс, подвергнутых пренатальному воздействию нитрата свинца // Здоровье. Мед. экол. Наука. 2009. (4–5). 39–40.
27. Родькина С.А., Чэнь Б. Влияние температуры как фактора среды на состав липидов и жирных кислот в гонадах морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Изв. ТИНРО. 2007. (148). 289–296.
28. Соловьев А.Ю., Морозова П.Ю., Чернова И.А. и др. Выделение и активность регуляторных пептидов из икры морских ежей // Химико-фармацевтич. журн. 2010. (11). 14–17.
29. Стоник В.А. Изучение природных соединений в ТИБОХ ДВО РАН // Вестн. ДВО РАН. 2005. (4). 138–144.
30. Стоник В.А., Толстиков Г.А. Природные соединения и создание отечественных лекарственных препаратов // Вестн. ДВО РАН. 2008. 78. (8). 675–687.
31. Халфина Т.Н. Клинико-патогенетические аспекты висцеральных проявлений при подагре: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Казань, 2012.
32. Явнов С.В. Атлас иглокожих и асцидий дальневосточных морей России. Владивосток, 2010.
33. Abubakar L., Mwangi C., Uku J., Ndirangu S. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* // Afr. J. Pharmacol. Ther. 2012. 1. (1). 19–23.
34. Bandaranayake W.W. The nature and role pigments of marine invertebrates // Nat. Prod. Rep. 2006. 23. 223–255.
35. Chairman K., Aja R.S., Alagomuthu G. Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges // Asian Pac. J. Trop. Dis. 2012. 28. 234–238.
36. Cinelli L.P., Vilela E.S., Mourao A.S. Seminal fluid from sea urchin (*Lytechinus variegatus*) contains complex sulfated polysaccharides linked to protein // Comp. Biochem. Physiol. 2009. 5. 258–265.
37. Cumashi A., Ushakova N.A., Peobrazhenskaya M.E. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds // Glicobiology. 2007. 17. (5). 541–552.
38. Garama D., Bremer P., Carne A. Extraction and analysis of carotenoids from the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* gonads // Acta Biochim. Pol. 2012. 59. (1). 83–85.
39. Gavin N.M., Durako M.J. Localization and antioxidant capacity of flavonoids in *Halophila jansonii* in response to experimental light and salinity variation // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2012. 416. (417). 32–40.
40. Haug T., Kjuul A.K., Styrvold O.B. et al. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea) and *Asterias rubens* (Asteroidea) // J. Invert. Pathol. 2002. 81. 94–102.
41. Ji J., Wang L., Wu H., Luan H.M. Bio-function summary of marine oligosaccharides // Int. J. Biol. Sci. 2011. 3 (1). 58–65.
42. Kalogeropoulos N., Mikellidi A., Nomicos T., Chiou A. Screening of macro- and bioactive microconstituents of commercial finfish and sea urchin eggs // LWT Food Sci. Technol. 2012. 46. (2). 525–531.
43. Kuwahara R., Hatate H., Tamami Y. et al. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina* // LWT Food Sci. Technol. 2009. 42. (7). 1296–13000.
44. Le Bouffant R., Cormier P., Cueff A. et al. Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis // Cell Mol. Life Sci. 2007. 64. (13). 1723–1734.

45. Liu C., Lin Q., Gao Y. et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* egg // Carbohydr. Polym. 2007. 67. (3). 313–318.
46. Mamelona J., Saint-Louis R., Pelletier E. Proximate composition and nutritional profile of byproducts from green urchin and Atlantic sea cucumber processing plants // Int. J. Food Sci. Technol. 2010. 45. 2119–2126.
47. Mamelona J., Pelletier E., Girard-Lalancette I. et al. Antioxidants in digestive tracts and gonads of green urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) // J. Food Compos. Anal. 2011. 24. (2). 179–183.
48. Matsuno T., Tsushima M. Carotenoids in sea urchins. Amsterdam, 2001.
49. Matsuno T. Aquatic animal carotenoids // Fish. Sci. 2001. 67. (5). 771–783.
50. Montano-Castaneda M.C., Santafe-Patino G.G. Evaluation of antioxidant activity of marine sponges // Acta. Biol. 2011. 33. (95). 173–181.
51. Mueller M., Lucas B., Novak J. et al. Oregon: a source for peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonists // J. Agric. Food. Chem. 2008. 56. (24). 11621–11630.
52. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years // J. Nat. Prod. 2007. 70. (3). 461–477.
53. Pomin V.H., Mourao P.A. Structure, biology, evolution and medical importance of sulfated fucans and galactans // Glycobiology. 2008. 18. 1016–1027.
54. Pomin V.H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures // Biopolymers. 2009. 91. 601–609.
55. Pomin V.H. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review // Glycoconjugate J. 2010. 27. 1–12.
56. Pomin V.H. Fucanomics and galactanomics: marine distribution, medicinal impact, conceptions and challenges // Mar. Drugs. 2012. 10. 793–811.
57. Pomin V.H., Mourao P.A.S. Structure versus anticoagulant and antithrombotic action of marine sulfated polysaccharides // Rev. Braz. Farmacogn. 2012. 22. (4). 248–256.
58. Qian Z.J., Jung W.K., Kang K.H. et al. In vitro antioxidant activities *Pavlova lutheri* (Haptophyta) with the yeast *Hansenula polymorpha* // J. Phycol. 2012. 48. (2). 475–482.
59. Quin L., Zhu B.W., Zhou D.Y. et al. Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad // LWT Food Sci. Technol. 2011. 44. (4). 1113–1118.
60. Riccioni G. Marine carotenoids and oxidative stress // Mar. Drugs. 2012. 10. 116–118.
61. Rodriguez-Bernaldo D.Q.A., Lopez-Hernandez J., Simal-Lozano J. Separation of phospholipid classes in sea urchin *Paracentrotus lividus* by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2002. 770. (1–2). 71–75.
62. Shamsuddin A.A., Lukman H., Kumari M.D., Noraznavaty I. Antibacterial activity of three species of sea urchin extracts from Pulau Bidong, Terengganu // J. Sustain. Sci. Manag. 2010. 5. (1). 116–124.
63. Shankarlal S., Prabu K., Natarajan E. Antimicrobial and antioxidant activity of purple sea urchin shell // Am.-Euras. J. Sci. Res. 2011. 6. (3). 178–181.
64. Sheean P., Hodges L.D., Kalafatis N. et al. Bioactivity of extracts from gonadal tissue of the edible Australia purple sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* // J. Sci. Food Agric. 2007. 87. (4). 694–701.
65. Shillaci D., Arizza V., Parrinello N. et al. Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus* // J. Appl. Microbiol. 2009. 108. 17–24.
66. Maoka T. Carotenoids in marine animals // Mar. Drugs. 2011. 9. (2). 278–293.
67. Uma B., Parvathavarthini R. Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin *Temnopleurus alexandri* (Bell, 1884) // Int. J. Pharm. Tech. Res. 2010. 2 (3). 1677–1680.
68. Wilson-Sanders S. Invertebrate models for biomedical research, testing and education // 2011. 58. (2). 126–152.
69. Yang R., Wang J., Liu Z. et al. Antioxidant effect of a marine oligopeptide preparation from *Chum Salmon* (*Oncorhynchus keta*) by enzymatic hydrolysis in radiation injured mice // Mar. Drugs. 2011. 9. (11). 2304–2315.
70. Zhou D., Qin L., Zhu B. et al. Optimization of hydrolysis of purple sea urchin gonad by response surface methodology and evaluation of in vitro antioxidant activity of the hydrolysate // J. Sci. Food Agric. 2012. 92. (8). 1694–1701.

## **THE URCHIN BIOACTIVE SUBSTANCES – FRAMEWORK FOR DRUGS AND PHARMACEUTICAL MATERIALS DEVELOPMENT**

**Sergei Petrovich KRYZHANOVSKI**

*Medical Association FED RAS  
6900022, Vladivostok, Kirov str., 95*

---

The current understanding of the biological activity of the gonads of sea urchins and metabolites derived from these marine invertebrates are presented in this review. It has been shown that they have antioxidant, anti-inflammatory, antihyperlipidemic, antitumor and antibacterial effects. The materials on the original medications developed by the Far East scientists on the basis of quinoid pigments of sea urchins are represented. The prospects for new drugs and dietary supplements based on echinoderms metabolites and the possibility of extending the «Histochrome» applicable scope at other nosologic forms have been discussed.

---

**Key words:** sea urchins, gonads, quinoid pigments echinochrome, histochrome, antioxidant, anti-inflammatory activity.

*Kryzhanovski S.P. – candidate of medical sciences, head doctor*

## ДИНАМИКА ТРИГЛИЦЕРИДОВ И ЛИПОПРОТЕИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ У КРЫС С КАРЦИНОСАРКОМОЙ Walker 256 ПОСЛЕ ОБЩЕЙ ГИПЕРТЕРМИИ

Кирилл Валерьевич МОЛОКОВ<sup>1</sup>, Игорь Ильич ХЕГАЙ<sup>2</sup>, Анатолий Васильевич ЕФРЕМОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

<sup>2</sup> ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

Рост карциносаркомы Walker 256 у крыс проходит несколько стадий, различающихся по характеру метаболических процессов в организме. Целью данного исследования было проследить динамику липидного обмена у крыс в процессе роста опухоли и оценить влияние общей гипертермии на основные показатели состояния липидов крови. Эксперименты выполнены на крысах линии Wistar с карциносаркомой Walker 256. Общую гипертермию проводили согласно авторскому протоколу, патент 2165105 РФ. Липидный состав плазмы крови определяли стандартными биохимическими методами, применяемыми в лабораторной практике. Установлено, что рост опухоли Walker 256 сопровождается значительным подъемом уровня триглицеридов и липопротеинов очень низкой плотности на фоне снижения содержания липопротеинов высокой плотности. Гипертермия дополнительно усиливает сдвиг данных показателей липидного обмена в том же направлении. У крыс после общей гипертермии наблюдается увеличение количества живых особей на поздних и терминальных стадиях развития карциносаркомы Walker 256, коррелирующее с изменением уровня триглицеридов и липопротеинов очень низкой плотности. Данный эффект может быть связан с условиями функционирования системы васкуляризации опухоли.

**Ключевые слова:** триглицериды, липопротеины, карциносаркома Walker 256, гипертермия, терапевтический эффект.

Рост карциносаркомы Walker 256 сопровождается биохимическими, электролитными и гормональными сдвигами, способствующими в совокупности постепенному истощению животных и летальному исходу [5–7, 9, 13]. По характеру метаболизма весь этот процесс перестройки разделяют на три стадии: тихую, или предклиническую, в первые дни роста опухоли, гиперметаболическую в течение второй недели и гипометаболическую в последующие две недели среднего срока дожития [19]. Реорганизация метаболических процессов сопровождается наработкой медиаторов неопластической кахекии и появлением в крови маркеров протеолиза тканей [8, 12, 14, 18]. Неопластические процессы, в свою очередь, энергетически тесным образом связаны с метаболизмом углеводов и липидов. Развитие и рост опухолей сопровождается системными нарушениями обмена липидов [11]. Отдельным видам рака соответствуют свои особенности изменения состава липидов крови [15, 17]. Известно, что гипертермия также существенно влияет на характер обмена липидов

[1, 3]. Нами была исследована динамика липидного состава плазмы крови у крыс на всех стадиях роста опухоли Walker 256 и реакция отдельных липидов на общую гипертермию.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на половозрелых самцах линии крыс Wistar с массой тела 200–250 г. Для образования солидной опухоли использовали перевиваемый штамм карциносаркомы Walker 256, поддерживаемый *in vivo*. Суспензию опухолевых клеток вводили шприцем в бедренную мышцу. Доза суспензии была выбрана в соответствии с литературными данными,  $10^6$  клеток на животное [16]. На следующий день после введения опухоли опытная группа крыс была подвергнута воздействию общей гипертермией в полном соответствии с авторским протоколом [2]. Далее через 1, 3, 7, 14 и 21 сутки у крыс производили забор крови (под эфирным наркозом) для количественного определения состава липидов в сыворотке [4]. Для сравнения в те же сро-

*Молоков К.В.* – аспирант кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии,  
e-mail: kmolokov@ngs.ru

*Хегай И.И.* – д.б.н., старший научный сотрудник

*Ефремов А.В.* – д.м.н., проф., чл.-кор. РАМН, зав. кафедрой патологической физиологии и клинической патофизиологии

Таблица 1

Содержание липидов в сыворотке крови, ммоль/л

Группа крыс	Триглицериды	Холестерин липопротеинов		
		высокой плотности	низкой плотности	очень низкой плотности
Интактные без опухоли	1,15 ± 0,02	1,03 ± 0,04	0,68 ± 0,02	0,23 ± 0,02
С опухолью Walker 256	2,31 ± 0,05***	1,02 ± 0,01	0,70 ± 0,02	0,47 ± 0,01***

Примечание. \*\*\* – отличие от величины соответствующего показателя интактного контроля статистически значимо при  $p < 0,001$ .

ки брались крысы контрольной группы, составленной из животных, не получивших прививку опухоли Walker 256, но прошедших стандартную процедуру общей гипертермии. Были исследованы пять подгрупп опытной группы, состоящих из 20, 18, 18, 15, 12 крыс, и пять подгрупп контрольной группы, соответственно 15, 14, 13, 13, 13 крыс. Изменение численности животных в опытной группе фиксировали по состоянию на 1-й, 3-й, 7-й, 14-й и 21-й день после воздействия гипертермией. В качестве контроля для оценки летальности действия опухоли были использованы крысы, привитые опухолью Walker 256, но без последующей гипертермии. В данной группе исследовали пять подгрупп численностью 11, 10, 10, 9, 9 крыс. Отдельную группу составили 10 интактных крыс, не подвергавшихся никаким воздействиям вплоть до момента забора крови. Таким образом, всего в эксперименте было задействовано 210 крыс. Весь цикл работ с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными 1996 года.

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 критерия Стьюдента для независимых переменных, достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ . Связь между различными признаками в исследуемой выборке определялась с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Пирсона ( $r$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены результаты измерения содержания триглицеридов и отдельных фракций липопротеинов на основании расчетов по количеству связанного холестерина. Данные свидетельствуют о том, что в процессе роста карциномы Walker 256 у крыс по ряду показате-

лей изменяется состав липидов крови. На 10-й день роста опухоли содержание триглицеридов (ТГ) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) становятся более чем в два раза выше, чем в интактном контроле. По концентрации в сыворотке крови липопротеинов низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности достоверных различий не обнаружено. 10-дневный срок соответствует средней стадии опухоли и непосредственно предшествует появлению явных признаков кахексии [9]. С этой стадии начинается постепенная убыль животных вследствие летального действия опухоли. На рис. 1 показана динамика

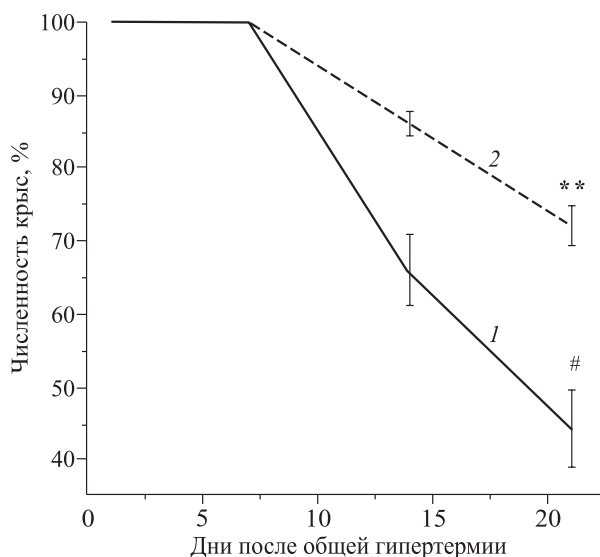
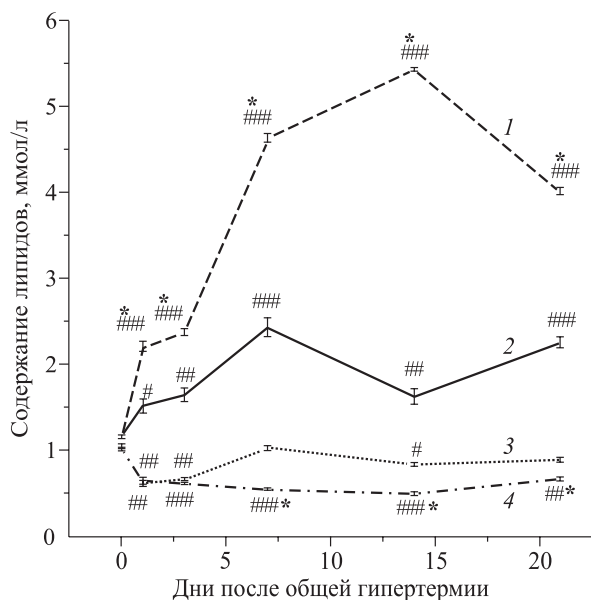
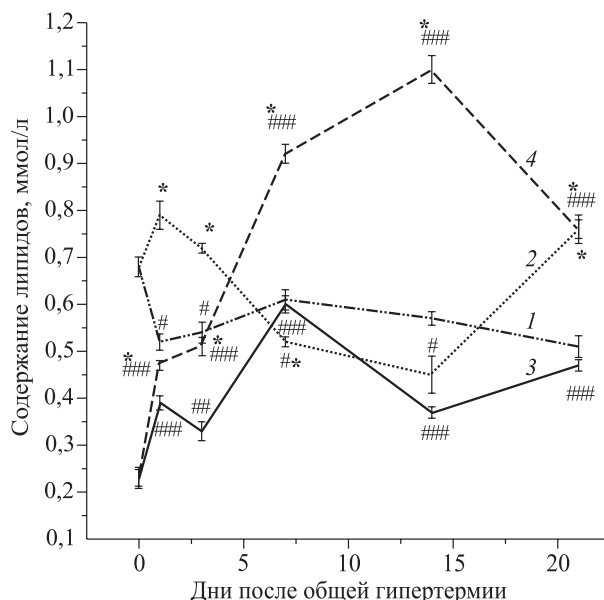


Рис. 1. Изменение численности крыс, привитых карциномой Walker 256, в процессе роста опухоли. 1 – контроль; 2 – опытные крысы, подвергшиеся воздействию гипертермией. Данные представлены в процентах от исходной численности подгрупп. Знаком # отмечены величины параметров, достоверно отличающиеся от величин соответствующих показателей предыдущего срока наблюдения ( $p < 0,01$ ); здесь и на рис. 2 и 3 звездочкой отмечены величины параметров, достоверно отличающиеся от величин соответствующих показателей в контроле в пределах одного срока (\* –  $p < 0,01$ , \*\* –  $p < 0,001$ )



**Рис. 2.** Содержание триглицеридов (1, 2) и липопротеинов высокой плотности (3, 4) в сыворотке крови крыс после воздействия общей гипертермией. Здесь и на рис. 3: 1 и 3 – контроль (не привитые карциносаркомой Walker 256), 2 и 4 – опытные крысы (привитые карциносаркомой Walker 256); знаком # отмечены величины параметров, достоверно отличающиеся от исходных величин соответствующих показателей (# –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,01$ , ### –  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ )

средней численности в группах, получивших прививку опухоли Walker 256. На 14-й день количество крыс в контрольной группе уменьшается примерно на 25 % от исходного состава, и еще на столько же к 21-му дню. Выживаемость опытных крыс, подвергшихся воздействию гипертермией, достоверно выше, они погибали с отставанием по графику примерно на неделю. Улучшение выживаемости после однократной процедуры общей гипертермии у крыс, привитых опухолью, могло быть связано с дополнительными сдвигами в спектре липидов крови. Динамика содержания ТГ и ЛПВП в сыворотке крови крыс после гипертермии показана на рис. 2. Гипертермия оказывает общее стимулирующее действие на синтез ТГ, но в опытной группе это происходит в два раза



**Рис. 3.** Содержание липопротеинов низкой (1, 2) и очень низкой (3, 4) плотности после воздействия общей гипертермией

быстрее, чем у контрольных крыс без опухоли Walker 256. Содержание ЛПВП, наоборот, в обеих группах крыс снижается, эффект проявляется сразу же на следующий день после воздействия гипертермией. Далее, в контроле с 7-го дня восстанавливается исходный уровень ЛПВП, однако в опытной группе этого не происходит. Иная динамика зарегистрирована по ЛПНП и ЛПОНП (рис. 3): содержание ЛПНП в ходе эксперимента изменяется незначительно, отдельные колебания не имеют явной закономерности, в то время как ЛПОНП реагируют на гипертермию стабильным постепенным повышением концентрации в сыворотке крови крыс обеих групп, при этом в опытной группе показатель сразу растет более выраженно, чем в контроле. Динамика ЛПОНП совпадает в целом с динамикой ТГ, при этом оба показателя коррелируют с численностью выживающих крыс в опытной группе с коэффициентами корреляции соответственно около и выше 0,5 (табл. 2). Сопоставляя рисунки 2 и 3, можно прийти к выводу, что гипертермия дополнительно усиливает возрастание содержания ТГ и ЛПОНП,

**Таблица 2**

Коэффициенты корреляции между средней численностью крыс и содержанием липидов в сыворотке крови

Группа крыс	Триглицериды	Холестерин липопротеинов		
		высокой плотности	низкой плотности	очень низкой плотности
С опухолью Walker 256 (контрольные)	-0,378	-0,096	0,449	-0,199
С опухолью Walker 256 после гипертермии	-0,517	0,217	-0,017	-0,466

происходящее у крыс в процессе роста карциносаркомы Walker 256, и предположить, что это связано с перераспределением спектра липопротеинов за счет снижения уровня ЛПВП. Данные изменения в липидном обмене могут быть задействованы в механизме терапевтического эффекта гипертермии. Достаточно вероятным может оказаться возникновение неблагоприятных условий для функционирования системы кровоснабжения опухоли после общей гипертермии [10], однако в целом зависимость онкосупрессии от особенностей липидного обмена представляется достаточно сложной и требует дальнейших исследований.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рост карциносаркомы Walker 256 закономерно сопровождается изменением количественного состава липидов крови. Уровни ТГ и ЛПОНП двукратно повышаются на фоне некоторого снижения содержания ЛПВП и незначительного колебания концентрации ЛПНП. Общая гипертермия дополнительно усиливает в том же направлении сдвиг параметров липидного обмена, изначально происходящий при росте опухоли Walker 256. Воздействие гипертермией повышает количество живых животных на поздних стадиях роста карциносаркомы Walker 256. Динамика численности крыс коррелирует с изменением содержания ТГ и ЛПОНП после общей гипертермии.

Таким образом, общая гипертермия крыс с карциносаркомой Walker 256 снижает летальное действие опухоли. Терапевтический эффект опосредуется через усиление синтеза ТГ и ЛПОНП. Дальнейший механизм может быть связан с изменением условий васкуляризации и кровоснабжения в ткани растущей опухоли.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН в рамках ГК № 16.522.11.7057.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горанчук В.В., Шустов Е.Б. Биохимические показатели при развитии экстремальной гипертермии // Физиол. человека. 1997. 23. (4). 98–105.
2. Пат. 2165105 РФ. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / А.В. Ефремов, Ю.В. Пахомова, Е.А. Пахомов и др.; опубли. 10.04.2001.
3. Зубарева Е.В., Сеферова Р.И. Изменение липидного состава тканей крыс при гипертермии разной степени // Вопр. мед. химии. 1992. (3). 50–53.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: Беларусь, 2002. 2. 464 с.

5. Boeckh-Haebisch E.M., Fernandes L.C., Ponzoni M. et al. Cationic and water content in blood, skeletal muscle and liver of food restricted and Walker 256 tumor-bearing rats // Cancer Res. Ther. Control. 1998. 5. 213–219.
6. Cintra-Gomes M.C., Cury L., Parreira M.R. et al. Effects of Walker 256 carcinoma on metabolic alterations during the evolution of pregnancy // Braz. J. Med. Biol. Res. 1990. 23. (9). 909–913.
7. Fernandes L.C., Machado U.F., Nogueira C.R. et al. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia // Am J Physiol. 1990. 258(6). E1033–E1036.
8. Keller H., Eggli P. Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane // Cell Motil. Cytoskeleton. 1998. 41. (2). 181–193.
9. Khagai I.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. Walker 256 tumor growth in rats with hereditary defect of vasopressin synthesis // Bull. Exp. Biol. Med. 2006. 142. (3). 344–346.
10. Lushnikova E.L., Ovsyanko E.V., Nepomnyashchikh L.M. et al. Proliferation of Walker 256 carcinosarcoma cells: effect of whole-body hyperthermia and antitumor agents // Bull. Exp. Biol. Med. 2011. 152. (1). 146–152.
11. Pires L.A., Hegg R., Valduga C.J., Graciani S.R., Rodrigues D.G., Maranhao R.C. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study 2009 // Cancer Chemother. Pharmacol. 2009. 63. (2). 281–287.
12. Rebeca R., Bracht L., Noletto G.R. et al. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors // Cell Biochem. Funct. 2008. 26. (6). 731–738.
13. Seelaender M.C., Ambrico C., Rodrigues M.C.P.S. Hormonal alterations in Walker 256 tumor-bearing rats: possible role of calcium for the maintenance of cachexia // Cancer Res. Ther. Control. 1996. 5. (1). 29–33.
14. Spirina L.V., Bochkareva N.V., Kondakova I.V. et al. Regulation of insulin-like growth factors and NF-kappaB by proteasome system in endometrial cancer // Mol. Biol. (Mosk.). 2012. 46. (3). 452–460.
15. Tamburrini A.L., Woolcott C.G., Boyd N.F. et al. Associations between mammographic density and serum and dietary cholesterol // Breast Cancer Res. Treat. 2011. 125. (1). 181–189.
16. Vrionis F.D., Wu J.K., Qi P., Cano W.G., Cherington V. Tumor cells expressing the herpes simplex virus-thymidine kinase gene in the treatment of Walker 256 meningeal neoplasia in rats // J. Neurosurg. 1996. 84(2). 250–257.
17. Yetukuri L., Huopaniemi I., Koivuniemi A. et al. High density lipoprotein structural changes and drug



response in lipidomic profiles following the long-term fenofibrate therapy in the FIELD substudy // *PLoS One*. 2011. 6. (8). e23589.

18. Zecchin K.G., Seidinger A.L., Chiaratti M.R. et al. High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced

apoptosis via calcineurin pathways // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007. 39. (2). 186–194.

19. Zylicz Z., Schwantje O., Wagener D.J., Folgering H.T. Metabolic response to enteral food in different phases of cancer cachexia in rats // *Oncology*. 1990. 47. (1). 87–91.

## **DYNAMICS OF SERUM TRIGLYCERIDES AND LIPOPROTEINS IN RATS WITH CARCINOSARCOMA Walker 256 AFTER GENERAL HYPERTHERMIA**

**Kirill Valerievich MOLOKOV<sup>1</sup>, Igor Ilyich KHEGAY<sup>2</sup>, Anatoliy Vasilyevich EFREMOV<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

<sup>2</sup> *Institute of Cytology and Genetics SB RAS  
630090, Novosibirsk, Akademicheskaya av., 10*

---

The growth of carcinosarcoma Walker 256 in rats passes several stages distinguishing by the nature of metabolic processes in the organism. The aim of the study was to monitor the dynamics of lipid metabolism during tumor growing and evaluate the influence of general hyperthermia on main parameters of serum lipids. Experiments were carried out on Wistar line rats with carcinoma Walker 256. General hyperthermia was conducted according to the author's protocol, patent 2165105 of the Russian Federation. Lipid content of blood serum was defined by standard biochemical methods used in the clinical practice. It was found that the growth of tumors Walker 256 is accompanied with significant increase in triglycerides and very low density lipoproteins levels on the background of reducing high density lipoproteins. Hyperthermia intensifies additionally a shift of these lipid metabolic parameters in the same direction. The increase in the alive animals amount on late and terminal stages of carcinosarcoma Walker 256 progressing in rats was revealed after general hyperthermia, the increase correlated with the change in triglycerides and very low density lipoproteins levels. The effect can be connected with functioning conditions of tumor vascular system.

---

**Key words:** triglycerides, lipoproteins, carcinoma Walker 256, hyperthermia, therapeutic effect.

*Molokov K.V. – postgraduate student of the department of pathological physiology and clinical pathophysiology,  
e-mail: kmolokov@ngs.ru*

*Khegay I.I. – doctor of biological sciences, senior researcher*

*Efremov A.V. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of the RAMS, head of the department of pathological physiology and clinical pathophysiology*

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕНЕЖНОГО ВОЗНАГРАЖДЕНИЯ ПРИ РЕШЕНИИ ТВОРЧЕСКИХ ЗАДАЧ ВЕРБАЛЬНОЙ И ОБРАЗНОЙ ПРИРОДЫ

Нина Валерьевна ВОЛЬФ<sup>1,2</sup>, Ирина Валерьевна ТАРАСОВА<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ физиологии СО РАМН  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный университет  
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

<sup>3</sup> НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН  
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

В работе рассмотрен вопрос о влиянии денежного вознаграждения на оригинальность решений экспериментальных творческих задач вербальной и образной природы. Сделан вывод о том, что эффект денежного вознаграждения зависит от характера выполняемого задания и может быть различным для одного и того же испытуемого при выполнении разных заданий. Повышение креативности под влиянием вознаграждения наиболее прогнозируемо для вербальной задачи и связано с возрастанием интереса к деятельности. Взаимосвязи между вознаграждением и оригинальностью образной деятельности более сложны и менее предсказуемы, так как зависят от таких индивидуальных характеристик испытуемых, как интерес к заданию и высокая способность к селекции решений. Важными компонентами успешной творческой деятельности является как внутренняя, так и внешняя мотивация.

**Ключевые слова:** творчество, вознаграждение, мотивация, вербальное и образное мышление.

Хотя вознаграждение широко применяется для повышения результативности деятельности в различных сферах реальной жизни, вопрос о том, положительно или отрицательно оно влияет на креативность, остается предметом дискуссий. Широко распространено мнение, что вознаграждение, предлагаемое за результат деятельности, снижает креативность [7, 8].

Считают, что проявление творческих способностей зависит от внутренней и внешней мотивации. Внутренняя мотивация определяется интересом или увлеченностью, с которым испытуемый выполняет данное задание. Внешняя мотивация создается при получении инструкции на высокую продуктивность или обещанием вознаграждения за достижение определенных результатов деятельности [19].

Полагают, что возникающая при вознаграждении внешняя мотивация уменьшает спонтанность и гибкость мышления, внутренний интерес к деятельности, которая переориентируется на результат [7–9]. Действительно, исследования, основанные на измерении внутреннего интереса в парадигме свободного выбора, когда интерес оценивается по желанию испытуемого продол-

жать предложенную в эксперименте деятельность в свободное время после ее окончания, показывают, что обещание денежного вознаграждения за результат деятельности приводит к снижению интереса к деятельности как таковой [9, 18].

В то же время согласно другой точке зрения, основанной на специально проведенных экспериментальных исследованиях, отрицательное влияние обещания вознаграждения на креативность имеет место только тогда, когда четко не определена связь между вознаграждением и необходимостью создания оригинального продукта. При осознании испытуемыми такой взаимосвязи вознаграждение приводит к повышению креативности [12, 14, 15, 17]. Основываясь на исследовании влияния вознаграждения на интерес к выполняемой деятельности в реальных производственных условиях, авторы делают вывод о возможности повышения интереса под влиянием денежного вознаграждения [13].

Противоречивость полученных результатов может быть связана с тем, что оценка интереса к деятельности осуществляется в разное по отношению к ней время: в одном случае после выполнения краткосрочной экспериментальной задачи

*Вольф Н.В.* – д.б.н., рук. лаборатории физиологии когнитивной деятельности

*Тарасова И.В.* – старший научный сотрудник лаборатории физиологии когнитивной деятельности

и получения вознаграждения, а в другом – в процессе длительного периода вознаграждаемой профессиональной деятельности. В подтверждение возможной значимости этих различий говорит тот факт, что даже в парадигме свободного выбора рассмотрение внутреннего интереса в различные периоды после выполнения вознаграждаемой деятельности дает противоположные результаты и обнаруживает связь с индивидуальными особенностями испытуемых [20].

Согласно модели саморегуляции мотивации, взаимодействие внешней и внутренней мотивации может быть как конкурентным, так и взаимно подкрепляющим. Результирующая этого взаимодействия, определяемая соотношением внешнего и внутреннего интереса к деятельности, по мнению авторов, зависит от таких факторов, как индивидуальные особенности, когнитивный опыт испытуемых, контекст и характер задачи [19].

Последнее хорошо согласуется, в частности, с данными, свидетельствующими о том, что творческие задачи вербальной и образной природы отличаются по характеристикам частотно-пространственной организации электрической активности мозга, регистрируемой в ходе их выполнения [4]. Различия в нейросетевой организации разных видов творческой деятельности позволяют предполагать и их разное взаимодействие с системами подкрепления.

Настоящее исследование направлено на сравнительное изучение влияния денежного вознаграждения на эффективность решения экспериментальных творческих задач вербальной и образной природы и сопоставление этих показателей с оценками интереса и трудности задания в ходе его выполнения.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 40 испытуемых-правшей (20 юношей и 20 девушек) – студенты высших учебных заведений Новосибирска в возрасте от 18 лет до 21 года. Все испытуемые дали добровольное согласие на участие в эксперименте, исследование было одобрено Этическим комитетом НИИ физиологии СО РАМН.

Для исследования вербального и образного творческого мышления использовали соответственно модифицированный вариант теста «Когнитивный синтез», взяв в качестве стимулов триады слов из отдаленных семантических полей, и «Неоконченные фигуры» Торренса.

Экспериментальные задания выполняли с двумя инструкциями: ИН1 – «создать оригинальные предложения (образы)», первая серия, и ИН2 – «если Вы создадите оригинальные предложения (образы), то получите денежное вознаграждение», вторая серия.

Инструкцию предлагали испытуемым перед началом соответствующей серии эксперимента. В каждой серии последовательно предъявляли две пробы с триадами и две с неоконченными фигурами. Порядок предъявления слов и фигур в серии менялся от испытуемого к испытуемому.

Экспериментальная проба длительностью 5 мин начиналась с 2-минутного предъявления точки фиксации, расположенной в центре монитора. Затем в центре экрана предъявляли триаду слов или неоконченную фигуру, которая находилась на экране до тех пор, пока испытуемый не даст свой вариант ответа. После подачи испытуемым сигнала об ответе с помощью нажатия кнопки на месте стимула появлялся белый экран, и испытуемый называл вслух ответ (предложение или название рисунка). Далее на экране вновь предъявлялся тот же стимул. По истечении 3 мин начиналась следующая проба с новым стимулом той же природы. Далее проводились две аналогичные пробы со стимулами другой природы.

По окончании эксперимента испытуемые рисовали на бланках с изображением предъявлявшихся неоконченных фигур все названные ими рисунки.

Показателем эффективности деятельности служили оригинальность и беглость. Оригинальность придуманных предложений определяли на основе усредненных оценок по трехбалльной системе, данных тремя экспертами. Хорошую согласованность оценок экспертов подтвердил расчет коэффициента альфа Кронбаха, который оказался равным 0,83 и 0,88 соответственно при ИН1 и ИН2. Оригинальность образов рассчитывали в баллах как  $1/(N + 1)$ , где  $N$  – число аналогичных образов в компьютеризированной базе данных, составленной на основе тестирования 342 студентов обоего пола. Для каждого испытуемого получали среднее значение оригинальности по всем созданным образам или рисункам (суммарная оригинальность для всех созданных решений/количество решений) отдельно для каждой инструкции.

С помощью аналоговой шкалы длиной 50 мм оценивали показатели интереса и трудности выполнения вербального и образного задания при каждой инструкции. Минимальный уровень показателей равнялся 0, максимальный – 50.

Для статистического анализа применяли дисперсионный (ANOVA) и факторный анализ методом главных компонент. Для удобства представления данных по оценке оригинальности решений, измеренной в разных единицах для вербальной и образной оригинальности, их подвергли z-преобразованию.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для каждого показателя деятельности (оригинальность, беглость) был проведен отдельный ANOVA с выделением следующих факторов: ПОЛ (мужчины, женщины) × ТИП ЗАДАЧИ (вербальная, образная) × ИНСТРУКЦИЯ (ИН1, ИН2).

Обнаружено, что в зависимости от типа решаемой задачи денежное вознаграждение оказывает разный эффект на испытуемых одной и той же группы. Для оригинальности решений выявлена значимость взаимодействия факторов ТИП ЗАДАЧИ × ИНСТРУКЦИЯ:  $F(1,38) = 8,0361$ ,  $p = 0,00731$ . Под влиянием вознаграждения возрастает оригинальность вербальной и не меняется оригинальность образной деятельности, изменения оригинальности вербальной деятельности в 4,5 раза превышают изменения оригинальности образной (рис. 1).

Анализ распределения испытуемых по показателю изменения оригинальности решений при ИН2 по сравнению с ИН1 (ИН2-ИН1) показал, что абсолютное большинство (87,5 %) испытуемых повышают оригинальность решений при выполнении вербальной задачи при вознаграждении, тогда как при решении образной задачи к повышению оригинальности способно только около половины испытуемых (55 %).

В отличие от оригинальности для обоих типов заданий характерно снижение беглости при обещании денежного вознаграждения. Значение фактора ИНСТРУКЦИЯ:  $F(1,38) = 30,306$ ,  $p = 0,000$  (см. рис. 1).

В соответствии с задачами исследования в качестве основного показателя успешности творческой деятельности рассматривали оригинальность предложенных решений. Для сопоставления изменений оригинальности вербальной и образной деятельности (ИН2-ИН1) с показателями беглости и оценками испытуемыми интереса и трудности выполнения заданий при двух инструкциях был выполнен факторный анализ методом главных компонент с вращением «варимакс». Были выделены пять основных факторов, имеющих собственные значения > 1 и отвечающих отбору по критерию «каменистой осыпи» (табл. 1). Максимальная нагрузка от изменения вербальной креативности, представленная в факторе 5, не показала ассоциации с другими переменными. Изменение образной креативности было обратно связано с уровнем беглости при выполнении обоих заданий и с интересом к выполнению образного задания при обеих инструкциях.

После редукции данных за счет проведения факторного анализа был проведен ANOVA для

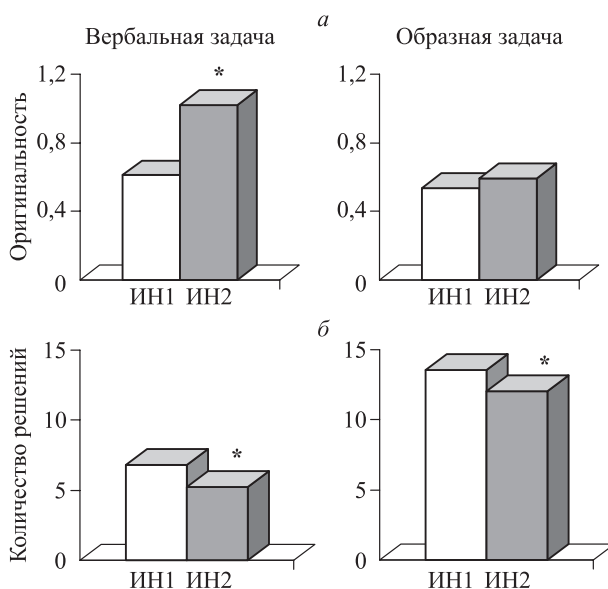


Рис. 1. Изменения под влиянием денежного вознаграждения оригинальности (а) и беглости (б) решений задач вербальной и образной природы. Звездочками обозначены достоверные отличия от величин соответствующих показателей при ИН1

полученных для каждого испытуемого факторных значений (факторы 1–5). По показателям изменений оригинальности вербальной и образной деятельности при ИН2 по сравнению с ИН1 испытуемые были разделены на 2 группы соответственно с показателями ниже и выше среднего для каждого вида деятельности. Дисперсионный анализ проведен с выделением следующих факторов: ПОЛ × ИЗМЕНЕНИЕ ОРИГИНАЛЬНОСТИ РЕШЕНИЙ (выше, ниже среднего) × ФАКТОРЫ (факторные значения для факторов 1–5) отдельно для групп, селектированных по изменениям оригинальности вербальной и образной деятельности. Испытуемые с высокими показателями изменений оригинальности имели достоверно большие суммарные факторные значения, чем испытуемые с низкими показателями (значимость фактора ИЗМЕНЕНИЕ ОРИГИНАЛЬНОСТИ РЕШЕНИЙ:  $F(1,36) = 21,8$ ,  $p = 0,000$  для вербальной и  $F(1,36) = 6,8$ ,  $p = 0,013$  для образной задачи).

Выделенные группы испытуемых отличались также по выраженности различий факторных значений для разных факторов: взаимодействие ИЗМЕНЕНИЕ ОРИГИНАЛЬНОСТИ РЕШЕНИЙ × ФАКТОРЫ для вербальной задачи  $F(4, 144) = 4,0$ ,  $p = 0,004$ , для образной –  $F(4, 144) = 3,8$ ,  $p = 0,006$ . Как видно из рис. 2, испытуемые с высоким и низким возрастанием оригинальности вербальной деятельности отличались

Таблица 1

Факторные нагрузки для показателей беглости и отношения к выполнению вербального и образного заданий при разных инструкциях в сопоставлении с изменениями оригинальности деятельности под влиянием вознаграждения

Переменные	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4	Фактор 5
Интерес для предложений ИН1	-0,011	0,675	0,218	-0,029	-0,282
Интерес для предложений ИН2	0,005	0,673	0,407	-0,258	0,167
Трудность для предложений ИН1	0,079	-0,025	0,108	<b>0,929</b>	0,146
Трудность для предложений ИН2	0,023	-0,087	-0,064	<b>0,953</b>	0,003
Количество предложений ИН1	<b>-0,861</b>	0,150	0,066	0,022	-0,170
Количество предложений ИН2	<b>-0,844</b>	0,270	-0,055	-0,207	-0,166
Изменение оригинальности предложений	0,101	-0,014	0,082	0,127	<b>0,937</b>
Интерес для рисунков ИН1	0,165	0,080	<b>0,898</b>	0,004	-0,035
Интерес для рисунков ИН2	-0,096	0,197	<b>0,910</b>	0,030	0,146
Трудность для рисунков ИН1	0,074	<b>0,824</b>	0,161	0,078	0,105
Трудность для рисунков ИН2	0,043	<b>0,870</b>	-0,021	-0,130	-0,080
Количество рисунков ИН1	<b>-0,789</b>	-0,410	-0,035	0,028	0,112
Количество рисунков ИН2	<b>-0,873</b>	-0,289	-0,107	-0,012	0,044
Изменение оригинальности рисунков	<b>0,432</b>	-0,335	<b>0,474</b>	0,190	-0,243
Объясненная дисперсия	3,086	2,860	2,142	1,961	1,178
Относительная дисперсия	0,220	0,205	0,153	0,140	0,084

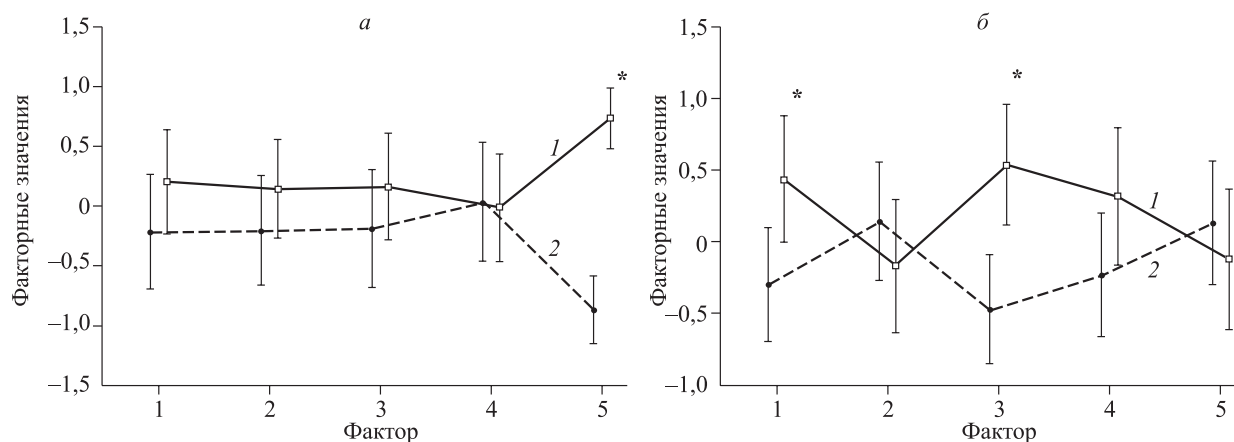


Рис. 2. Факторные значения для испытуемых с высоким и низким повышением оригинальности решений под влиянием денежной стимуляции. а – задачи вербальной природы; б – задачи образной природы. 1 – группа испытуемых с высоким, 2 – с низким повышением оригинальности при выполнении вербальных (а) или образных (б) творческих задач. Звездочками обозначены достоверные межгрупповые различия

чаются по факторным значениям лишь 5 фактора, что не дает дополнительной информации, так как наибольшая нагрузка в этом факторе – от показателя изменения оригинальности вербальной деятельности.

Для образной креативности группы, разделенные по успешности повышения оригинальности решений под влиянием денежного вознаграждения, различались по значениям факторов 1 и 3. Способность успешно повышать оригинальность решений при ИН2 ассоциируется с высо-

кими факторными значениями и свидетельствует о связи чувствительности к вознаграждению с низкой беглостью и высоким интересом к выполняемому заданию как при ИН1, так и при ИН2, т.е. на всем протяжении деятельности.

Чтобы контрастировать взаимосвязи между изменениями при переходе от ИН1 к ИН2 характеристик, относящихся к одному виду деятельности, для вербальной и образной задач отдельно был проведен факторный анализ, результаты которого представлены в табл. 2, 3.

**Таблица 2**

Факторная структура изменений отношения к заданию и показателей выполнения вербального задания при переходе от ИН1 к ИН2

Переменная	Фактор 1	Фактор 2
Изменение интереса	-0,168	<b>0,775</b>
Изменение трудности	<b>0,787</b>	-0,054
Изменение количества предложений	<b>-0,855</b>	0,046
Изменение оригинальности предложений	0,040	<b>0,829</b>
Объясненная дисперсия	1,382	1,294
Относительная дисперсия	0,345	0,324

Повышение оригинальности предложений оказалось связанным с повышением интереса к вербальной деятельности. При выполнении образного задания повышение оригинальности деятельности с наибольшей отрицательной нагрузкой вошло в фактор 1. Исходя из структуры этого фактора, можно заключить, что низкая способность к повышению оригинальности рисунков при ИН2 ассоциируется с повышением оценки трудности задачи при обещании денежного вознаграждения.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты нашего исследования показывают, что обещание денежного вознаграждения не уменьшает креативность. Она или повышается, что мы наблюдали при решении вербальных творческих задач, или остается неизменной в случае образной деятельности. Полученные результаты скорее согласуются с точкой зрения Эйзенбергера с соавторами [12, 14, 15], которые считают, что четкое обозначение связи между вознаграждением и таким аспектом деятельности, как оригинальность решений, приводит к повышению креативности. Согласно нашим данным, увеличение оригинальности вербальных решений ассоциируется с возрастанием внутренней мотивации, определяемой по повышению интереса к выполнению задания. Этот результат согласуется с данными по исследованию интереса в процессе вознаграждаемой профессиональной деятельности [13] и противоречит результатам, полученным в парадигме свободного выбора [9]. На этом основании можно заключить, что эффект вознаграждения на интерес к деятельности в процессе ее выполнения и после ее окончания может быть различен.

В то же время обещание денежного вознаграждения не влияет на оригинальность образ-

**Таблица 3**

Факторная структура изменений отношения к выполнению задания и показателей выполнения образного задания при переходе от ИН1 к ИН2

Переменная	Фактор 1	Фактор 2
Изменение интереса	-0,208	<b>-0,851</b>
Изменение трудности	<b>0,851</b>	0,252
Изменение количества рисунков	0,3351	-0,571
Изменение оригинальности рисунков	<b>-0,637</b>	0,403
Объясненная дисперсия	1,287	1,29
Относительная дисперсия	0,321	0,319

ной деятельности. Поскольку задачи вербальной и образной природы давались одним и тем же испытуемым, можно заключить, что эффект зависит от характера задания, а не от отношения испытуемого к денежной стимуляции. В наших предыдущих исследованиях показано, что ИН1, примененная после «свободного» творчества, когда испытуемого просили просто создавать рисунки или предложения, приводила к увеличению оригинальности как вербальной [5], так и образной [2] деятельности. Полученные результаты свидетельствуют о более широких границах регуляции вербальной креативности по сравнению с образной. Возможно, это связано с большей осознаваемостью вербальной деятельности и вследствие этого большей подверженностью ее произвольной регуляции в соответствии с эксплицитно поставленной целью [6].

Выявлено, что обещание денежного вознаграждения по сравнению с инструкцией «стремиться к оригинальному решению проблемы» приводит к снижению количества решений в дивергентных задачах как вербальной, так и образной природы. Этот эффект аналогичен полученному нами ранее при инструкции «стремиться к оригинальному решению проблемы» по сравнению со «свободным» творчеством, когда испытуемые создавали рисунки или предложения без требования к их оригинальности [4]. Он может свидетельствовать о повышении критерия отбора решений с повышением мотивации к оригинальности деятельности.

Вместе с тем результаты факторного анализа, приведенные в табл. 1, показывают, что критичность при отборе решений имеет значение для повышения оригинальности образной деятельности, так как вместе с этим параметром показатели беглости с высокими нагрузками входят в фактор 1. Необходимо отметить, что повышение образной креативности связано не с изменением

показателей беглости под влиянием ИН2, а с низкими их значениями как при ИН1, так и при ИН2. Причем увеличение образной креативности ассоциируется с селекцией информации в широком смысле, так как в рассматриваемый фактор входят показатели беглости не только для образных, но и для вербальных заданий. Существенное значение для повышения образной креативности имеет также устойчивый интерес к выполнению задания на всем протяжении деятельности, что может характеризовать стабильность внутренней мотивации. Эти данные согласуются с результатами [21], которые также свидетельствуют, что наличие внутренней мотивации является положительным фактором для повышения креативности при обещании вознаграждения.

Таким образом, возможности мотивационной модуляции эффективности образной деятельности, по-видимому, определяются рядом особенностей, изначально присущих испытуемым. Этот вывод согласуется с нашими данными, показавшими также связь образной, но не вербальной креативности с такими базовыми когнитивными характеристиками испытуемых, как произвольное и селективное внимание [1, 3].

В соответствии с моделью саморегуляции мотивации [19] при внешней стимуляции эффективности деятельности конечный результат зависит от соотношения внешней мотивации, направленной на достижение цели, и внутренней, связанной с поддержанием интереса к процессу деятельности. Показано, что в зависимости от контекста и особенностей испытуемых выделенные мотивационные факторы могут как оказывать взаимно усиливающее действие, так и вступать в интерференционные отношения. Согласно нашим данным, лица, испытывающие положительное влияние денежной стимуляции при решении образных творческих задач, характеризуются более высокими показателями интереса на всем протяжении выполнения задания (т.е. у них более выражена внутренняя мотивация) и имеют более низкие показатели оригинальности при ИН1 по сравнению с группой, не увеличивающей оригинальность при обещании денежного вознаграждения. Интерес, испытываемый в процессе деятельности, может стимулировать опробование разнообразных стратегий в ущерб концентрации на отборе наиболее оптимальных решений и достижению максимального результата при ИН1. Обещание денежного вознаграждения меняет силу внешней мотивации, что переориентирует испытуемых с исходно высоким уровнем внутренней мотивации на достижение поставленной цели и приводит к повышению оригинальности решений образной творческой задачи.

В то же время существуют данные, свидетельствующие о том, что испытуемые, изначально ориентированные на достижение поставленной цели, могут испытывать меньший интерес в процессе деятельности [10, 11]. В нашем исследовании низкие показатели интереса были характерны для испытуемых, понижающих оригинальность под влиянием денежного вознаграждения. Имея высокие показатели оригинальности образной деятельности при ИН1, они не улучшали свои результаты при вознаграждении, возможно, за счет наличия потолочного эффекта или в силу чрезмерного влияния дополнительной мотивации [12, 16] при исходно низком пороге чувствительности к внешней стимуляции. Субъективное отсутствие ресурсов к увеличению оригинальности деятельности при вознаграждении может проявляться в оценке задания как более трудного.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют, что эффект денежного вознаграждения зависит от характера выполняемого задания и может быть различным для одного и того же испытуемого при выполнении разных заданий. Повышение креативности под влиянием вознаграждения наиболее прогнозируемо для вербальной задачи и связано с возрастанием интереса к результату деятельности. Взаимосвязи между вознаграждением и оригинальностью образной деятельности являются более сложными и менее предсказуемыми, так как зависят от таких индивидуальных характеристик испытуемых как интерес к заданию и высокая способность к селекции решений. Важными компонентами успешной творческой деятельности являются как внутренняя, так и внешняя мотивация.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вольф Н.В., Разумникова О.М., Онищенко М.А. Связь процессов селекции информации в модифицированной задаче Струпа с эффективностью творческой деятельности // Журн. высш. нервн. деят. 2007. 57. (4). 448–454.
2. Вольф Н.В., Тарасова И.В. Связь осцилляций на частотах  $\theta$  и  $\beta$  ритмов ЭЭГ с эффективностью творческой деятельности // Физиол. человека. 2010. 36. (2). 15–22.
3. Онищенко М.А., Вольф Н.В., Разумникова О.М. Латеральная организация ориентировочной реакции: связь с уровнем образной креативности // Асимметрия. 2009. 3. (3). 4–12.
4. Разумникова О.М., Вольф Н.В., Тарасова И.В. Стратегия и результат: половые различия в электрографических коррелятах вербальной и образной

креативности // Физиол. человека. 2009. 35. (3). 31–41.

5. Тарасова И.В., Разумникова О.М., Вольф Н.В. Связь изменений мощности с инструкцией, стимулирующей творческое мышление у мужчин и женщин // Журн. высш. нервн. деят. 2006. 56. (5). 611–617.

6. Хомская Е.Д. Нейропсихология: 4-е издание. СПб.: Питер, 2005. 496 с.

7. Amabile T.M. The social psychology of creativity. N. Y.: Springer-Verlag, 1983. 245 p.

8. Amabile T.M., Hennessey B.A., Grossman B.S. Social influences on creativity: the effects of contracted-for reward // J. Pers. Soc. Psychol. 1986. 50. (1). 14–23.

9. Deci E.L., Ryan R.M., Koestner R. A meta-analytic review of experiments examining the effects of extrinsic rewards on intrinsic motivation // Psychol. Bull. 1999. 125. (6). 627–668.

10. Deci E.L. The relation of interest to the motivation of behavior: A self determination theory perspective // The role of interest in learning and development. N. Y.: Lawrence Erlbaum Associates, 1992. 43–70.

11. Deci E.L., Ryan R.M. Intrinsic motivation and self-determination in human behavior. N. Y.: Plenum Press, 1985. 371 p.

12. Eisenberger R., Armeli S., Pretz J. Can the promise of reward increase creativity? // J. Pers. Soc. Psychol. 1998. 74. (3). 704–714.

13. Eisenberger R., Aselage J. Incremental effects of reward on experienced performance pressure:

positive outcomes for intrinsic interest and creativity // J. Organiz. Behav. 2009. 30. (1). 95–117.

14. Eisenberger R., Haskins F., Gambleton P. Promised reward and creativity: effects of prior experience // J. Exp. Soc. Psychol. 1999. 35. 308–325.

15. Eisenberger R., Rhoades L. Incremental effects of reward on creativity // J. Pers. Soc. Psychol. 2001. 81. 728–741.

16. Hennessey B.A., Amabile T.M. The conditions of creativity // The nature of creativity / Ed. R.J. Sternberg. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 11–38 p.

17. Hon A.H.Y. When competency-based pay relates to creative performance: The moderating role of employee psychological need // Int. J. Hospit. Manag. 2012. 31. (1). 130–138.

18. Murayama K., Matsumoto M., Izuma K., Matsumoto K. Neural basis of the undermining effect of monetary reward on intrinsic motivation // PNAS. 2010. 107. (49). 20911–20916.

19. Sansone C., Thoman D.B. Maintaining activity engagement: individual differences in the process of self-regulating motivation // J. Pers. 2006. 74. (6). 1698–1718.

20. Wiechman B.M., Gurland S.T. What happens during the free-choice period? Evidence of a polarizing effect of extrinsic rewards on intrinsic motivation // J. Res. Pers. 2009. 43. 716–719.

21. Zhou Y., Zhang Y., Montoro-Sánchez A. Utilitarianism or romanticism: The effect of rewards on employees' innovative behaviour // Int. J. Manpower. 2011. 32. (1). 81–98.

## THE EFFECTS OF MONETARY REWARD FOR CREATIVE VERBAL AND FIGURATIVE TASK PERFORMANCE

Nina Valerevna VOLF<sup>1,2</sup>, Irina Valerevna TARASOVA<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Physiology SB RAMS  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4

<sup>2</sup> Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

<sup>3</sup> Research Institute for Complex Studying of Cardiovascular Diseases SB RAMS  
650002, Kemerovo, Sosnovyi blvd., 6

The impact of monetary reward to creative performance of divergent tasks of verbal and figurative nature has been considered in this paper. It is concluded that the effect of monetary reward depends on the nature of the task and may be different for one and the same subject within performing various tasks. Increase of creativity under the influence of the reward is most predictable for verbal tasks and is associated with an increase of interest to task performance. The relationship between reward and originality in figurative tasks is more complex and less predictable because it depends on the subjects individual characteristics such as interest in the job and the high potential for selection of decisions. Important components of the successful creative activity are both internal and external motivation.

**Key words:** creativity, reward, motivation, verbal and figurative thinking.

*Volf N.V.* – doctor of biological sciences, head of the laboratory of cognitive physiology

*Tarasova I.V.* – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of cognitive physiology



## ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА (ОБЗОР)

Денис Сергеевич КОРОБКО<sup>1</sup>, Надежда Алексеевна МАЛКОВА<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ НСО Государственная Новосибирская областная клиническая больница  
630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 130

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Доказано, что рассеянный склероз (РС) является полигенным мультифакториальным заболеванием. Проведен обзор литературных источников, посвященных последним достижениям изучения полиморфизмов генов цитокинов в патогенезе РС и перспективам практического применения полученных данных. Проанализированы оригинальные статьи и обзоры, в которых представлены результаты полногеномных исследований ассоциаций и мощных исследований по методу «ген-кандидат». Описана биологическая роль упоминаемых воспалительных цитокинов и ассоциации полиморфных маркеров с заболеванием. При этом кроме вопроса о факторах, предрасполагающих к развитию РС, активно исследуются варианты генов, определяющие конкретный клинический фенотип и исход болезни.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, полиморфизмы генов цитокинов, SNP, генотипирование, GWAS, ген *CD40*, ген *TNF $\alpha$* , ген *IL18*.

Рассеянный склероз (РС) – хроническое иммуноопосредованное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся воспалением, демиелинизацией с формированием очагов преимущественно в белом веществе головного мозга, что часто приводит к прогрессирующей дегенерации [34]. РС относится к группе аутоиммунных заболеваний, при которых в организме присутствует aberrантный иммунный ответ против собственных структур. Так, в частности, при РС первичной мишенью деструктивного процесса является миелиновая оболочка [61].

Существование генетической предрасположенности к РС стало очевидным уже в начале 50-х годов XX века после обнаружения семейных форм заболевания, которые составляют от 2 до 5 %. Другим доказательством роли наследственности при РС послужили результаты эпидемиологических исследований, при которых выявлена разная частота РС в различных этнических группах, проживающих на одной территории [35].

В России наиболее масштабное, основанное на едином методологическом подходе, исследование эпидемиологии РС было проведено в Сибири и на Дальнем Востоке в 1981–1984 гг. под руководством профессора А.П. Иерусалимского [6]. Благодаря этому мы имеем достоверные данные о распространенности РС в азиатском регионе в

то время, что можно использовать при описании динамики эпидемиологических показателей.

Величина относительного риска заболевания, т. е. преобладание вероятности заболеть над вероятностью остаться здоровым, в 20–50 раз выше для родственников больных РС, чем в популяции в целом [42].

Подверженность РС, как и другим мультифакториальным болезням, определяется сочетанием вариантов генов, отдельные эффекты которых в отношении патологии могут быть невелики, и многосторонним взаимодействием с диапазоном различных факторов окружающей среды [16].

Большое значение имеет определенный набор аллелей генов главного комплекса гистосовместимости, располагающегося на шестой хромосоме [79]. Однако наряду с системой *HLA* генетический контроль иммунного ответа определяют также гены цитокинов – растворимых регуляторных факторов [2, 19, 25, 44].

Наиболее распространенным и доступным подходом в генетике аутоиммунных болезней является исследование генов-кандидатов, их ассоциаций с клиническими фенотипами. *Гены-кандидаты* определяются как гены, продукты которых играют роль в этиопатогенезе заболевания, вероятность чего основывается на иммунологических и биологических знаниях. В качестве

Коробко Д.С. – врач-невролог, e-mail: ocrs@mail.ru; denn007@ngs.ru

Малкова Н.А. – д.м.н., проф. кафедры клинической неврологии и алгологии

генов подверженности РС преимущественно рассматриваются гены, так или иначе вовлеченные в иммунный ответ, гены миелина, некоторых гормонов, а также ряд генов, определяющих дегенеративные изменения (например, управляющие процессом апоптоза) и ремиелинизацию, гены цитокиновой сети [2, 9, 19, 27], гены хемокинов [11].

Другой подход – полногеномное изучение ассоциаций (*GWAS*, genome-wide association study), в отличие от исследования генов-кандидатов является «агностическим», т.е. независимым от модели в связи с тем, что он охватывает весь геном, избегая, таким образом, предвзятости в отборе генов.

Начиная с 2007 г. реализация полногеномных исследований ассоциаций способствовала надежной идентификации аллельных вариантов более чем в 35 цитокиновых локусах как факторов предрасположенности для широкого круга более 15 аутоиммунных заболеваний, включая рассеянный склероз [78].

Даже если функциональные последствия большинства из выявленных ассоциаций до конца не выяснены, мы начинаем приближаться к пониманию механизмов, с помощью которых ассоциированные полиморфизмы в генах семейства цитокинов могут влиять на иммунную регуляцию аутоиммунных заболеваний.

Цель настоящей работы – провести анализ литературных источников, касающихся изучения полиморфизмов генов цитокинов как аутоиммунных факторов риска в патогенезе рассеянного склероза.

Использовался поиск по ключевым словам (полиморфизм генов цитокинов, SNP, рассеянный склероз, CD40, TNF $\alpha$ , IL-18) в базе данных Национальной медицинской библиотеки США с помощью PubMed Search. Были проанализированы как отечественные, так и зарубежные источники, индексированные в MEDLINE/PubMed, с акцентом на работы, опубликованные после 2007 г., в которых представлены результаты полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) и мощных исследований по методу «ген-кандидат».

Генетическая основа подверженности РС является сложной и не подчиняется известным менделевским законам. Длительное время РС, как и многие другие аутоиммунные заболевания, ассоциировали исключительно с генами главного комплекса гистосовместимости, причем наиболее сильной оказывается ассоциация с генами HLA класса II, относительные риски на уровне 2,5–3,0 для европеоидов [12, 16]; характерна устойчивая сильная ассоциация с гаплотипом DR15. Полученные данные в ходе исследований на разных

когортах подтверждают, что HLA-DRB1\*15 является значимым фактором риска развития РС, в том числе и у жителей Сибири [7, 12–14].

Участие иных, чем HLA, генов в патогенезе заболевания также подтверждено функционально и статистически в результате большого количества исследований, однако с меньшей силой ассоциаций [56], и далеко не во всех исследованиях получены однозначные выводы.

Однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP) – вариация последовательности ДНК, при которой геномы или участки генетического кода двух особей одного вида или двух хромосом одной особи отличаются на один нуклеотид [56].

Идентифицировано несколько регионов, возможно, связанных с восприимчивостью к РС [40] и обнаружено более 20 однонуклеотидных полиморфизмов в разных генах, не относящихся к HLA-кластеру, показывающих значительную ассоциацию (от  $p = 10^{-3}$  до  $p = 10^{-81}$ ) с развитием у пациента РС [56].

Определение однонуклеотидных полиморфизмов, вовлеченных в этиологию и патогенез РС, является не простой задачей, поскольку участвует большое количество генов, каждый из которых может вносить небольшой вклад в развитие заболевания [68, 69]. Поэтому для увеличения мощности исследований и практической значимости результатов применяются новые подходы, в частности анализ ассоциаций РС с сочетанной встречаемостью аллелей различных генов-кандидатов. Анализ биаллельных сочетаний – наиболее простой и распространенный прием, не требующий сложных математических расчетов. При этом сила выявленных ассоциаций возрастает. Например, ассоциация мутации Delta 32 в хемокиновом рецепторе CCR5 с РС у HLA-DR4-позитивных русских ( $p_{\text{corr}} < 0,001$ , отношение шансов OR 25,0) [45].

Не так давно разработан и валидирован новый биоинформатический подход, основанный на методе Монте-Карло с марковскими цепями [43]. Создается цепь Маркова для отбора только потенциально значительных вариантов, сводя к минимуму большой массив данных. Этот подход дает возможность провести поиск сочетаний аллелей или генотипов, которые наиболее сильно ассоциированы с заболеванием, и количество аллелей в сочетании при использовании этого метода не ограничивается 2. Так, в одной из работ на московской популяции русских было выявлено два до этого не известных триаллельных сочетания, которые предрасполагают к развитию РС: –509TGFbeta1\*C, DRB1\*18(3), CTLA4\*G и –238TNF\*B1, –308TNF\*A2, CTLA4\*G [44].

Со времени публикации результатов первого полногеномного исследования, выполненного Международным Консорциумом по генетике РС (IMSGC) [56], проведено несколько подобных исследований, основанных на методе GWAS (поиск ассоциаций по всему геному) [23, 26, 41, 48, 49, 66]. Не так давно выявлено несколько других регионов, вовлеченных в предрасположенность к РС, что было воспроизведено в различных независимых популяциях. Это относится к генам *IL7RA*, *IRF5*, *IL2RA*.

Среди прочих 21 полиморфизм расположен на хромосоме 1p22 в локусе *GFI-EVI5-RPL5-FAM69A* [56]. Позднее ассоциации этого локуса с РС были воспроизведены на Канадской [58] и Испанской популяциях [23]. Наиболее вероятным кандидатом является полиморфизм *EVI5*, что согласуется с первичными данными. Однако остается открытым вопрос о причинном полиморфизме. В исследовании I.A. Horrenbrouwers с коллегами на голландской когорте ген *EVI5* назван новым риск-геном РС, причем величина относительного риска оказалась даже большей, чем в исследовании IMSGC ( $OR$  2,01 и 1,9 соответственно,  $p = 0,01$ ) [58].

Идентифицирована ассоциация нескольких полиморфизмов на хромосоме 12q13–14 ( $rs703842$ ,  $p = 5,4 \times 10^{-11}$ ;  $rs10876994$ ,  $p = 2,7 \times 10^{-10}$ ;  $rs12368653$ ,  $p = 1,0 \times 10^{-7}$ ) и хромосоме 20q13 (полиморфные варианты гена *CD40*:  $rs6074022$ ,  $p = 1,3 \times 10^{-7}$ ;  $rs1569723$ ,  $p = 2,9 \times 10^{-7}$ ) с РС [49]. Однако кроме гена *IL7RA*, расположенного на хромосоме 5p13 [53, 64] и кодирующего  $\alpha$ -цепь рецептора *IL-7*, не обнаружено причинных SNP во вновь выявленных локусах, и функциональные эффекты кодируемых ими белков являются неуточненными.

В 2011 г. стали известны результаты еще одного полногеномного исследования, выполненного в рамках проекта Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2) [48], включавшего данные 4218 случаев РС и 7296 здоровых людей. За пределами главного комплекса гистосовместимости выявлено 95 различных регионов, имеющих по крайней мере один SNP, связанный с рассеянным склерозом с уровнем значимости  $p_{GWAS} < 1 \times 10^{-4,5}$ . Двадцать три из 26 ранее известных и ассоциированных с РС локусов воспроизведены в этом исследовании GWAS со скромным уровнем значимости  $p_{GWAS} < 1 \times 10^{-3}$ . Дополнительно обнаружено еще 29 новых областей, связанных с РС. Чуть более трети выявленных локусов совпадают с регионами, уже подтвержденными как связанные хотя бы с одним другим аутоиммунным заболеванием (в соответствии с каталогом GWAS).

В одной из последних работ F. Matesanz с соавторами [66] в ходе проведенного полногеномного исследования на испанской популяции и мета-анализа трех GWAS достоверно подтверждены ассоциации с РС 17 однонуклеотидных полиморфизмов, относящихся с трем локусам: *HLA*, *IL-2RA*, 5p13.1. Причем основной вывод исследования относится именно к хромосомной области 5p13.1, с которой однозначно связаны два аутоиммунных заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона). С использованием двух независимых испанских когорт с общим количеством 4192 больных РС и 7498 здоровых лиц авторам удалось однозначно подтвердить защитную роль полиморфизма  $rs9292777$ , расположенного на 5p13.1, для фенотипа рассеянного склероза ( $OR_{pooled} = 0,84$ ; 95%-й доверительный интервал 0,80–0,89;  $p = 1,36 \times 10^{-9}$ ).

Подтверждено вовлечение в восприимчивость к РС множества генов, кодирующих не только молекулы цитокинов (*CXCR5*, *IL2RA*, *IL7R*, *IL7*, *IL12RB1*, *IL22RA2*, *IL12A*, *IL12B*, *IRF5*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF14*, *TNFSF14*), ко-стимулирующих факторов (*CD37*, *CD40*, *CD58*, *CD80*, *CD86*, *CLECL1*) и сигнальных молекул (*CBLB*, *GPR65*, *MALTI*, *RGS1*, *STAT3*, *TAGAP*, *TYK2*), т. е. иммунологически значимых факторов [11, 19, 56, 60]. Также оказываются вовлеченными гены молекул, участвующих в метаболизме экологических факторов риска, таких как витамин D (*CYP27B1*, *CYP24A1*) [3].

В другой работе IMSGC [41] с использованием данных двух полногеномных исследований продемонстрировано, что значительная часть из тысяч вариантов по отдельности не в состоянии показать статистически значимые ассоциации. Совокупный эффект 12 627 однонуклеотидных полиморфизмов по тесту Cochran-Mantel-Haenszel ( $p < 0,02$ ) может объяснить ~ 3 % вариаций в риске РС. Существование высокозначимых ассоциаций с болезнью ( $p = 3,14 \times 10^{-9}$  –  $6,12 \times 10^{-9}$ ) подтверждает тем самым, что при РС имеет место полигенное наследование, определяющееся пока еще неизвестными генетическими вариациями.

Гены цитокиновой сети традиционно привлекают большой интерес как возможные факторы риска аутоиммунных болезней. Это основано на результатах экспериментальных работ, многократно продемонстрировавших участие цитокинов и их рецепторов в патогенезе аутоиммунных заболеваний. На моделях аутоиммунных заболеваний у животных получены доказательства возможности существенно изменить исходы болезни посредством или моноклональных анти-

тел против отдельных цитокинов, или введения рекомбинантных цитокинов, или сплайсингом генов цитокинов. Многочисленные примеры таких успешных вмешательств имеются в научной литературе и будут проанализированы в этом обзоре.

Взаимодействие между рецепторами суперсемейства TNF, экспрессированными на Т-клетках, и TNF-лигандами меняет течение воспалительных процессов, влияя на стимуляцию Т-клеток, взаимодействие между субпопуляциями Т-лимфоцитов, а также усиливая воспалительную реакцию, минуя Т-клеточные взаимодействия [36].

Рецептор TNF $\alpha$  (TNFR II) играет существенную роль в развитии и прогрессировании экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, модели РС у животных.

Ген *TNF $\alpha$*  представлен одной копией на хромосоме 6 человека [67]. В исследованиях *in vitro* продемонстрировано, что аллель А полиморфного локуса в положении G–308А гена *TNF $\alpha$*  ассоциирована с более выраженной транскрипцией цитокина [30, 37]. TNF $\alpha$  считается классическим провоспалительным цитокином, но недавно было показано, что он обладает существенным противовоспалительным и нейропротективным эффектом при демиелинизирующих болезнях [39].

Возможная роль аллелей *TNFRSF1A* при РС может быть изучена на основе результатов функциональных исследований на человеке. Имеются клинические данные, подтверждающие вовлечение TNF $\alpha$  в восприимчивость к РС у человека. Лечение с помощью моноклональных антител к TNF $\alpha$  может вызвать острые эпизоды воспаления центральной нервной системы у пациентов с РС [77]. В ходе II фазы клинических испытаний препарата ленерцепт, представляющего собой гибридный белок TNFRSF1A:IgG1, также выявлено увеличение риска клинических атак [74]. Кроме того, очаги демиелинизации являются возможным побочным эффектом у пациентов с болезнью Крона или ревматоидным артритом при лечении моноклональными антителами к TNF $\alpha$  [73]. Таким образом, на основе генетических и функциональных данных можно предполагать, что нарушение регуляции TNF $\alpha$ -пути играет важную роль в возникновении рассеянного склероза, а клинические наблюдения указывают, что снижение активности TNF $\alpha$  связано с началом воспалительных поражений ЦНС.

На сегодняшний день накоплен большой опыт изучения полиморфизма гена *TNF $\alpha$*  [15, 24, 55], в том числе сибирскими учеными [3, 10, 12, 17, 18]. Так, еще в российских исследованиях 1995–1997 гг. установлено, что аллели *TNF $\alpha$* 1

и *TNF $\alpha$* 9 встречаются достоверно чаще в группе больных РС [2]. В другой работе не обнаружено достоверной разницы в распределении аллелей *TNF $\alpha$*  (–308) у больных и в контрольной группе [24]. В одном из последних исследований показано, что аллель *TNF $\alpha$* (–308)А чаще передается больным детям от здоровых гетерозиготных родителей [9]. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют об участии гена *TNF $\alpha$*  в развитии предрасположенности к рассеянному склерозу у русских.

По данным мета-анализа [38] *TNFRSF1A* имеет две независимых аллели, ассоциированные с РС: rs1800693 – это распространенный вариант с умеренным эффектом (отношение шансов 1,2), тогда как rs4149584 является несинонимично кодирующим полиморфизмом (nonsynonymous coding polymorphism), редким, но с более сильным эффектом (частота аллелей = 0,02; отношение шансов = 1,6)

CD40 – поверхностный рецептор, член семейства рецепторов TNF (TNFRS5), экспрессирующийся как на гемопоэтических клетках (В-лимфоцитах, дендритных клетках, активированных моноцитах), так и на многих других (эпителиальных, эндотелиальных и гладкомышечных клетках, фибробластах, кератиноцитах, остеобластах, нейронах, бета-клетках поджелудочной железы и клетках протоков). Кроме того, было показано, что различные цитокины, такие как гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор, IL-1, IL-3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , индуцируют экспрессию CD40 на различных типах клеток [76]. Ген *CD40* картирован на хромосоме 20q11–13 [4].

Лиганд для CD40, CD40L (который также называют CD154) экспрессируется на активированных Т-клетках. Сигнальная система CD40L/CD40 играет важную роль в регулировании Т-клеточной активации антигенпрезентирующими клетками, в развитии Т-зависимых ответов на чужеродные антигены и болезнетворные микроорганизмы. Прайминг Т-клеток и активация В-лимфоцитов могут наблюдаться и в отсутствие CD40/CD40L-костимулирующих сигналов, но многие иммунные функции нарушаются без этого взаимодействия, что подчеркивает его важность для адекватного иммунного ответа.

Участие системы CD40L (CD154) в патогенезе рассеянного склероза реализуется на различных уровнях. На начальных этапах заболевания CD40L могут быть причастны к миграции Т-клеток через гематоэнцефалический барьер в паренхиму мозга. С другой стороны, участие системы CD40L может быть реализовано через Т-клеточно/макрофагальные взаимодействия,

приводящие к активации различных эффекторных функций макрофагов, таких как презентация аутоантигенов, продукция цитокинов и хемокинов и оксида азота. Дополнительный механизм, посредством которого система CD154 может вносить свой вклад в развитие РС, является продукция аутоантител CD40<sup>+</sup> В-клетками. Действительно, при РС в периваскулярных инфильтратах были обнаружены антитела к основному белку миелина [51].

Таким образом, взаимодействие CD40/CD40L играет ключевую роль в иммунном ответе и является одним из компонентов патогенеза многочисленных аутоиммунных заболеваний, включая РС [31]. Это было показано многочисленными исследованиями как на животных, так и людях.

Хотелось бы обратить внимание на то, что ген *CD40L* расположен на X хромосоме [32], а аутоиммунным заболеваниям в большей степени подвержены женщины.

Функциональная блокада CD40 мышинными антителами эффективно предотвращает клиническую манифестацию модели рассеянного склероза у животных [29, 57]. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (модель РС) не развивается у мышей, нокаутированных по гену *CD40L* [54], поскольку такие животные несут трансгенные Т-клеточные рецепторы, специфичные для основного белка миелина, что приводит к нарушению взаимодействия Т-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток.

Повышенное содержание клеток, экспрессирующих CD40L, обнаружено в мозге пациентов с рассеянным склерозом [50]. В активных очагах, в периваскулярно расположенных инфильтратах выявлена близость CD40L<sup>+</sup> клеток с CD40-экспрессирующими клетками [71].

Различные исследования показали, что моноциты и CD4- и CD8-позитивные Т-лимфоциты, полученные от больных вторично-прогрессирующим РС, экспрессируют CD40L в большей степени, чем клетки пациентов с ремиттирующим РС или здоровых людей [46].

Ассоциация полиморфных локусов, маркирующих промоторную область гена CD40, согласуется с гипотезой об аутоиммунной природе РС. Ранее была показана ассоциация различных полиморфных локусов гена CD40 с рядом аутоиммунных заболеваний: системная красная волчанка, ревматоидный артрит, болезнь Крона, болезнь Грейвса. Косвенным доказательством важной роли системы CD40-CD40L может быть успешно завершённая I фаза клинического исследования (Biogen Idec, США) использования CD40L при лечении системной красной волчанки [[\[www.biogenidec.com/research\\\_product\\\_pipeline.aspx?ID=5778\]\(http://www.biogenidec.com/research\_product\_pipeline.aspx?ID=5778\)\].](http://</a></p></div><div data-bbox=)

Известно, что CD40-CD40L является ключевой сигнальной системой в индукции Th2-ответа, а значит, влияет на продукцию специфических антител, что может объяснять ее участие в развитии аутоиммунных процессов. Это делает крайне привлекательным и перспективным изучение системы CD40-CD40L для разработки таргетного лекарства подавления/предупреждения аутоиммунной атаки [52, 62].

При этом не ясен молекулярный механизм участия гена *CD40* в аутоиммунных процессах при РС. Для решения этой проблемы одним из чувствительных методов является анализ неравновесия по сцеплению. В 2005 г. были опубликованы результаты исследования, проведенного на британской когорте, по оценке неравновесия по сцеплению полиморфных локусов гена CD40 [33]. Анализ показал, что внутри гена *CD40* есть два блока неравновесия по сцеплению. Однако самый дальний от гена в 5'-области полиморфный локус rs1009373 лежит на расстоянии ~5 kb, в то время как rs6074022 локализован на ~6 kb выше начала гена *CD40*. Таким образом, данные этого исследования недостаточны для оценки неравновесия по сцеплению rs6074022 с полиморфными локусами гена.

В исследовании на популяции Алтайского края не было получено достоверной ассоциации полиморфного локуса rs6074022 гена *CD40* с развитием РС [12, 13]. Такое противоречие с результатами некоторых работ [17, 18, 49] может объясняться как генетической гетерогенностью и недостаточным для ее преодоления количеством больных, так и региональными особенностями РС.

В исследовании J.C. Jensen с соавторами получены доказательства более сильного влияния полиморфного локуса rs6074022 на показатели тяжести РС у мужчин [59], однако другие авторы не установили связей полиморфизмов в гене *CD40* с показателями тяжести и скоростью прогрессирования РС [70].

В нашей работе [8] было показано, что генотипы CC полиморфизма rs6074022 и CG полиморфизма rs11086998 гена *CD40* ассоциируются с более высоким уровнем инвалидизации, а генотип CC полиморфизма rs11086998 – с более высокой скоростью прогрессирования РС. Подтверждена связь клинической активности заболевания, определяемой как среднегодовая частота обострений, с наследственным фактором на примере полиморфизма генов цитокинов, которые вовлечены в иммунный ответ.

Другим привлекательным геном-кандидатом предрасположенности к РС можно назвать ген *IL2RA*, кодирующий  $\alpha$ -субъединицу рецептора IL-2. Регуляторные Т-клетки, экспрессирующие на своей поверхности IL-2R (CD25), подавляют аутореактивные Т-лимфоциты на периферии [65], а при РС наблюдается снижение функции и количества регуляторных Т-клеток. Были выявлены ассоциации полиморфизмов гена *IL2RA* с болезнью Грейвса, сахарным диабетом 1-го типа [22] и РС [22, 65]. Предполагается, что ген *IL2RA/CD25* действует как общий локус предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям. К настоящему моменту имеются обнадеживающие результаты II фазы нескольких клинических исследований влияния препарата даклизумаб (Biogen Idec), представляющего собой гуманизированное моноклональное антитело к  $\alpha$ -субъединице рецептора IL-2 (анти-CD25), на клинические и МРТ-параметры РС, показывающие возможность подавления воспаления и стабилизацию прогрессирования заболевания [28, 63]. Даклизумаб продолжают изучать в исследованиях фаз Ib и III.

Н.М. Schrijver с соавторами продемонстрировали наличие влияния аллелей гена *IL1RN* на продукцию IL-1ra. Действительно, показано, что продукция IL-1ra была значительно выше у лиц, гомозиготных по аллели 2 *IL1RN*, и вообще выше у больных РС в сравнении с контрольной группой. У пациентов с первично-прогрессирующим РС соотношение IL-1beta/IL-1ra было значительно меньше, чем у пациентов с ремиттирующим РС [72]. Обнаружены ассоциации полиморфизма генов *IL1B*, *IL1RA* с активностью заболевания и темпом прогрессирования РС [14, 21].

Ключевую роль в поляризации иммунного ответа в сторону Th1 играет IL-12. Интересны результаты генотипирования по полиморфному варианту 1188A/C гена *IL12B* в 3'-нетранслируемой области на томской популяции [1, 3]. Частота генотипа C/C оказалась выше у больных РС, чем у здоровых (8,1 и 0,8 % соответственно). Предполагается, что полиморфизм 1188 A/C гена *IL12B* может иметь отношение как к подверженности РС, так и к активности патологического процесса у носителей аллели C гена *IL12*. Авторы сделали попытку найти генетический маркер (предиктор) ответа на иммуномодулирующую терапию препаратами, изменяющими течение РС, и указывают, что при лечении глатирамера ацетатом у носителей аллели C отмечена тенденция к увеличению времени до наступления первого обострения.

IL-18 – это уникальный цитокин, который стимулирует и Th1-, и Th2-иммунные ответы в

зависимости от окружения, вырабатывается моноцитами/макрофагами, дендритными клетками, В-лимфоцитами и другими антигенпрезентирующими клетками, астроцитами и микроглией. IL-18, его рецептор и IL-18-связывающий белок представляют собой полиморфную структуру, которая формируется как на уровне аллельного полиморфизма генов этих белков, так и за счет альтернативного сплайсинга мРНК этих генов. Показано, что наличие того или иного аллельного варианта IL-18 или IL-18-связывающего белка ассоциируется с увеличением частоты различных патологических процессов, включая сахарный диабет, ревматоидный артрит, некоторые виды опухолей и др. [75]. IL-18 без дополнительной стимуляции увеличивает продукцию IL-8, MIP-1a (macrophage inflammatory protein-1a), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) мононуклеарными клетками периферической крови человека. Антитела к IL-18 предотвращают развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. IL-18 активирует аутореактивные Т-лимфоциты и запускает аутодеструкцию в ЦНС через индукцию IFN- $\gamma$  NK-клетками при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. IL-18 экспрессируется в бляшках, образующихся при РС [47]. Ген *IL18* был картирован в регионе 11q22.2–22.3 в 1998 г. [75]. Несмотря на очевидную роль IL-18 в патогенезе РС, не много публикаций посвящено поиску связи аллельных вариантов гена *IL18* с предрасположенностью к РС [5, 17]. В работе Н.Н. Загорской с соавторами выявлена связь между частотой обострений РС и присутствием различных аллельных вариантов гена *IL18* [5]. Обнаружено, что в группе пациентов с гомозиготным генотипом обострения заболевания возникали реже, чем в группе с гетерозиготным генотипом GС. Это может свидетельствовать о протективной роли аллельного варианта СС гена *IL18* в отношении возрастания частоты обострений при РС.

Таким образом, существующие на сегодняшний день данные позволяют четко определить РС как полигенное заболевание, в развитии которого задействованы как минимум несколько генов.

При этом обсуждается роль полиморфизма генов цитокинов в развитии различных типов заболевания, скорости прогрессирования, интенсивности воспалительной реакции и других важных клинико-патогенетических характеристик РС [4]. А выявление вариантов генов, определяющих конкретный клинический фенотип, исход болезни или ответ на проводимую терапию [20], является важной задачей современных генетических исследований.

С 2007 г. быстро расширяющаяся серия полногеномных исследований (GWAS) при различных заболеваниях помогла идентифицировать и подтвердить наличие многочисленных локусов генов цитокинов/рецепторов как аутоиммунных факторов риска. Важно отметить, что большинство ассоциированных вариантов ДНК вряд ли представляет собой конечные причинные факторы риска заболевания, но, вероятно, возникли вследствие неравновесия по сцеплению с реальным причинным полиморфизмом.

Через неравновесие по сцеплению некоторые варианты, ассоциированные с аутоиммунными процессами и расположенные в пределах или вблизи локусов генов цитокинов, могут влиять на функциональную геномику соседних нецитоклиновых генов, расположенных в том же блоке гаплотипов. Фенотипические эффекты полиморфизмов генов цитокинов не могут быть отделены от других аутоиммунных риск-локусов, если мы хотим получить всеобъемлющее понимание.

Традиционные исследования генов-кандидатов в эру до полногеномных исследований выявили многочисленные связи между генами цитокинов и риском или клиническими параметрами аутоиммунных заболеваний. Многие из этих ассоциаций остаются в силе после GWAS, при том что их эффект оценивается более скромным. Однако, что наиболее важно, проведенные GWAS подтвердили участие полиморфизмов генов цитокинов в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в том числе рассеянного склероза.

В совокупности результаты свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований в генетически разнородных популяциях для выявления новых биомаркеров, связанных с РС, которые могут быть использованы в качестве прогностических факторов или терапевтических мишеней для модуляции аутоиммунного ответа у пациентов с РС.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алифирова В.М., Орлова Ю.Ю., Бабенко С.А. и др. Полиморфизм 1188 A/C гена *IL12B* у больных рассеянным склерозом в Томской области и возможности оценки эффективности иммуномодулирующей терапии // Журн. неврол. психиатрии. 2006. (3, Прил. Рассеянный склероз). 130–135.
2. Андриевский Т.А., Спиринов Н.Н., Качуро Д.В. и др. Генетика рассеянного склероза // Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания / Ред. Е.И. Гусев, И.А. Завалишин, А.Н. Бойко. М., 2004. 43–59.
3. Бабенко С.А. Роль аллельных вариантов генов иммунного ответа в развитии рассеянного склероза: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2008.

4. Бойко А.Н., Гусев Е.И. Достижения в изучении проблем рассеянного склероза (обзор) // Доктор.Ру. 2012. (5). 9–15.

5. Загорская Н.Н., Арефьева Е.Г., Субботин А.В. и др. Связь частоты обострений рассеянного склероза с аллельными вариантами гена *IL18* // Медицина в Кузбассе. 2012. XI. (3). 3–6.

6. Иерусалимский А.П., Доронин Б.М., Малкова Н.А. и др. Эпидемиология рассеянного склероза в Сибири и на Дальнем Востоке (болезненность, заболеваемость) // Рассеянный склероз (эпидемиология, новые методы диагностики). Новосибирск: НГМИ, 1985. 3–5.

7. Коробко Д.С., Малкова Н.А., Булатова Е.В. и др. Генетические и клинические особенности семейного рассеянного склероза в Новосибирске // Актуальные вопросы неврологии. Новосибирск, 2012. 50–55.

8. Коробко Д.С., Кудрявцева Е.А., Малкова Н.А., Филипенко М.Л. Связь полиморфизмов генов цитокинов со скоростью прогрессирования рассеянного склероза // Журн. неврол. психиатрии. 2012. 112. (2). 9–15.

9. Макарычева О.Ю., Царева Е.Ю., Судомина М.А. и др. Анализ сцепления и ассоциации аллелей генов провоспалительных цитокинов *IL-6*, *IFNG* и *TNFA* с рассеянным склерозом с помощью теста неравновесной передачи аллелей (TDT) // Молек. биол. 2010. 44. (5). 824–830.

10. Николаева И.А., Бабенко С.А., Максимова Н.Р., Пузырев В.П. Молекулярно-генетическое исследование рассеянного склероза в Республике Саха (Якутия) // Сибирский консилиум. 2007. (6). 68–72.

11. Орлова Ю.Ю., Алифирова В.М., Чердынцева Н.В., Гервас П.А. Полиморфизм гена хемокинового рецептора *CCR5* у больных рассеянным склерозом в Сибирском регионе // Бюл. сиб. мед. 2006. (3). 98–104.

12. Смагина И. В., Ельчанинова С. А., Золоткина А.Г. и др. Генетические факторы риска рассеянного склероза в популяции Алтайского края // Журн. неврол. психиатрии. 2011. 111. (5). 42–45.

13. Смагина И.В., Игнатова Ю.Н., Ельчанинова С.А., Федянин А.С. Распространенность и факторы риска рассеянного склероза в популяции Алтайского края // Бюл. сиб. мед. 2011. (2). 39–43.

14. Субботин А.В., Глушков А.Н., Арефьева Е.Г. и др. Полиморфизм генов *HLA DRB2* и генов цитокинов *IL-1B*, *IL-1RA* и их влияние на возникновение и течение рассеянного склероза // Медицина в Кузбассе. 2004. (2). 18–22.

15. Судомина М.А., Бойко А.Н., Спуркланд А. и др. Полиморфизм микросателлитных повторов в локусе фактора некроза опухолей при рассеянном склерозе у русских, татар и норвежцев // Нейроиммунология. 2003. (2). 142.

16. Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Бойко А.Н. Рассеянный склероз как полигенное заболевание: современное состояние проблемы // Генетика. 2010. 46. (3). 302–313.
17. Ханох Е.В., Рождественский А.С., Кудрявцева Е.А. и др. Исследование наследственных факторов предрасположенности к рассеянному склерозу и особенностей его течения в русской этнической группе // Бюл. СО РАМН. 2011. (1). 113–118.
18. Ханох Е.В., Рождественский А.С., Кудрявцева Е.А. и др. Влияние полиморфных локусов rs1800629 (TNF $\alpha$ ), rs6074022 (CD40), rs187238 (IL-18), rs10492972 (KIF1B), rs4149584 (TNFRSF1A) на особенности клинических проявлений рассеянного склероза с учетом гендерной принадлежности в этнической группе русских // Бюл. сиб. мед. 2011. (2). 50–56.
19. Хусаинова А.Н. Молекулярно-генетическое исследование рассеянного склероза: полиморфизм генов цитокиновой сети: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2012.
20. Царева Е.Ю., Кулакова О.Г., Макарычева О.Ю. и др. Фармакогеномика рассеянного склероза: ассоциация полиморфизма генов иммунного ответа с эффективностью лечения копаксоном // Молекулярная биология. 2011. 6. 963–972.
21. Шабалдин А.В., Борисов В.И., Филипенко М.Л. и др. Ассоциация полиморфных вариантов генов семейства интерлейкина-1 с рассеянным склерозом // Иммунология. 2007. (5). 260–263.
22. Alcina A., Fedetz M., Ndagire D. et al. IL2RA/CD25 gene polymorphisms: uneven association with multiple sclerosis and type 1 diabetes // PLoS One. 2009. 4. e4137.
23. Alcina A., Fernández O., Gonzalez J.R. et al. Tag-SNP analysis of the GF11-EVI5-RPL5-FAM69 risk locus for multiple sclerosis // Eur. J. Hum. Genet. 2010. 18. (7). 827–831.
24. Alekseenkov A.D., Sudomoina M.V., Boiko A.N. et al. Genetic polymorphisms of the human tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) first intron region in multiple sclerosis (MS) in the Russian ethnic group // Eur. J. Neurol. 1998. 5. (3). 124–125.
25. Bahreini S.A., Jabalameli M.R., Saadatnia M., Zahednasab H. The role of non-HLA single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis susceptibility // J. Neuroimmunol. 2010. 229. (1–2). 5–15.
26. Baranzini S.E., Wang J., Gibson R.A. et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis // Hum. Mol. Genet. 2009. 18. 767–778.
27. Baranzini S.E., Nickles D. Genetics of multiple sclerosis: swimming in an ocean of data // Curr. Opin. Neurol. 2012. 25. (3). 239–245.
28. Bielekova B., Howard T., Packer A.N. et al. Effect of anti-CD25 antibody daclizumab in the inhibition of inflammation and stabilization of disease progression in multiple sclerosis // Arch. Neurol. 2009. 66. (4). 483–489.
29. Boon L., Brok H.P., Bauer J. et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using a chimeric antagonist monoclonal antibody against human CD40 is associated with altered B cell responses // J. Immunol. 2001. 167. 2942–2949.
30. Braun N., Michel U., Ernst B.P. et al. Gene polymorphism at position –308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production // Neurosci. Lett. 1996. 215 (2). 75–78.
31. Buck D., Kroner A., Rieckmann P., Mäurer M. Analysis of the C/T(-1) single nucleotide polymorphism in the CD40 gene in multiple sclerosis // Tissue Antigens. 2006. 68. (4). 335–338.
32. Castigli E., Fuleihan R., Ramesh N. et al. CD40 ligand/CD40 deficiency // Int. Arch. Allergy Immunol. 1995. 107. (1–3). 37–39.
33. Chadha S., Miller K., Farwell L. et al. Haplotype structure of TNFRSF5-TNFSF5 (CD40-CD40L) and association analysis in systemic lupus erythematosus // Eur. J. Hum. Genet. 2005. 13. (5). 669–676.
34. Compston A., Coles A. Multiple sclerosis // Lancet. 2002. 359. (9313). 1221–1231.
35. Compston A., Sadovnic A.D. Epidemiology and genetics of multiple sclerosis // Curr. Opin. Neurol. Neurosurg. 1992. 5. (2). 175–181.
36. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases // Nat. Rev. Immunol. 2009. 9. 271–285.
37. Cuenca J., Pérez C.A., Aguirre A.J. et al. Genetic polymorphism at position-308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population // Biol. Res. 2001. 34. (3–4). 237–241.
38. De Jager P.L., Jia X., Wang J. et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci // Nat. Genet. 2009. 41. (7). 776–782.
39. Drulović J., Popadić D., Mesáros S. et al. Decreased frequency of the tumor necrosis factor alpha –308 allele in Serbian patients with multiple sclerosis // Eur. Neurol. 2003. 50. (1). 25–29.
40. Ebers G.C., Sadovnick A.D., Risch N.J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group // Nature. 1995. 377. 150–151.
41. Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis – the shape of things to come. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) // Am. J. Hum. Genet. 2010. 86. 621–625.
42. Farral M. Mapping genetic susceptibility to multiple sclerosis // Lancet. 1996. 348. 1674–1675.
43. Favorov A.V., Andreevski T.V., Sudomoina M.A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for



identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // *Genetics*. 2005. 171. (4). 2113–2121.

44. Favorova O.O., Favorov A.V., Boiko A.N. et al. Three allele combinations associated with multiple sclerosis // *BMC Med. Genet.* 2006. 7. 63.

45. Favorova O.O., Andreewski T.V., Boiko A.N. et al. The chemokine receptor CCR5 deletion mutation is associated with MS in HLA-DR4-positive Russians // *Neurology*. 2002. 59. (10). 1652–1655.

46. Fillion L.G., Matusевич D., Graziani-Bowring G.M. et al. Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis // *Clin. Immunol.* 2003. 106. 127–138.

47. Fukaura H., Kikuchi S. IL-18 in multiple sclerosis // *Nippon Rinsho*. 2003. 61. (8). 1416–1421.

48. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2 // *Nature*. 2011. 476. (7359). 214–219.

49. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. The ANZgene Consortium // *Nat. Genet.* 2009. 41. 824–828.

50. Gerritse K., Laman J.D., Noelle R.J. et al. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. 93. (6). 2499–2504.

51. Gerritse K., Deen C., Fasbender M. et al. The involvement of specific anti myelin basic protein antibody forming cells in multiple sclerosis immunopathology // *J. Neuroimmunol.* 1994. 49. 153–159.

52. Ghosh S. Biologic therapies: lessons from multiple sclerosis // *Dig. Dis.* 2012. 30. (4). 383–386.

53. Gregory S.G., Schmidt S., Seth P. et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis // *Nat. Genet.* 2007. 39. 1083–1091.

54. Grewal I.S., Foellmer H.G., Grewal K.D. et al. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis // *Science*. 1996. 273. 1864–1867.

55. Gusev E.I., Sudomoina M.A., Boyko A.N. et al. TNF gene polymorphisms: association with multiple sclerosis susceptibility and severity // *Frontiers in Multiple Sclerosis: Clinical Research and Therapy*. London: Martin Dunitz Publishers, 1997. 35–41.

56. Hafler D.A., Compston A., Sawcer S. et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome wide study // *N. Engl. J. Med.* 2007. 357. (9). 851–862.

57. Hart B.A., Hintzen R.Q., Laman J.D. Preclinical assessment of therapeutic antibodies against human CD40 and human interleukin-12/23p40 in a nonhuman primate model of multiple sclerosis // *Neurodegener. Dis.* 2008. 5. 38–52.

58. Hoppenbrouwers I.A., Aulchenko Y.S., Ebers G.C. et al. EVI5 is a risk gene for multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2008. 9. 334–337.

59. Jensen J.C., Stankovich J., Van der Walt A. et al. Multiple sclerosis susceptibility-associated SNPs do not influence disease severity measures in a cohort of Australian MS patients // *PLoS One*. 2010. 5. e10003.

60. Kristjansdottir G., Sandling J.K., Bonetti A. et al. Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations // *J. Med. Genet.* 2008. 45. 362–369.

61. Lassmann H. Mechanisms of inflammation induced tissue injury in multiple sclerosis // *J Neurol. Sci.* 2008. 274. (1–2). 45–47.

62. Law C.L., Grewal I.S. Therapeutic interventions targeting CD40L and CD40: The opportunities and challenges // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. 647. (8). 36.

63. Liu J., Wang L., Zhan S.Y., Xia Y. Daclizumab for relapsing remitting multiple sclerosis // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012. 4. CD008127.

64. Lundmark F., Duvefelt K., Iacobaeus E. et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis // *Nat. Genet.* 2007. 39. 1108–1113.

65. Matesanz F., Caro-Maldonado A., Fedetz M. et al. IL2RA/CD25 polymorphisms contribute to multiple sclerosis susceptibility // *J. Neurol.* 2007. 254. 682–684.

66. Matesanz F., González-Pérez A., Lucas M. Genome-wide association study of multiple sclerosis confirms a novel locus at 5p13.1 // *PLoS One*. 2012. 7. (5). e36140.

67. Nedwin G.E., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y. et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization // *Nucleic Acids Res.* 1985. 13. (17). 6361–6373.

68. Nischwitz S., Müller-Myhsok B., Weber F. Risk conferring genes in multiple sclerosis // *FEBS Lett.* 2011. 585. (23). 3789–3797.

69. Oksenberg J.R., Baranzini S.E. Multiple sclerosis genetics – is the glass half full, or half empty? // *Nat. Rev. Neurol.* 2010. 6. (8). 429–437.

70. Ramagopalan S.V., Ebers G.C. Genes for multiple sclerosis // *Lancet Neurol.* 2008. 371. 283–285.

71. Roth E., Schwartzkopff J., Pircher H. CD40 Ligation in the Presence of Self-Reactive CD8 T Cells Leads to Severe Immunopathology // *J. Immunol.* 2002. 168. 5124–5129.

72. Schrijver H.M., van As J., Crusius J.B. et al. Interleukin (IL)-1 gene polymorphisms: relevance of disease severity associated alleles with IL-1beta and IL-1ra production in multiple sclerosis // *Mediat. Inflamm.* 2003. 12(2). 89–94.

73. Siddiqui M.A., Scott L.J. Spotlight on infliximab in Crohn disease and rheumatoid arthritis // *BioDrugs*. 2006. 20. 67–70.

74. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study.

The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group // *Neurology*. 1999. 53. 457–465.

75. *Thompson S.R., Humphries S.E.* Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility // *Genes Immun*. 2007. 8 (2). 91–99.

76. *van Kooten C., Banchereau J.* CD40-CD40 ligand // *J. Leukoc. Biol*. 2000. 67. 2–17.

77. *van Oosten B.W., Barkhof F., Truyen L. et al.* Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal

anti-tumor necrosis factor antibody cA2 // *Neurology*. 1996. 47. 1531–1534.

78. *Vandenbroeck K.* Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies // *J. Interferon Cytokine Res*. 2012. 32. 4.

79. *Yeo T.W., De Jager P.L., Gregory S.G. et al.* A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis // *Ann. Neurol*. 2007. 61. 228–236.

## **ACHIEVEMENTS AND FUTURE OF RESEARCH OF THE ROLE OF CYTOKINE GENES POLYMORPHISMS IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS (REVIEW)**

**Denis Sergeevich KOROBKO<sup>1</sup>, Nadezhda Alekseevna MALKOVA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *State Novosibirsk Regional Clinical Hospital  
630087, Novosibirsk, Nemirovich-Danchenko str., 130*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

---

It has been proved that multiple sclerosis is a multifactorial polygenic disease. The review of the literature on recent achievements of research of cytokine genes polymorphisms in the pathogenesis of MS and the prospects for the data practical application has been carried out. Original articles and reviews on the results of genome-wide association studies and powerful candidate gene investigations have been analyzed. The biological role of the inflammatory cytokines and the association of polymorphic markers of the disease were described. Thereat besides the issue on susceptibility factors to MS, variants of genes that could determine the clinical phenotype and the clinical outcome are actively investigated.

**Key words:** Multiple sclerosis, cytokine gene polymorphisms, SNP, genotyping, GWAS, gene *CD40*, *TNF $\alpha$*  gene, *IL18* gene.

*Korobko D.S.* – neurologist, e-mail: [ocrs@mail.ru](mailto:ocrs@mail.ru); [denn007@ngs.ru](mailto:denn007@ngs.ru)

*Malkova N.A.* – doctor of medical sciences, professor of the chair for clinical neurology and algology

## ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СУТОЧНОГО ПРОФИЛЯ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ ПРИ ГЕМОФИЛИИ С СИНДРОМОМ ДИСПЛАЗИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Марина Владимировна КОСИНОВА<sup>1</sup>, Надежда Николаевна КУРИНА<sup>2</sup>,  
Сергей Владиславович ТРЕТЬЯКОВ<sup>3</sup>, Людмила Николаевна ГРИЦАЙ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГУЗ Кемеровская областная клиническая больница  
650066, г. Кемерово, Октябрьский пр., 22

<sup>2</sup> ФБЛПУ клиническая больница № 1 ГУФСИН по Кемеровской области  
650025, г. Кемерово, пер. Чкалова, 21

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Цель исследования – изучить суточный профиль артериального давления (АД) и определить маркеры риска формирования артериальной гипертензии у больных гемофилией с признаками соединительнотканной дисплазии сердца (ДСТ). Основная группа представлена 30 больными гемофилией с кардиальными признаками ДСТ, группа сравнения – 33 лицами с кардиальными признаками ДСТ без гемофилии, группа контроля – 21 здоровым человеком. Кардиальными признаками ДСТ служили пролапс створок митрального и трикуспидального клапанов, дополнительные хорды. Суточное мониторирование АД осуществлялось портативным осциллометрическим регистратором VpLab. Обнаружено, что в основной группе, в отличие от группы контроля и сравнения, отмечалось уменьшение среднедневного САД, ДАД и средненочного САД на фоне возрастания величины утреннего подъема САД. В основной группе, в сравнении со здоровыми и лицами с кардиальными признаками ДСТ без гемофилии, наблюдался рост скорости утреннего подъема как САД, так и ДАД. Изучение показателей нагрузки давлением демонстрирует, в сравнении со здоровыми и лицами с кардиальными признаками ДСТ без гемофилии, возрастание удельного веса лиц с повышенными значениями индекса времени ДАД в ночное время, а также удельного веса лиц в основной группе с повышенными значениями вариабельности как САД в дневное время, так и ДАД в ночное время. Изучение вариантов суточного ритма АД показало, что в основной группе, в отличие от группы контроля и сравнения, увеличивается количество лиц с недостаточной степенью («non-dipper») ночного снижения САД и ДАД. Таким образом, можно утверждать, что у больных гемофилией с кардиальными признаками ДСТ, в сравнении со здоровыми и лицами с кардиальными признаками ДСТ без гемофилии, отмечается увеличение скорости утреннего подъема САД и ДАД, вариабельности САД в дневное время и ДАД в ночное время и удельного веса лиц с недостаточной степенью («non-dipper») ночного снижения САД и ДАД.

**Ключевые слова:** гемофилия, артериальное давление, суточное мониторирование, синдром дисплазии соединительной ткани.

Синдром дисплазии соединительной ткани (ДСТ) часто встречается и имеет многообразные проявления [4, 6, 7]. Патогенез артериальной гипертензии (АГ) при ДСТ сложный: прогрессирующая дисфункция парасимпатического отдела вегетативной нервной системы и дисбаланс  $\alpha$ 1-адренорецепторов, снижение диапазона ауторегуляции мозгового кровотока [13]. Повышение артериального давления (АД) при ДСТ имеет признаки самостоятельной формы симптоматической АГ [10]. ДСТ у пациентов с гемофилией

сочетается с дефектами системы гемостаза и относится к геморрагическим мезенхимальным дисплазиям [1, 5, 9, 11, 14, 16]. При этом состоянии наиболее часто выявляются изменения со стороны сердечно-сосудистой системы и повышается риск формирования артериальной гипертензии и ее осложнений [3, 17]. Среди больных гемофилией выявлен значительный удельный вес пациентов, имеющих артериальную гипертензию, и более чем у 70 % обследованных она являлась нефрогенной [2]. У большинства отмеча-

*Косинова М.В.* – зав. отделением гематологии, главный областной гематолог

*Курина Н.Н.* – к.м.н., врач отделения функциональной диагностики

*Третьяков С.В.* – д.м.н., проф. кафедры госпитальной терапии и медицинской реабилитации

*Грицай Л.Н.* – к.м.н., ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии, e-mail: dub\_31@mail.ru

лись рецидивирующие почечные кровотечения, а также различная патология со стороны органов мочевыводящей системы (мочекаменная болезнь, хронический пиелонефрит). Сделан вывод о том, что пациентов, страдающих гемофилией и имеющих рецидивирующие почечные кровотечения, целесообразно относить в группу высокого риска по развитию артериальной гипертензии [2].

В этой связи нами был изучен суточный профиль артериального давления (АД) и предприняты попытки определения маркеров риска формирования артериальной гипертензии у больных гемофилией с признаками соединительнотканной дисплазии сердца.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основная группа представлена 30 больными гемофилией с кардиальными признаками ДСТ (средний возраст  $26,5 \pm 6,5$  года), группа сравнения – 33 лицами с кардиальными признаками ДСТ без гемофилии (средний возраст  $29,5 \pm 2,87$  года), группа контроля – 21 здоровым человеком (средний возраст  $31,0 \pm 5,9$  года).

Использовались следующие критерии включения в основную группу: мужской пол, возраст старше 18 лет, подтвержденный диагноз гемофилии А или В. Критериями исключения служило наличие эндокринных заболеваний, заболеваний почек, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, врожденных и приобретенных пороков сердца.

Наиболее часто выявлялись следующие признаки ДСТ у больных гемофилией: сколиоз позвоночника – 58,6 %, миопия – 29,3 %, косялость – 24,1 %, гипермобильность суставов – 15,4 %, арахнодактилия – 10,3 %, брахидактилия и плоскостопие – 20,6 %, килевидная деформация грудной клетки – 13,8 %.

Кардиальными признаками ДСТ были: удлинение и пролапс створок митрального (1–2 степени) и трикуспидального клапанов (1–2 степени), дополнительные хорды, располагающиеся преимущественно поперечно в полости левого желудочка на уровне верхней и средней третей. Признаки миксоматозной дегенерации створок атриовентрикулярных клапанов не определялись. Для выявления кардиальных признаков ДСТ использовалась эхокардиография, которую осуществляли на аппарате «Aloka SSD-2000» по стандартной методике с использованием рекомендаций Комитета по номенклатуре и стандартизации двумерной эхокардиографии Американского эхокардиографического общества. Суточное мониторирование АД осуществлялось портативным осциллометрическим регистрато-

ром VpLab («Петр Телегин», Нижний Новгород) системы Кардиотехника 04-8 («Инкарт», Санкт-Петербург), версия обрабатывающей программы V3001 kv300. Программирование прибора и расшифровку полученных результатов выполняли с помощью пакета прикладных компьютерных программ. Определяли следующие показатели: среднедневное и средненочное систолическое (САД, мм рт. ст.) и диастолическое АД (ДАД, мм рт. ст.), величины утреннего подъема САД и ДАД (мм рт. ст.) и их скорости (мм рт. ст./ч), индексы времени САД и ДАД в дневное и ночное время (%), вариабельность САД и ДАД в дневное и ночное время (%) [7]. Определяли вариант суточного ритма АД.

Данные представлены как  $M \pm m$ , где  $M$  – медиана,  $m$  – квартильное отклонение. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, критическая величина уровня значимости ( $p$ ) принималась равной 0,05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В основной группе, в отличие от группы контроля и сравнения, отмечалось уменьшение среднедневного САД (на 11,5 %), среднедневного ДАД (на 7,2 и 6,1 % соответственно) и средненочного САД (на 3,3 и 6,2 % соответственно) на фоне возрастания величины утреннего подъема САД (в сравнении с группой контроля на 14,2 %,  $p < 0,05$ ; в отличие от группы сравнения в 1,6 раза,  $p < 0,05$ ) (табл. 1). В основной группе, в сравнении со здоровыми и лицами с кардиальными признаками ДСТ без гемофилии, наблюдался рост скорости утреннего подъема как САД (соответственно на 41,7 %,  $p < 0,05$ , и на 35 %,  $p < 0,05$ ), так и ДАД (на 40 %,  $p < 0,05$ , и на 22,5 %,  $p < 0,05$  соответственно) (см. табл. 1). Высокая скорость подъема АД в утренние часы является независимым фактором риска развития гипертрофии миокарда левого желудочка [12]. В утренние часы отмечается повышение сосудистого тонуса, которое совпадает с нейрогуморальными изменениями. Это время – единственный период в течение суток, когда наблюдаются повышение агрегации тромбоцитов, гиперкоагуляция и снижение фибринолитической активности [цит. по 12]. В утренние часы отмечается физиологическая активация симпатoadреналовой и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем, рост симпатической и снижение парасимпатической активности. Выраженное повышение АД в утренние часы в сочетании с нейрогуморальными изменениями может являться триггером каскада процессов, неблагоприятных в плане сердечно-сосудистых осложнений [12].

Таблица 1

Показатели суточного мониторинга артериального давления у обследованных лиц

Показатель	Группа контроля (n = 21)	Группа сравнения (n = 33)	Основная группа (n = 30)
Среднедневное САД, мм рт. ст.	130,5 ± 4,75	130,2 ± 5,18	115,5 ± 12,25
Среднедневное ДАД, мм рт. ст.	76,5 ± 4,25	75,59 ± 6,79	71,0 ± 11,0
Средноночное САД, мм рт. ст.	107,0 ± 3,75	110,26 ± 3,75	103,5 ± 10,25
Средноночное ДАД, мм рт. ст.	61,0 ± 5,25	58,03 ± 7,23	59,0 ± 8,25
Величина утреннего подъема САД, мм рт. ст.	45,5 ± 7,0	32,95 ± 7,25	53,0 ± 18,0*,#
Величина утреннего подъема ДАД, мм рт. ст.	36,0 ± 4,88	27,85 ± 4,88	37,5 ± 6,75#
Скорость утреннего подъема САД, мм рт. ст./ч	10,5 ± 2,25	11,7 ± 3,18	18,0 ± 8,13*,#
Скорость утреннего подъема ДАД, мм рт. ст./ч	6,0 ± 2,75	7,75 ± 2,04	10,0 ± 4,88*

Примечание. Здесь и в табл 2, 3 обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величины соответствующего показателя: \* – лиц группы контроля, # – лиц группы сравнения.

Таблица 2

Показатели нагрузки давлением и вариабельности АД у обследованных лиц по данным суточного мониторинга артериального давления

Показатель	Группа контроля (n = 21)	Группа сравнения (n = 33)	Основная группа (n = 30)
Индекс времени САД, день	4 (19,0 %)	16 (48,5 %)	8 (26,6 %)
Индекс времени ДАД, день	3 (14,3 %)	12 (36,4 %)	5 (16,7 %)
Индекс времени САД, ночь	2 (9,5 %)	16 (48,5 %)	11 (36,6 %)
Индекс времени ДАД, ночь	2 (9,5 %)	5 (15,1 %)	8*,# (26,6 %)
Вариабельность САД, день	2 (9,5 %)	2 (6,1 %)	10*,# (33,3 %)
Вариабельность ДАД, день	3 (14,2 %)	2 (6,0 %)	5# (16,7 %)
Вариабельность САД, ночь	(1) 4,7	0 (0 %)	6*,# (20 %)
Вариабельность ДАД, ночь	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (6,7 %)

Таблица 3

Варианты суточного ритма артериального давления у обследованных лиц

Показатель	Группа контроля (n = 21)	Группа сравнения (n = 33)	Основная группа (n = 30)
Суточный индекс САД «non-dipper»	1 (4,8 %)	4 (12 %)	14*,# (46,67 %)
Суточный индекс САД «dipper»	19 (90,4 %)	25 (76 %)	15*,# (50 %)
Суточный индекс САД «over-dipper»	1 (4,8 %)	4 (12 %)	1# (3,33 %)
Суточный индекс ДАД «non-dipper»	0 (0 %)	2 (6 %)	8*,# (26,6 %)
Суточный индекс ДАД «dipper»	19 (90,4 %)	13 (39,4 %)	18* (60 %)
Суточный индекс ДАД «over-dipper»	2 (9,6 %)	18 (54,6 %)	4 (13,4 %)

Изучение показателей нагрузки давлением (табл. 2) демонстрирует, в сравнении со здоровыми и лицами с кардиальными признаками ДСТ без гемофилии, возрастание удельного веса лиц с повышенными значениями индекса времени ДАД в ночное время (соответственно в 4 раза,  $p < 0,05$ , и в 1,6 раза,  $p < 0,05$ ), а также удельного веса лиц в основной группе с повышенными значениями вариабельности как САД в дневное время (в 5 раз,  $p < 0,05$ ), так и ДАД в ночное время

(соответственно на 76,5 %,  $p < 0,05$ , и на 100 %,  $p < 0,05$ ) (см. табл. 2). Возрастание указанных значений в основной группе свидетельствует об изменениях в многоконтурной системе регуляции АД, включающей центральную и периферическую нервную систему, систему сопряжения сердечного выброса и общего периферического сопротивления.

Изучение вариантов суточного ритма АД показало (табл. 3), что в основной группе, в отличие

от группы контроля и сравнения, повышается количество лиц с недостаточной степенью («non-dipper») ночного снижения САД (соответственно на 92,9 %,  $p < 0,05$ , и на 71,5 %,  $p < 0,05$ ) и ДАД (соответственно с 0 до 8 раз,  $p < 0,05$ , и в 4 раза,  $p < 0,05$ ). В формировании суточного ритма АД вовлечено несколько нейрогуморальных систем. Несомненное значение имеют повышение уровня вазоактивных гормонов (выявлена корреляция между величиной АД и активностью ренина плазмы, содержанием норадреналина и ангиотензина II), роль центральных механизмов и изменение общего периферического сопротивления сосудов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных гемофилией с кардиальными признаками ДСТ, в сравнении со здоровыми людьми и лицами с кардиальными признаками ДСТ без гемофилии, отмечается увеличение скорости утреннего подъема как САД, так и ДАД, вариабельности САД в дневное время и ДАД в ночное время и удельного веса лиц с недостаточной степенью («non-dipper») ночного снижения САД и ДАД, что можно рассматривать в качестве предикторов поражения органов-мишеней и развития сердечно-сосудистых осложнений. Это диктует необходимость формирования особой группы диспансерного наблюдения и разработки профилактических мероприятий.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН в рамках ГК № 16.522.11.7057.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы: 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1988.
2. Блажиевич И.А., Поспелова Т.И. Синдром артериальной гипертензии у больных гемофилией // Бюл. сиб. мед. 2008. 7. (Прил. 2). 11–12.
3. Земцовский Э.В. Соединительнотканная дисплазия сердца. СПб.: Политекс – Норд – Вест, 2000.
4. Капустин С.И., Шмелева В.М., Панишина А.М. Генетическая предрасположенность к венозному тромбозу: роль полиморфизмов компонентов плаз-

менного и тромбоцитарного звеньев гемостаза // Ученые записки СПбГМУ. 2004. 3. 10–15.

5. Клеменов А.В. Первичный пролапс митрального клапана. Современный взгляд на проблему. Нижний Новгород, 2002.

6. Мартынов А.И., Степура О.В., Остроумова О.Д. Маркеры дисплазии соединительной ткани у больных с идиопатическим пролабированием атриовентрикулярных клапанов и с аномально расположенными хордами // Терапевт. арх. 1996. (2). 40–43.

7. Мартынов А.М., Степура О.Б., Остроумова О.Д. и др. Врожденные дисплазии соединительной ткани // Вестн. РАМН. 1998. (2). 47–54.

8. Рогоза А.Н., Никольский В.П., Ощепкова Е.В. и др. Суточное мониторирование артериального давления (Методические вопросы) / Ред. Г.Г. Арабидзе, О.Ю. Атьков. М., 1997.

9. Суханова Г.А., Калашикова Е.В., Якимов В.М. и др. Нарушения гемостаза у больных диспластическим сколиозом // Гематол. трансфузиол. 1994. 39. (5). 44–45.

10. Холкина И.А. Нарушение ритма сердца и толерантность к физической нагрузке у молодых людей с артериальной гипертензией и дисплазией соединительной ткани // Консилиум. 2000. (1). 11–14.

11. Шмырев В.И., Степура О.Б., Курильченко Д.С. и др. Клинико-неврологическая симптоматика при синдроме дисплазии соединительной ткани сердца // Рос. мед. журн. 1998. (3). 55–58.

12. Чазова И.Е., Ратова Л.Г. Роль суточного мониторирования артериального давления в оценке эффективности антигипертензивной терапии (результаты суточного мониторирования артериального давления в программе КЛИП-АККОРД) // Consilium medicum. 2007. (1). 18–26.

13. Яхонтов Д.А., Верещагина Г.Н. Артериальная гипертензия у лиц молодого возраста с дисплазией соединительной ткани // Консилиум. 2000. (1). 15–17.

14. Becker B.F., Heindl B., Kupatt C., Zahler S. Endothelial function and hemostasis // Zeitschr. Kardiol. 2000. 89. 160–167.

15. Girolami A., Ruzzon E., Fabris F. Myocardial infarction and other arterial occlusions in hemophilia A patients // Acta Haematol. 2006. 116. (2). 120–125.

16. Takamoto T., Nitta M., Tsujibayashi T. Prevalence and clinical features of pathologically abnormal mitral valve leaflets (myxomatous mitral valve) in the mitral valve prolapse syndrome: an echocardiographic and pathological comparative // J. Cardiol. Suppl. 1991. 25. 75–86.

## **FEATURES OF PARAMETERS OF ARTERIAL PRESSURE DAILY PROFILE AT HEMOPHILIA WITH SYNDROME OF CONNECTIVE TISSUE DYSPLASIA**

**Marina Vladimirovna KOSINOVA<sup>1</sup>, Nadezhda Nikolaevna KURINA<sup>2</sup>,  
Sergey Vladislavovich TRETYAKOV<sup>3</sup>, Lyudmila Nicolayevna GRITSAY<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Kemerovo District Clinical Hospital  
650066, Kemerovo, Oktaybrski av., 22*

<sup>2</sup> *Clinical Hospital No 1  
650025, Kemerovo, Chkalov lane, 21*

<sup>3</sup> *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630090, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

---

The purpose of research was to study an arterial pressure daily profile and to determine the markers of the arterial hypertension risk forming at the patients with hemophilia with the signs of heart connective tissue dysplasia (HCD). The main group consists of 30 patients with hemophilia with the signs of heart connective tissue dysplasia (HCD), the comparison group consists of 33 people with cardiac signs of HCD without hemophilia, and the control group consists of 21 healthy people. (21 person, mean age 31.0±5.87 year). Cardiac signs of HCDH were: mitral valve prolapse and tricuspid valve prolapse, additional chords. The arterial pressure daily monitoring was carried out with the portable oscillometric registrar BpLab. It has been revealed that in the main group as against the control group the decrease in average daily SAP, DAP and average nightly SAP on a background of increase of level of AP morning rise was registered. In the main group in comparison with healthy people and patients with cardiac signs of HCD without a hemophilia the growth of the morning rise speed of both SAP and DAP was observed. Studying of variants of AP daily rhythm showed that in the main group in comparison with control and comparison groups the number of people with insufficient degree («non-dipper») of SAP and DAP nightly decrease was risen. Thus, at patients with hemophilia and cardiac signs of HCD in comparison with healthy people and patients with cardiac signs of HCD without hemophilia the increase in speed of morning rise of both SAP and DAP, SAP variability in the day–time and DAP at night and the ratio of people with insufficient degree («non-dipper») nightly decrease of SAP and DAP have been revealed.

---

**Key words:** hemophilia, arterial pressure, daily monitoring, syndrome of connective tissue dysplasia.

*Kosinova M.V. – head of department for hematology, main regional hematologist*

*Kurina N.N. – candidate of medical sciences, physician of department for functional diagnostics*

*Tretyakov S.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for hospital therapy and medical rehabilitation*

*Gritsay L.N. – candidate of medical sciences, assistant of the chair of therapy, hematology and transfusiology,*

*e-mail: dub\_31@mail.ru*

УДК 575.176:364.692

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ И ОРФАННЫЕ БОЛЕЗНИ В СИБИРСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ****Валерий Павлович ПУЗЫРЕВ, Людмила Павловна НАЗАРЕНКО,  
Игорь Николаевич ЛЕБЕДЕВ***ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН  
634050, г. Томск, наб. реки Ушайки, 10*

Наследственные заболевания вносят существенный вклад в уровень здоровья популяций человека, который, по некоторым оценкам, достигает 20 %. Поэтому исследование количественных и качественных характеристик груза наследственных болезней и механизмов его формирования в различных регионах страны представляется достаточно важной и актуальной проблемой. Оценки груза позволяют обосновать приоритеты развития определенных служб здравоохранения и направления фундаментальных научных исследований, дают возможность разработки критериев для оценки конечных результатов терапевтических и профилактических мероприятий, а также необходимы для определения эффективности работы системы здравоохранения.

**Ключевые слова:** генетический груз, этноспецифические и орфанные болезни, трансляционная и прецизионная медицина.

Современная фундаментальная медицинская наука все больше мыслит в терминах конечного результата, ставя перед собой задачу для ответа на вопросы «зачем?» и «с какой целью?». Особенно инновационный потенциал науки накоплен в области молекулярной биологии и генетики, отмечающих в 2013 г. юбилейные вехи своего развития: 60-летие открытия структуры ДНК Дж. Уотсоном, Ф. Криком и М. Уилкинсом (1953 г.), 30-летие изобретения полимеразной цепной реакции (ПЦР) К. Мюллисом (1983 г.), 10-летие с завершения проекта «Геном человека» (2003 г.). Получены новые знания о причинных факторах наследственных болезней (динамические мутации, геномный импринтинг), предложены новые подходы к диагностике (преимплантационная диагностика, анализ нуклеиновых кислот плода, циркулирующих в кровотоке матери), составляющие основу для развития персонализированной медицины. Однако необходимы дополнительные условия, чтобы представить целостную картину человеческого интерактома, содержащего 25 тыс. белок-кодирующих генов, приблизительно 1000 метаболитов, неопределенное (ошеломляющее) количество белков и функциональных молекул ДНК, не менее 100 тыс. узлов (хабов), формирующих сеть их взаимодействий [7].

В стремлении эффективного использования полученных достижений в практике здравоохранения сформировалось новое направление –

трансляционная медицина – определяемое как область науки, основной целью которой является применение достижений фундаментальной науки для максимально эффективного перевода научных исследований в инновации, востребованные на рынке медицинских услуг с учетом региональных потребностей и тенденций развития мировой биомедицинской науки [4]. Все разделы клинической медицины находятся в ожидании трансляции результатов фундаментальных исследований в совершенствовании диагностики, профилактики и лечения заболеваний. Но особенно, когда геном человека стал самостоятельным объектом исследования, это касается наследственной патологии человека.

Представляется важным изучение отягощенности населения разных регионов и этнических групп наследственной патологией, что позволит обосновать приоритеты в развитии медико-генетической помощи населению и направления научных исследований.

**ОТЯГОЩЕННОСТЬ СИБИРСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ  
МОНОГЕННЫМИ БОЛЕЗНЯМИ**

В европейской части России в результате комплексных исследований Медико-генетического научного центра РАМН по эпидемиологии наследственных болезней с использованием оригинального «обзорного метода», позволяющего

*Пузырев В.П. – д.м.н., проф., академик РАМН, директор, e-mail: valery.puzryrev@medgenetics.ru  
Назаренко Л.П. – д.м.н., проф., зам. директора, e-mail: ludmila.nazarenko@medgenetics.ru  
Лебедев И.Н. – д.б.н., рук. лаборатории цитогенетики, e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru*



провести обследование определенной популяции и выявить максимально возможное число нозологических форм наследственных заболеваний [2], получены сведения о распространенности и спектре моногенных болезней. Обследовано около 3 млн человек, проживающих в 11 регионах. Нозологический спектр наследственных болезней в этой выборке составил 474 клинически различных заболевания. Выявлено около 8 тыс. больных с редкими формами менделевской патологии. Проанализированы основные закономерности формирования спектра наследственных болезней.

Сходный подход к эпидемиологии наследственных болезней в сибирском регионе был использован НИИ медицинской генетики СО РАМН [16]. Всего обследовано 52 региона общей численностью около 1,9 млн человек. Оценки груза моногенных заболеваний в 5 регионах Сибири представлены в табл. 1 и основаны на данных

семейного и клинического анализа 1889 больных с 324 формами моногенных патологий. Выявляется генетическая дифференциация изученных популяций (русских, тувинцев, хакасов, алтайцев и якутов) по величине груза аутосомно-рецессивных (АР) и аутосомно-доминантных (АД) заболеваний и ее отсутствие по Х-сцепленным заболеваниям.

Отягощенность наследственными болезнями в изученных тюркских популяциях варьирует в достаточно широких пределах: от  $0,1 \times 10^{-3}$  (среди алтайцев – Х-сцепленная патология) до  $1,7 \times 10^{-3}$  (среди якутов – АД патология), однако для большинства устойчивых, сформировавшихся популяций она составляет примерно  $(2,0-3,8) \times 10^{-3}$ . В общий уровень отягощенности населения наследственными болезнями в некоторых обследованных популяциях основной вклад вносит АД патология, тогда как в популяциях Республик Тыва и Алтай отмечается преобладание АР забо-

Таблица 1

Груз наследственных болезней среди коренных народностей Сибири в сравнении с населением Томской области

Популяция	Число обследованных, тыс. чел.	Груз $1 \times 10^{-3}$			
		АД	АР	Х-сцепленные	Общий груз
Республика Якутия (якуты)	102,3	1,7	0,7	0,4	2,8
Республика Тыва (тувинцы)	198,4	0,6	0,9	0,5	2,0
Республика Алтай (алтайцы)	59,0	1,1	2,6	0,1	3,8
Республика Хакасия	442,6	1,1	0,8	0,4	2,3
Томская область	903,9	0,8	0,8	0,4	2,0

Таблица 2

Наследственные болезни в Якутии [5]

Название (ОМIM)	Мутация у якутов	Распространенность у якутов на 100 000 населения (мужчин)
Спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа (164400)	Экспансия CAG-повторов гена <i>ATXN1</i>	36,8
Миотоническая дистрофия (160900)	Экспансия CTG-повторов гена <i>DMPK</i>	21,3
Окулофарингеальная мышечная дистрофия (164300)	Экспансия GCG-повторов гена <i>PABPN1</i>	11,1
Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия (250800)	Pro269Leu в гене <i>DIA1</i>	14,9
Атаксия Фридрейха (229300)	Экспансия GAA-повторов гена <i>FRDA</i>	2,8
3-М синдром (273750)	4582insT гена <i>CUL7</i>	10,0
Синдром низкорослости с атрофией зрительных нервов, колбочковой дистрофией сетчатки, пельгеровской аномалией лейкоцитов	R1914H гена <i>NAG</i>	10,0
Спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди (313200)	Экспансия CAG-повторов гена <i>AR</i>	2,8

леваний. Сравнительный анализ отягощенности наследственной патологией коренного (тюркского) населения популяций Сибири показал, что во всех четырех изученных популяциях отягощенность АД патологией находится примерно на одном уровне, за исключением Республики Тыва. Отягощенность АР патологией также находится примерно на одном уровне, за исключением Республики Алтай, где она выше в 2,5 раза, что связано с особенностями популяционной структуры, в частности с подразделенностью популяций коренного населения [3]. И если для тувинской популяции случайный инбридинг – мера генетического дрейфа, обусловленного случайной флуктуацией частот генов в подразделенных популяциях небольшого размера, то основным фактором популяционной динамики, оказывающим влияние на частоту мутантных генов у русского населения Томской области, является миграция [6].

Генетико-эпидемиологическое исследование якутской популяции зафиксировало целую группу этноспецифических болезней, для которых изучена молекулярно-генетическая основа. Спектр «якутских» болезней представлен в табл. 2.

#### ОРФАННЫЕ («СИРОТСКИЕ») БОЛЕЗНИ (ОБ)

Основные характеристики ОБ могут быть суммированы в следующих положениях:

- частота каждой орфанной болезни – менее чем 1 случай на 200 тыс. населения, но суммарно это эквивалентно ~ 6,5 больным на 10 тыс. населения (критерии в США и странах Европы); в России – 1 на 10 тыс.;

- ОБ существуют во всех классах болезней, но чаще (в 80 % случаев) имеют явную генетическую причину. Описано более 8000 таких патологий;

- общее число больных с ОБ в России не менее 1,5 млн человек;

- 2/3 случаев ОБ манифестирует в детском возрасте. Летальность 10 % до 5 лет, еще 12 % – в 5–15 лет;

- обследование для уточнения диагноза нередко требует уникального и дорогостоящего оборудования;

- лечение дорого, до 1,5 млн рублей в месяц; благотворительность не решает эту проблему.

В соответствии с Постановлением Правительства РФ от 26.04.2012 № 403 к орфанным болезням, среди которых преобладают наследственные, отнесено 24 нозологии (табл. 3). По российским критериям, орфанные болезни – это только те из редких заболеваний, для которых существует лечение. В научной платформе «Пе-

диатрия», в составе «Государственной программы развития здравоохранения РФ до 2020 года», обозначено направление – «совершенствование ранней диагностики, лечения и реабилитации детей с редкими (орфанными) болезнями», которое поручено курировать Научному центру здоровья детей РАМН [1].

**Таблица 3**

*Перечень жизнеугрожающих и хронических прогрессирующих редких («орфанных») заболеваний, приводящих к сокращению продолжительности жизни или инвалидности*

Наименование заболевания	Код МКБ-10
Гемолитико-уремический синдром	D 59.3
Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (Маркиафавы–Микели)	D 59.5
Апластическая анемия (неуточненная)	D 61.9
Наследственный дефицит факторов II (фибриногена), VII (лабильного), X (Стюарта–Прауэра)	D 68.2
Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (синдром Эванса)	D 69.3
Дефект в системе комплемента	D 84.1
Преждевременная половая зрелость центрального происхождения	E 22.8
Нарушения обмена ароматических аминокислот (классическая фенилкетонурия, другие виды гиперфенилаланинемии)	E 70.0; E 70.1
Тирозинемия	E 70.2
Болезнь «кленового сиропа»	E 71.0
Другие виды нарушений обмена аминокислот с разветвленной цепью (изовалериановая ацидемия, метилмалоновая ацидемия, пропионовая ацидемия)	E 17.1
Нарушения обмена жирных кислот	E 71.3
Гомоцистинурия	E 72.1
Глютарикацидурия	E 72.3
Галактоземия	E 74.2
Другие сфинголипидозы: Болезнь Фабри (Фабри–Андерсон), Нимана–Пика	E 75.2
Мукополисахаридоз, тип I	E 76.0
Мукополисахаридоз, тип II	E 76.1
Мукополисахаридоз, тип VI	E 76.2
Острая перемежающаяся (печеночная) порфирия	E 80.2
Нарушения обмена меди (болезнь Вильсона)	E 83.0
Незавершенный остеогенез	Q 78.0
Легочная (артериальная) гипертензия (идиопатическая) (первичная)	I 27.0
Юношеский артрит с системным началом	M 08.2

**ПРИОРИТЕТНЫЕ ОБЛАСТИ ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТОК В МОДЕРНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ПО ОКАЗАНИЮ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ БОЛЬНЫМ ОБ**

Важной задачей современной медицинской науки становится участие в модернизации здравоохранения для повышения качества и эффективности диагностики, профилактики, а в перспективе – и лечения орфанных наследственных болезней. Решение этой задачи видится в тесном альянсе фундаментальных и прикладных исследований (рисунок). Прокомментируем лишь некоторые из них.

**Сети орфанных болезней и их мутантных генов (сеть орфанного дизисома).** Важным открытием прошлого десятилетия стало понимание того, что сети, организующиеся в природе, технологических и социальных системах, неслучайны, а в своей структуре и эволюции подчиняются ряду базовых организующих принципов, которые отличают их от случайно собранных сетей. Неожиданным свойством биологических сетей является наличие в них сильно сцепленных узлов (хабов), играющих особую биологическую роль. Хабы (белки, метаболиты, заболевания) соединены связями (межбелковые взаимодействия, метаболические реакции или общие гены). В клетках человека хабы кодируются эссенциальными генами, а не генами болезней. Заметим, что к эссенциальным генам относятся обнаруживаемые путем извлечения ортологов, нокаут которых приводит к летальному фенотипу в эмбриональном и постнатальном периодах. Эссенциальные

гены, не связанные с болезнями, имеют стойкую ассоциацию с хабами, экспрессируются в разных тканях и располагаются в центре интерактома.

Эти общие кратко изложенные положения из теории сетей в отношении сетей болезней и генов [7] были проверены для ОБ [21]. Анализ сетей ОБ и их мутантных генов, которые получили название «сетей орфанного дизисома», показал, что для 69 % ОБ выявляется один причастный к болезни ген, остальные имеют более одного значимого мутантного гена. Но только 40 ОБ имели не менее 10 известных вызывающих болезнь мутантных генов. Так, мутации гена *LMNA*, лежащего в основе одного из трех типов ламинов, структурных белков, составляющих основу внутренней оболочки ядра клетки, вовлечены в 17 ОБ, тогда как несиндромальная наследственная глухота имеет максимальное число – 43 известных мутантных гена. Обнаружено, что гены, мутации в которых приводят к развитию ОБ, в 62 % случаев являются эссенциальными и/или повсеместно экспрессируемыми, а в случае генов, мутантные формы которых не ассоциированы с каким-либо ОБ, эта цифра достигает лишь 18 %.

Анализ орфанного дизисома в сетевой медицине начал проводиться совсем недавно [7, 10, 21], но предсказываются большие инновационные возможности этого подхода, и не только в отношении ОБ, но и в целом для болезней с разной степенью участия наследственности в их развитии. Так, интеграция различных сетей интерактома и функциональных связей была использована для прогнозирования новообразований по дру-



Рис. Приоритетные области исследований и разработок для модернизации здравоохранения

гим типам генов-кандидатов и генов-модификаторов [14]. Обсуждаются перспективы использования сетей орфанных болезней в разработках по фармакотерапии (драггом) как ОБ, так и других, показывающих в интерактоме соответствующие взаимодействия.

**Орфанные гены.** Большинство генов, имеющих отношение к болезням человека, относится к категории неэссенциальных, в связи с чем высказывалось предположение о том, что их возникновение должно быть достаточно поздним эволюционным событием в линии, ведущей к появлению современного человека. Однако вопреки этому ожиданию данные гены были обнаружены уже на самых ранних этапах эволюции. С использованием филостратиграфического подхода, основанного на сопоставлении расшифрованных геномов различных видов, было проанализировано появление генов заболеваний на 19 крупных филогенетических уровнях [9]. Оказалось, что большинство генов болезней человека (60 %) возникло уже при появлении эукариотической клетки и первых многоклеточных организмов. По всей видимости, это нельзя считать неожиданным, поскольку эти гены вовлечены в регуляцию клеточного метаболизма и контроль транскрипции. Второй заметный пик, приходящийся на «Кембрийский взрыв», связан с эволюцией сигнальных механизмов. Именно в этот период появляются гены сигнальных G-белков. Что касается линии, ведущей к приматам, то в ней появляются гены, вовлеченные в регуляцию сперматогенеза и кератинизацию. В целом лишь примерно 13 % генов в геноме человека появились во время эволюции млекопитающих. Такие гены были обозначены как «орфанные», т.е. присутствующие в пределах определенной таксономической группы. Эволюционное происхождение и значение орфанных генов пока остается неясным, несмотря на то, что у разных видов они могут представлять до 1/3 всех генов в геноме. По всей видимости, орфанные гены важны для таксон-специфичной адаптации и взаимодействия с окружающей средой [20].

Идентификация орфанных генов представляется существенной для понимания закономерностей возникновения и эволюции последовательностей генома, имеющих отношение к наследственным болезням человека. Здесь необходимо подчеркнуть, что термины «орфанные гены» и «орфанные болезни» не связаны между собой, т.е. орфанный ген – это не ген орфанного заболевания, хотя нельзя исключить и обратное. Действительно, небольшая часть генов болезней (0,6 %) обнаруживается в молодых эволюционных линиях, начинающихся от плацентарных

млекопитающих. Среди них преобладают гены вспомогательных белков, в частности ген аполипротеина C-II *APOC2*, рецептора меланокортина *MRAP*, муцина слюнных желез *MUC7* [9]. Другой практический аспект может быть связан с биомедицинскими исследовательскими стратегиями. Принимая во внимание, что подавляющее число генов болезней человека возникло уже на ранних этапах развития жизни, представляется оправданным для изучения их функций использовать модельные организмы, эволюционно далекие от человека, например, такие как нематоды или насекомые. В этом отношении особый интерес вызывает концепция «фенологов» – ортологичных фенотипов, обусловленных ортологичностью генов у двух сравниваемых видов [15]. Фенологи любопытны тем, что позволяют переносить известные генофенотипические корреляции с одного вида на другой, предсказывая у последнего новые или даже неочевидные ассоциации. Однако нужно учитывать, что функциональная значимость некоторых генов в ходе длительной эволюции может претерпевать изменения.

**Популяционная специфичность мутаций и полиморфизмов ДНК.** Отмеченная выше популяционная специфичность наследственных заболеваний затрагивает вопрос и о молекулярно-генетических основах наблюдаемого спектра патологий в том или ином регионе. Современные технологии анализа генома (биологические микрочипы, секвенирование нового поколения, тандемная масс-спектрометрия) в большинстве случаев оказываются информативными для установления природы генетического дефекта. В то же время данные, получаемые с использованием таких методов, оказываются перегруженными различными полиморфными вариантами (однонуклеотидный полиморфизм SNP, вариация числа копий CNV), патогенетическая значимость которых пока остается неясной. Существующие базы данных, в частности База данных геномных вариантов (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation>), аккумулируют информацию о нормальной и патологической вариабельности генома человека на уровне CNV. Однако в них до сих пор отсутствуют сведения о характере такой вариабельности для российских популяций. Подобные исследования в России только начинают проводиться, и ценность их для интерпретации клинической значимости тех или иных изменений в архитектуре генома при молекулярно-генетической диагностике наследственных болезней представляется весьма существенной.

**Неинвазивная диагностика с использованием внеклеточной ДНК.** Геномная информация становится все более востребованной и в

целях пренатальной диагностики наследственных болезней. В последние годы возрастающее внимание отводится внеклеточным нуклеиновым кислотам плода, циркулирующим в кровотоке матери, как объекту генетического анализа. С использованием технологий массивного параллельного секвенирования несколькими компаниями уже выведены на рынок тест-системы для неинвазивной пренатальной диагностики синдромов Дауна, Патау, Эдвардса, Шерешевского-Тернера, демонстрирующие высокую чувствительность и специфичность (например, «MaterniT21 plus» от компании «Sequenom, Inc.», США, «Harmony prenatal test» от «Ariosa Diagnostics, Inc.», США, «Verifi prenatal test» от «Verinata Health.», США). Ведутся исследования с целью неинвазивной диагностики микроделеционных и микродупликационных синдромов. Основу используемого подхода составляет прочтение коротких фрагментов плодной ДНК, циркулирующих в материнской крови, и анализ их копийности по отношению к материнской ДНК [8]. Изменение данного соотношения, которое возникает при полной или сегментной хромосомной анеуплоидии, и является индикатором заболевания у плода, что может быть верифицировано уже с использованием стандартных инвазивных цитогенетических процедур. Разрабатывается альтернативный подход – анализ дифференциального метилирования отдельных участков генома, эпигенетический статус которых отличается во внеклеточной ДНК плода, происходящей главным образом из трофобласта плаценты и в лимфоцитах периферической крови матери [17, 18]. Так или иначе, складываются предпосылки к включению геномного скрининга на основе использования фракций внеклеточной фетальной ДНК в существующие алгоритмы пренатального скрининга на основе биохимических и ультразвуковых маркеров.

Применение технологии секвенирования нового поколения позволило в 2012 г. впервые расшифровать геном плода по внеклеточной фетальной ДНК в материнской крови на 18 неделе беременности [12]. Любопытным итогом данной работы стало обнаружение у плода 44 мутаций наследственных заболеваний, 39 из которых возникли *de novo* и не могли быть, таким образом, предсказаны по анализу генотипа родителей. Хотя, как признают авторы работы, еще остаются нерешенными многие технические и аналитические вопросы такого подхода, тем не менее неинвазивное исследование наследуемых и вновь возникших геномных вариаций или мутаций, несомненно, будет способствовать прогрессу в области пренатальной диагностики доминантных и рецессивных менделевских болезней.

**Преимплантационная генетическая диагностика.** Перспективным направлением диагностики и профилактики наследственных болезней становится преимплантационная генетическая диагностика. Выполняемая в рамках вспомогательных репродуктивных технологий, она позволяет решить две принципиальные задачи. Во-первых, это позитивное разрешение репродуктивных проблем для супружеских пар с бесплодием, привычным невынашиванием беременности, отягощенным акушерским анамнезом. Технологии экстракорпорального оплодотворения, сопровождаемые преимплантационным генетическим скринингом на наиболее частые хромосомные болезни, повышают вероятность наступления беременности и рождения здорового ребенка. Второй, немаловажный аспект, заключается в том, что методы преимплантационной генетической диагностики открывают уникальные возможности для идентификации мутации у эмбриона еще до наступления беременности, позитивно разрешая многие медицинские и этические проблемы, возникающие при проведении пренатального исследования в случае обнаружения наследственной патологии у плода. Иными словами, преимплантационная диагностика в данном случае выходит за границы вспомогательных репродуктивных технологий и может быть предложена фертильным супружеским парам при наличии определенного риска рождения ребенка с наследственным заболеванием. Согласно данным сайта Института репродуктивной генетики (Чикаго, США), на настоящий момент возможна диагностика около 300 наследственных заболеваний, среди которых имеются и орфанные болезни, и наследственные формы рака, и болезни с поздним проявлением (болезнь Альцгеймера) (<http://reproductivegenetics.com/single-gene-disorder-tested>).

**Лечение орфанных болезней и прецизионная медицина.** Перспективы лечения редких наследственных заболеваний во многом связаны с пониманием фенотипических (клинических) дефектов обуславливающих их генных мутаций. Несомненно, что изучение данных эффектов требует применения адекватных биологических моделей. Такую возможность предоставляют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs), получаемые из дифференцированных соматических клеток пациента и способные в условиях *in vitro* к направленной специализации в любые клеточные типы. Технология получения iPSCs с применением векторов, несущих гены «репрограммирующих» транскрипционных факторов, отмечена Нобелевской премией по физиологии и медицине 2012 г.

Недавно на примере синдрома Дауна, одного из самых распространенных хромосомных заболеваний, была продемонстрирована принципиальная стратегия использования iPSCs для изучения патогенетических механизмов развития наследственных болезней и перспектив их лекарственной терапии [11]. От монозиготных близнецов, один из которых имел трисомию по хромосоме 21, а второй – нормальный кариотип, были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Далее запускали дифференцировку этих клеток *in vitro* в нейрональном направлении. В результате было установлено, что при трисомии 21 имеется сниженное число нейрпрогениторных клеток, отмечаются нарушения плотности нейронов, а также снижение пролиферативной активности клеток и увеличение апоптоза. Анализ дифференциальной экспрессии генов в культурах клеток с трисомией 21 и с нормальным кариотипом продемонстрировал гиперэкспрессию гена тирозинкиназы *DYRK1A*, локализованного в критическом регионе синдрома Дауна на хромосоме 21 и рассматриваемого в качестве кандидатного гена, ассоциированного с умственной отсталостью и нарушениями обучения при данном заболевании. Оказалось, что введение в культуру клеток галлата эпигаллокатехина (одного из основных компонентов экстракта зеленого чая), ингибирующего гиперэкспрессию *DYRK1A*, приводило к нормализации морфологических отклонений в нейронах и к снижению уровня апоптоза в клетках с трисомией 21.

Идентификация причинного генного дефекта при наследственном заболевании и понимание патогенетических механизмов его клинической реализации открывают перспективы развития нового направления в медицине, так называемой «прецизионной медицины», направленной на терапевтическую коррекцию конкретных генных мутаций. Один из первых примеров прецизионной терапии был представлен недавно в отношении муковисцидоза. Данное заболевание является классической иллюстрацией принципа генетической гетерогенности наследственных болезней – в настоящее время описано свыше 1500 мутаций в гене трансмембранного белка *CFTR*. Одна из редких мутаций G551D не приводит к снижению числа белковых каналов в мембране эпителиальных клеток, а лишь нарушает их открытие, что и обуславливает накопление ионов хлора в клетке. В начале 2012 г. Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) одобрило к клиническому применению препарат «Kalydeco» (Ivacaftor, производитель – компания «Vertex

Pharmaceuticals», США), являющийся потенциатором, т.е. корректирующим работу каналов, что позволяет улучшить транспорт ионов хлора у пациентов, носителей мутации G551D. В настоящее время ведутся клинические испытания еще ряда лекарственных препаратов, в том числе VX-809, по всей видимости, защищающего белок *CFTR* от деградации при наличии самой распространенной мутации F508del [13].

**Интерпретация геномных данных.** Своего рода вызовом в современных медико-генетических исследованиях становится интерпретация персонального генома, особенно в аспекте анализа носительства мутаций в генах различных наследственных и онкологических болезней, полиморфных вариантов, определяющих риск развития того или иного многофакторного заболевания, ответа на терапию. Актуальным видится разработка и практическое применение биоинформационных подходов для «клинического» прочтения геномной информации пациента. Показательным примером в этом отношении может служить недавно состоявшееся появление на рынке продукта компании «Knome» (США) – мощного суперкомпьютера, позволяющего сопоставлять данные персонального генома (или нескольких геномов из анализируемой популяции) с референсными последовательностями, хранящимися в различных базах данных ([www.knome.com](http://www.knome.com)).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно мнению одного из первооткрывателей наследственной мутации в гене *CFTR* при муковисцидозе Джека Риордана, «изучение болезни дало науке намного больше, чем наука дает для понимания болезни» (цит. по [19]). Тем не менее в настоящее время мы являемся свидетелями стремительного прогресса в области биомедицинских исследований. Актуальной задачей становится трансляция накапливаемых знаний и новых технологий в практическое здравоохранение с целью диагностики и профилактики как широко распространенных и социально значимых заболеваний, так и орфанных болезней. Медицинской генетике отводится центральная роль в решении данной задачи, в том числе и через оценку груза наследственной патологии в различных популяциях и понимание механизмов его формирования. Однако без развития и должной поддержки медико-генетических исследований, без обеспечения их кадрового и материально-технического потенциала медицинская генетика в России сама может остаться «орфанной» дисциплиной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов А.А. Развитие научных исследований и инфраструктуры в рамках задач платформы «Педиатрия» // Педиатрич. фармакол. 2012. 9. (4). 6–10.
2. Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Наследственные болезни в популяциях человека // Наследственные болезни: национальное руководство / Ред. Н.П. Бочков, Е.К. Гинтер, В.П. Пузырев. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2012. 661–703.
3. Кучер А.Н., Тадинова В.Н., Пузырев В.П. Генетико-демографическая характеристика сельских популяций Республики Алтай: динамика брачной структуры // Генетика. 2005. 41. (2). 261–268.
4. Пальцев М.А., Белушкина Н.Н. Трансляционная медицина – новый этап развития молекулярной медицины // Молек. мед. 2012. (4). 3–6.
5. Пузырев В.П., Максимова Н.Р. Наследственные болезни у якутов // Генетика. 2008. 44. (10). 1317–1324.
6. Салюкова О.А., Назаренко Л.П., Пузырев В.П., Салюков В.Б. Генетико-демографическая характеристика сельских районов и малых городов Томской области // Генетика. 1997. 33. (7). 1005–1011.
7. Barabasi A.-L., Gulbahce N., Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease // Nat. Rev. Genet. 2011. 12. 56–68.
8. Bianchi D.W., Platt L.D., Goldberg J.D. et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing // Obstet. Gynecol. 2012. 119. (5). 890–901.
9. Domazet-Lošo T., Tautz D. An ancient evolutionary origin of genes associated with human genetic diseases // Mol. Biol. Evol. 2008. 25. (12). 2699–2707.
10. Goh K.I., Cusik M.E., Valle D. et al. The human disease network // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. 104. 8685–8690.
11. Hibaoui Y., Grad I., Sailani S.R. et al. Modelling neurogenesis impairment in Down syndrome using induced pluripotent stem cells from monozygotic twins discordant for trisomy 21 // Abstr. 62nd Ann. Conf. Am. Soc. Human Genetics, 6–10 November 2012. San Francisco, 2012. 28.
12. Kitzman J.O., Snyder M.W., Ventura M. et al. Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus // Sci. Transl. Med. 2012. 4. (137). 137ra76.
13. Ledford H. Drug bests cystic-fibrosis mutation // Nature. 2012. (482). 145.
14. Lee I., Lehner B., Vavouri T. et al. Predicting genetic modifier loci using functional gene networks // Genome Res. 2010. 20. 1143–1153.
15. McGary K.L., Park T.J., Woods J.O. et al. Systematic discovery of nonobvious human disease models through orthologous phenotypes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. 107. (14). 6544–6549.
16. Nazarenko L.P., Puzyrev V.P. Hereditary diseases in Siberian populations // Genomics and health in the developing world. Chapter 112. Hereditary diseases among the Yakuts / Ed. D. Kumar. N. Y.: Oxford Univ. Press, 2012. 1323–1354.
17. Papageorgiou E.A., Karagrigoriou A., Tsaliki E. et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 // Nat. Med. 2011. 17. 510–513.
18. Papageorgiou E.A., Patsalis P.C. Non-invasive prenatal diagnosis of aneuploidies: new technologies and clinical applications // Genome Med. 2012. 4. 46.
19. Pearson H. Human genetics: One gene, twenty years // Nature. 2009. 460. 164–169.
20. Tautz D., Domazet-Lošo T. The evolutionary origin of orphan genes // Nat. Rev. Genet. 2011. 12. 692–702.
21. Zhang M., Zhu Ch., Jacomy A. et al. The orphan disease network // Am. J. Hum. Genet. 2011. 88. 755–765.

## **GENETIC LOAD AND ORPHAN DISEASES IN SIBERIAN POPULATIONS**

**Valeriy Pavlovich PUZYREV, Lyudmila Pavlovna NAZARENKO, Igor' Nikolaevich LEBEDEV**

*Institute of Medical Genetics SB RAMS  
634050, Tomsk, Ushaika emb., 10*

---

According to some estimations hereditary diseases account for 20 % among the factors responsible for the level of human population health. Therefore the study of qualitative and quantitative features of the hereditary diseases load is an actual and important issue. Genetic load's estimations allow establishing the priorities of public health care as well as main areas for basic researches. These data provide also possibility to introduce criteria for assessment of resulting effects of therapy and preventive activities.

---

**Key words:** genetic load, ethnospecific and orphan diseases, translational and precision medicine.

*Puzyrev V.P. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, director,  
e-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru*

*Nazarenko L.P. – doctor of medical sciences, professor, vice-director for science and medical work,  
e-mail: ludmila.nazarenko@medgenetics.ru*

*Lebedev I.N. – doctor of biological sciences, head of laboratory of cytogenetics,  
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru*



**БОЛЕЗНЬ КАСТЛЕМАНА С РАЗВИТИЕМ РОЕМС-СИНДРОМА:  
ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ,  
СТРУКТУРЫ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ И КОСТНОГО МОЗГА**

**Анатолий Михайлович МИХАЙЛОВ<sup>1</sup>, Станислав Семенович БЕССМЕЛЬЦЕВ<sup>2</sup>,  
Татьяна Августовна АГЕЕВА<sup>3</sup>, Вадим Валентинович БАЙКОВ<sup>4</sup>,  
Андрей Юрьевич ЗАРИЦКИЙ<sup>5</sup>, Николай Васильевич ИЛЬИН<sup>6</sup>,  
Юрий Александрович КРИВОЛАПОВ<sup>1</sup>, Сергей Владимирович ЛАПИН<sup>4</sup>,  
Владимир Ярославович МЕЛЬНИЧЕНКО<sup>7</sup>, Казимир Марианович ПОЖАРИССКИЙ<sup>6</sup>,  
Татьяна Ивановна ПОСПЕЛОВА<sup>3</sup>, Виктор Иванович РУГАЛЬ<sup>2</sup>,  
Василий Иванович ТРОФИМОВ<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова  
Минздрава России

191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

<sup>2</sup> ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России

191024, г. Санкт-Петербург, 2-я Советская, 16

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России

630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

<sup>4</sup> ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет

им. академика И.П. Павлова Минздрава России

197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8

<sup>5</sup> ФГБУ Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Минздрава России

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

<sup>6</sup> ФГУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Минздрава России

197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70

<sup>7</sup> ФГУ Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова Минздрава России

105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70

---

Представлены результаты анализа клинической картины и данных морфологического и гистохимического исследования биоптатов лимфатических узлов и костного мозга у 14 больных с болезнью Кастлемана. У 7 человек заболевание сопровождалось синдромом РОЕМС, у этих пациентов содержание плазмочитов в ткани лимфатического узла было выше, чем у больных без РОЕМС-синдрома, фактор роста эндотелия сосудов выявлялся в большем числе клеток узла, а также вне клеток, в ткани лимфатических узлов и в крови преобладали  $\lambda$ -цепи иммуноглобулинов. У больных с РОЕМС постоянно выявлялась гипертензия малого круга кровообращения. Эффективность лечения ухудшалась при его позднем начале. Обнаружен один случай отложения амилоида в лимфатическом узле с развитием амилоидной нейропатии, патогенетически сходной с миеломной, и второй случай – с развитием повреждения костей в виде сочетания лизиса и остеосклероза, также прежде описанного при развитии РОЕМС-синдрома у пациентов с множественной миеломой. У всех больных с многоцентриковой формой болезни Кастлемана костный мозг при первичном обследовании был гипоцеллюлярен.

---

**Ключевые слова:** лимфатические узлы, болезнь Кастлемана, РОЕМС-синдром, легочная гипертензия, плазматические клетки, фактор роста эндотелия сосудов, вирус герпеса 8-го типа, амилоидоз, костный мозг.

---

*Михайлов А.М.* – к.м.н., ассистент кафедры факультетской и госпитальной терапии, e-mail: mihailov\_anatolii@mail.ru

*Бессмельцев С.С.* – д.м.н., проф., зам. директора, e-mail: bsshem@hotmail.ru

*Агеева Т.А.* – д.м.н., проф. кафедры патологической анатомии, e-mail: ageta@mail.ru

*Байков В.В.* – д.м.н., проф. кафедры патологической анатомии, e-mail: baikov02@mail.ru

*Зарицкий А.Ю.* – д.м.н., проф., директор

*Ильин Н.В.* – д.м.н., проф., рук. отделения химиотерапии

Болезнь Кастлемана (БК) – редкое и малоизученное заболевание. Его развитие связывают с нарушением цитокинового баланса, в частности с гиперсекрецией IL-6. В части случаев, особенно при плазмноклеточном варианте БК, указывают на ассоциацию с вирусом герпеса человека 8-го типа (HHV-8); белок, продуцируемый вирусом, имеет сходство с IL-6 [5, 7, 9, 10]. Заболевание описано J. Castleman в 1954 г. и носит его имя. Болезнь проявляется либо увеличением одного лимфатического узла (локальная форма), либо множественным поражением различных лимфатических узлов – многоцентровая форма (МБК). При гиалино-ваккулярном варианте БК в лимфоидной ткани обнаруживают обильное развитие сосудистой сети с вращением сосудов в лимфатические фолликулы, гиалинозом стенки сосудов и герминативных центров фолликулов – так называемый симптом «леденца на палочке». При этом лимфоидные клетки периферии фолликула располагаются в виде «луковой шелухи». Для плазмноклеточного варианта характерна фолликулярная гиперплазия с резко суженными мантийными зонами фолликулов, которые окружены скоплениями зрелых плазматических клеток. В большинстве случаев экспрессия легких цепей иммуноглобулинов имеет политипический характер, однако приблизительно в трети случаев наблюдают рестрикцию, обычно в пользу  $\lambda$ -цепи.

Диагностика БК только морфологическая, так как нет симптомов, позволяющих дифференцировать ее от других лимфопролиферативных заболеваний [5, 9, 10]. В ряде случаев необходимо иммуногистохимическое исследование, что позволяет провести дифференциальную диагностику с лимфомами с плазматической дифференцировкой, а также с мантийно-клеточной лимфомой [10].

Повышенная продукция IL-6 обуславливает развитие симптомов В-клеточной интоксикации в виде лихорадки, потливости и потери веса. Избыток продукции IL-6, в случаях многоцентрового поражения, может активировать продукцию фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), который вызывает не только сосудистую гиперплазию лимфатического узла (л/у), но и ак-

тивирует рост новых сосудов в других тканях, особенно в слизистых оболочках, с экссудацией жидкости и развитием особого паракринного синдрома – POEMS (P (polyneuropathy) – полинейропатия, O (organomegaly) – органомегалия, E (endocrinopathy) – эндокринопатия, M – M-протеин в сыворотке крови, S (skin) – изменения кожи в виде развития ангиом и пигментации) [1, 6, 8]. Однако аббревиатура POEMS не отражает его главного клинического диагностического признака – развития без видимой причины полостных или тканевых отеков. Они рефрактерны к повторным полостным эксфузиям и к терапии мочегонными препаратами, так как обусловлены гиперпродукцией VEGF [1, 8]. Считается, что высокая продукция IL-6 при болезни Кастлемана не только активизирует через VEGF неоангиогенез, но и ускоряет трансформацию лимфоцитов в плазматические клетки.

Существует несколько классификаций БК. Согласно одной из них, выделяют клинические варианты – локальный и многоцентровый (мультицентричный) – и гистологические типы – гиалино-ваккулярный, плазмноклеточный и смешанный [10]. В других схемах одновременно учитываются гистологические и клинические варианты: различают гиалино-ваккулярный вариант, плазмноклеточный локализованный и многоцентровую форму (клинический) [5]. Авторы указывают, что многоцентровой форме присуща плазмноклеточная трансформация лимфатического узла с развитием POEMS-синдрома в 60 % случаев. Именно плазмноклеточная экспансия обуславливает такие симптомы POEMS, как полинейропатия и наличие М-градиента в сыворотке крови. Патогенез полинейропатии обусловлен выработкой легких  $\lambda$ -цепей иммуноглобулинов, активизирующих сывороточные протеиназы, которые проникают в нервные волокна и разрушают миелин. Полинейропатия при POEMS носит периферический демиелинизирующий характер и опасна развитием респираторного нейромышечного блока с остановкой дыхания [1, 8]. Органомегалию при POEMS-синдроме следует рассматривать как результат активации VEGF и сочетания сосудистой гиперплазии органа с тканевым отеком. Эндокринопатии носят различ-

---

*Криволапов Ю.А.* – д.м.н., проф. кафедры патологической анатомии

*Лапин С.В.* – к.м.н., зав. лабораторией молекулярной диагностики

*Мельниченко В.Я.* – д.м.н., проф., рук. отделения гематологии и трансплантации

*Пожарисский К.М.* – д.м.н., проф., зав. лабораторией гистохимии

*Поспелова Т.И.* – д.м.н., проф., зав. кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии

*Ругаль В.И.* – д.м.н., проф., зав. морфологическим отделом

*Трофимов В.И.* – д.м.н., проф., зав. кафедрой госпитальной терапии

ный характер, в том числе за счет образования микроангиом гипофиза, о чем нами сообщалось ранее [3]. Редкость и недостаточная изученность проблемы способствовали тому, что отсутствуют единые критерии постановки диагноза РОEMS-синдрома: диагностические критерии значительно отличаются от его названия. Рекомендуется использовать 5 главных критериев: наличие доказанной множественной миеломы или болезни Кастлемана, полинейропатии, увеличение содержания VEGF,  $\lambda$ -цепей и М-протеина в сыворотке крови. Все остальные проявления считаются малыми критериями. Наиболее часто для подтверждения РОEMS-синдрома используют любую комбинацию 2 больших критериев и одного малого, таких как отеки или другие, входящие в аббревиатуру [1, 8]. Таким образом, болезнь Кастлемана и осложняющий ее РОEMS-синдром из-за их редкого проявления исследованы недостаточно, что создает диагностические и лечебные проблемы. В предыдущей публикации [3] подробно описан случай одновременных множественных клинично-функциональных проявлений РОEMS-синдрома у наблюдавшегося больного с МБК.

Цель настоящего исследования – характеристика пациентов с болезнью Кастлемана в зависимости от наличия у них РОEMS-синдрома и структурных особенностей ткани лимфатических узлов и костного мозга как органов, наиболее богатых плазматическими клетками.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 14 больных с болезнью Кастлемана в возрасте от 29 до 62 лет (6 мужчин и 8 женщин). У всех больных диагноз был доказан морфологическим и гистохимическим исследованием операционного биоптата лимфатического узла. У 6 больных МБК было дополнительно проведено гистологическое исследование трепанационных биоптатов костного мозга. У одного пациента трепанобиопсия подвздошной кости осуществлена дважды (до и после длительного курса терапии интерфероном). Все больные предварительно давали добровольное информированное согласие на проведение исследований. У 8 человек была многоцентричная форма БК, у 7 из них установлен РОEMS-синдром, о котором судили по наличию экссудативного перикардита, плеврита или асцита различной степени выраженности, периферических отеков подкожной клетчатки, полинейропатии различной степени тяжести вплоть до нейромышечного респираторного блока. При этом у 4 больных наблюдалось классическое сочетание отечного синдрома

с полинейропатией. Одна пациентка имела изолированную полинейропатию, у 2 человек были только изолированные полостные экссудаты. Органомегалия проявлялась в виде увеличения селезенки и печени при пальпаторном исследовании и была подтверждена методом компьютерной томографии. Об увеличении размеров миокарда судили на основании повышенного индекса массы миокарда (более 130 у всех больных при норме до 125 при автоматическом расчете на ЭХО-кардиографе). Также косвенным ЭХО-кардиографическим методом определяли давление в легочной артерии, чтобы объективизировать влияние полостных экссудатов на сосуды малого круга. К органомегалии было отнесено и увеличение остаточного объема легких без признаков бронхообструкции (у одного больного), для чего была произведена общая плетизмография тела с измерением скоростных показателей вдоха и выдоха.

Наличие вируса герпеса человека 8-го типа выявлялось, в зависимости от клиники, в крови или ликворе с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), которую проводили с помощью наборов Gene Pak DNA PCR-test («Лаборатория Изоген», Россия). Исследование включало 3 этапа: выделение ДНК, проведение амплификации и детекцию ДНК методом электрофореза с бромидом этидия и последующим облучением ультрафиолетовым светом. Из исследуемой сыворотки (ликвора) отбирали 0,1 мл и последующие стадии выделения ДНК проводили согласно инструкции изготовителя. Добавляли 0,3 мл лизирующего раствора, инкубировали в термостате 5 мин при 65 °С, затем центрифугировали 10 с при 5000 об/мин, надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку, добавляли к ней 20 мкл суспензии сорбента Nucleo S и встряхивали на вортексе, после чего отбирали 25 мкл ресуспендированного сорбента и встряхивание повторяли. Далее сорбент осаждали на центрифуге 30 с при 10000 об/мин, супернатант удаляли, осадок трижды промывали готовыми растворами с последующим осаждением и подсушиванием осадка. К осадку добавляли 50 мкл готового буферного раствора и прогревали в термостате 3 мин при 60 °С. После повторного встряхивания и центрифугирования при 12000 об/мин снимали супернатант для последующего проведения ПЦР-амплификации, которую выполняли с одновременной постановкой параллельных отрицательных и положительных контролей на ДНК вируса герпеса человека 8-го типа. Полученный супернатант и готовый ПЦР-растворитель смешивали в равном объеме по 10 мкл и проводили амплификацию по приложенной в инструкции

программе с циклическим прогреванием при различных температурах (всего 47 циклов). Последним этапом была детекция ДНК методом электрофореза в агарозном геле с бромидом этидия: пробу нуклеиновой кислоты из супернатанта наносили в лунку агарозы и проводили электрофорез при 200 В в течение 30 мин. Заключительной стадией была детекция ДНК в ультрафиолетовом свете. Данное исследование также дублировалось иммуногистохимическим определением антигена LANA-1 вируса герпеса человека 8-го типа с соответствующими антителами в ткани лимфатических узлов всех больных. Только одна пациентка с многоцентричной формой болезни Кастлемана не имела ни проявлений POEMS-синдрома, ни присутствия вируса в организме. У всех 6 больных с локализованной формой болезни Кастлемана отсутствовали признаки POEMS-синдрома и инфицированности вирусом.

При гистологическом исследовании в окраске гематоксилином и эозином подсчитывали долю плазматических клеток в клеточной популяции лимфатического узла (при увеличении  $\times 400$ ). При иммуногистохимическом исследовании с помощью соответствующих антител выявляли CD138 (маркер плазмочитов), VEGF, легкие цепи иммуноглобулинов. Иммуногистохимическое исследование было проведено в парафиновых срезах операционного материала толщиной 3 мкм. Демаскировку антигенов осуществляли путем нагревания срезов в цитратном буфере (pH 6,0) или в трис-ЭДТА-буфере (pH 9,0) на водяной бане в течение 30 мин при температуре 95 °С. Использовали первичные моноклональные антитела к VEGF (SP28), готовые к использованию (Neomarkers RTU, США) CD 138 (C1M115) в разведении 1:50 (DAKO, Дания), белку LANA-1 HHV-8 (13B10, Novocastra, Великобритания), поликлональные антитела к легким цепям иммуноглобулинов каппа DAKO (в разведении 1:40000) и лямбда DAKO (в разведении 1:70000). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 30 мин при температуре +20...+22 °С. Затем, после серии отмывок от несвязавшихся антител, срезы инкубировали с системой визуализации Envision (DAKO) в течение 30 мин при температуре +20...+22 °С. Для проявления результатов реакции на срезы наносили хромоген (диаминобензидин) на 5 мин.

Наличие свободных легких  $\lambda$ - и  $\kappa$ -цепей иммуноглобулинов в сыворотке крови и суточной моче определяли иммуноферментным методом, разработанным Центральным научно-исследовательским рентгенорадиологическим институтом (ООО «Полигност», Россия). Метод основан на

использовании моноклональных антител, реагирующих с разными эпитопами легких цепей иммуноглобулинов человека. Одно из антител, распознающих эпитоп, экспрессированный только на свободной легкой цепи и иммобилизованный на твердой фазе, обеспечивает специфический захват антигена, а другое антитело, распознающее легкие цепи как в свободном виде, так и в составе молекулы иммуноглобулина, меченное пероксидазой, выявляет присоединившиеся легкие цепи. Не связавшиеся компоненты анализируемых проб и избыток меченых моноклональных антител удаляются с твердой фазы повторными отмываниями. Активность пероксидазы на твердой фазе определяют по разложению субстрата – перекиси водорода, с трансформацией молекулы хромогена тетраметилбензидаина в производное голубого цвета, количество которого пропорционально ферментативной активности пероксидазы. Реакцию останавливают добавлением серной кислоты, которая меняет цвет содержимого лунок на желтый, и регистрируют результат при помощи спектрофотометра с вертикальным лучом при длине волны 450 нм. Реакция проводится в луночных планшетах. При использовании сыворотки крови в лунки вносят пробы в двух разведениях: 1:100 и 1:1000, при исследовании мочи разведения составляют 1:30 и 1:90. По результатам исследования рассчитывали коэффициент соотношения  $\lambda$ - и  $\kappa$ -цепей в сыворотке крови и в моче. Для диагностики полинейропатии кроме неврологического обследования использовали электронейромиографию (ЭНМГ). Состояние костного мозга оценивали по биоптатам подвздошной кости с фиксацией по Карнуа с окраской азур-эозином. Для уточнения распространенности лимфаденопатии, состояния легких и плевры, перикарда, наличия гепатоспленомегалии использовали метод спиральной компьютерной томографии. Наличие жидкости в полости перикарда оценивали по результатам ЭХО-кардиографии.

Показаниями для лечения больных МБК с развитием POEMS-синдрома служили: выраженные отеки, тяжелая полинейропатия, большой объем увеличенных лимфатических узлов и, самое главное, наличие массивной, в виде пластов, плазмноклеточной инфильтрации ткани узла [1, 8]. Выбор схемы лечения из-за отсутствия общепринятых рекомендаций производился в различных лечебных учреждениях эмпирически, что соответствует и зарубежной практике [8]. Первой линией терапии у четырех из семи больных была схема СНОР-21 (циклофосфан, адриамицин, винкристин, преднизолон) ввиду наличия лим-

фолиферации. У одного из этих пациентов после первого курса СНОР развилась бактериально-микотическая контаминация крови, что потребовало антибактериальной и антимикотической терапии в течение месяца. Данное осложнение в последующем исключило использование цитостатических препаратов, и больной был переведен на лечение ритуксимабом по 375 мг/м<sup>2</sup> (4 еженедельных введения) с последующим курсовым назначением ганцикловира. Годичное наблюдение за пациентом позволило констатировать у него развитие частичного ответа в виде уменьшения размеров лимфатических узлов более чем на 50 % и редукции отека компонента РОEMS. Еще у одного больного после 6 курсов СНОР-21 достигнут полный ответ, он был переведен на поддерживающую терапию интерфероном по 3 млн ЕД 3 раза в неделю, которая проводилась в течение 18 мес. В последующем больной самовольно прекратил лечение. У двух больных добиться эффекта не удалось, что, на наш взгляд, обусловлено поздней постановкой диагноза (3 года). В одном случае проведен лишь один курс СНОР-21, во втором – четыре.

Четвертой пациентке было проведено 3 курса R-СНОР-21 (ритуксимаб + СНОР). Однако, в связи с недостаточной эффективностью и выявлением массивной плазмноклеточной инфильтрации ткани л/у, больная переведена на схему ДНАР (цисплатин, адриамицин, цитозар, винкристин), 2 цикла, с последующей аутологичной трансплантацией периферических стволовых клеток (АТПСК). Еще одна больная в качестве терапии 1-й линии получила 3 цикла РАД (бортезомиб четыре внутривенных инфузии в дозе 1,3 мг/м<sup>2</sup>, даунорубин, дексаметазон) с заготовкой стволовых аутоклеток периферической крови и их трансплантацией. У обеих больных, получивших АТПСК, достигнут полный ответ. Один больной МБК с РОEMS-синдромом, одна больная МБК без развития этого осложнения и все 6 пациентов

с локальной формой болезни Кастлемана лечения не получали.

Результаты исследования были обработаны статистически с расчетом коэффициента согласия Пирсона  $\chi^2$ . Данный статистический метод позволяет определить степень зависимости двух непараметрических величин, а определение значения «р» по специальной таблице с учетом степеней свободы позволяет определить неслучайность их сочетаний в представленной выборке, т. е. данное сочетание должно повторяться и у других исследователей. Для оценки достоверности разницы параметрических критериев (давления в легочной артерии) использовали критерий Стьюдента [2].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании лимфатических узлов у всех больных с наличием РОEMS-синдрома выявлялись либо пласты плазматических клеток в межфолликулярных зонах, либо увеличение содержания плазматических клеток не только в межфолликулярной зоне, но и в мантии фолликулов (не менее 3 % клеточных популяций). Также у 4 пациентов удалось выявить наличие HHV-8 в биоптатах лимфатических узлов, в крови или в ликворе. Обращала на себя внимание высокая активность VEGF в ткани лимфатических узлов у 7 больных не только в эндотелии сосудов, но и в других клетках л/у, а также в межклеточном пространстве.

Из представленных в табл. 1 данных видно, что наличие симптомов РОEMS-синдрома у больных с многоцентрической формой болезни Кастлемана достоверно связано с увеличением общего содержания плазматических клеток в лимфатическом узле и продукции  $\lambda$ -цепей иммуноглобулинов, а также с высоким содержанием VEGF в ткани л/у (рис. 1). Достоверность связи симптомов РОEMS-синдрома с присутствием в организме

Таблица 1

Зависимость развития РОEMS-синдрома у больных многоцентрической болезнью Кастлемана от клеточного состава лимфатических узлов, экспрессии в них VEGF и соотношения легких цепей иммуноглобулинов

	Плазмоциты в лимфоузле > 3 %	Наличие вируса HHV8	Соотношение цепей иммуноглобулинов $\lambda \geq \kappa$	Экспрессия VEGF в более 30 % клеток л/у и внеклеточно
Больные МБК с РОEMS (n = 7)	7 человек	4 человека	7 человек	7 человек
Больные МБК без РОEMS (n = 7)	0	0	0	0
Критерий согласия $\chi^2$	49 (p < 0,01)	5,6 (p > 0,95)	49 (p < 0,01)	49 (p < 0,01)

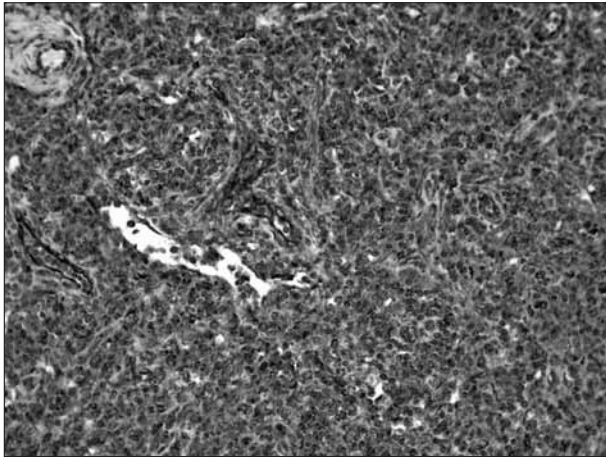


Рис. 1. Экспрессия VEGF в цитоплазме большинства клеток и внеклеточно в ткани лимфатического узла при МК с POEMS-синдромом. Иммуногистохимическая реакция,  $\times 400$

вируса герпеса 8-го типа доказать не удалось, что, вероятно, обусловлено небольшим числом больных, вошедших в исследование, и субоптимальным качеством части исходного материала.

У пяти пациентов с отечным синдромом обнаружено повышение давления в легочной артерии – оно составило  $47,4 \pm 11,3$  мм рт. ст., в то время как у 10 здоровых лиц контрольной группы –  $16,8 \pm 3,2$  мм рт. ст. ( $p \leq 0,05$ ). Это феномен свидетельствовал о системном влиянии VEGF на задержку жидкости в организме и о вторичном развитии легочной гипертензии при POEMS-синдроме [1, 8].

При исследовании трепанобиоптатов подвздошных костей у всех шести больных МК, подвергшихся этой процедуре, была выявлена первично низкая клеточность костного мозга. Больным с локальной формой болезни Кастлемана данная процедура не проводилась из-за отсутствия клинических оснований.

Результаты лечения больных МК с развитием POEMS-синдрома и варианты ответов, а также особенности случаев терапии представлены в табл. 2. Оценку ответа на терапию проводили с использованием критериев, рекомендованных экспертами ВОЗ для больных с неходжкинскими лимфомами: полный ответ, частичный ответ, стабилизация, рецидив, прогрессирование [4].

В проведенном исследовании многоцентровая болезнь Кастлемана осложнилась развитием POEMS-синдрома в 7 случаях из 8, которое сочеталось с увеличением количества плазматических клеток в ткани лимфатического узла, преобладанием продукции легкой цепи лямбда, гиперпродукцией фактора роста эндотелия сосудов. У одного больного обнаружено сочетанное

развитие POEMS-синдрома с амилоидозом при монотипии свободной  $\lambda$ -цепи иммуноглобулинов в ткани узла и в крови (соотношение  $\lambda:k = 10:1$ ), но с ее отсутствием в суточной моче. Отложение амилоида было обнаружено в перинодулярной ткани при окраске Конго-рот с исследованием в поляризованном свете. При этом клинические черты амилоидной нейропатии и ее патогенетические механизмы имели сходство с подобным осложнением при множественной миеломе. Одновременно у больного был диагностирован нефротический синдром с суточной потерей 6 г белка и почечная недостаточность со снижением клубочковой фильтрации по клиренсу креатинина до 30 мл/мин, что указывало на системность амилоидоза с вовлечением почек. У другого больного (Г.) наличие в крови М-протеина в сочетании с повышенным содержанием плазматических клеток в ткани лимфатического узла и гиперпродукцией VEGF проявилось комплексным повреждением костной ткани, сочетавшим 2 процесса: остеолитический и интенсивную оссификацию (рис. 2), что описано ранее при множественной миеломе [8]. Это указывает на сходство патогенеза POEMS-синдрома при множественной миеломе [8] и при МК. Костная патология у пациента Г. имела патогенетические черты, идентичные множественной миеломе, что соответствовало изменениям морфологии и функциональным свойствам плазматических клеток.

Позднее начало лечения привело к смерти двух больных (Г. и А.). Клинической особенностью пациента Г. было развитие фатального респираторного нейро-мышечного блока. Потенциалы ЭНМГ с дыхательной мускулатуры не зарегистрированы, спонтанная дыхательная активность отсутствовала, и больной скончался через 127 суток нахождения на ИВЛ. Больной А. также скончался от прогрессирующей демиелинизирующей сенсорно-моторно-болевой полинейропатии с развитием полной адинамии. Пациентка Г-ва, получившая 3 курса R-СНОР-21 и 2 курса интенсивной химиотерапии по схеме ДНАР с АТПСК, сохраняет полный ответ в течение 4 лет. Быстрая смена достигнутого полного ответа после 3 циклов РАД и АТПСК на прогрессирование МК и POEMS у больной Ц-вой была обусловлена, вероятно, распространением вируса в центральной нервной системе (вирус у нее был выделен из ликвора) в органе, в который цитостатические препараты не проникают. У пациента Е-ва курс цитостатической терапии способствовал, на фоне имевшейся вирусемии, развитию бактериально-микотической контаминации крови. Это исключило повторное лечение

Таблица 2

Лечение, его эффективность и клинические особенности многоцентричной формы болезни Кастлемана при развитии у больных РОЕМС-синдрома

Больной	Гистологический тип изменений л/у	Состояние до начала лечения	Схема лечения	Ответ и его длительность	Особенности случая
Г.	Смешанный	Тяжелое	СНОР-21 (один курс)	Не достигнут, исход – смерть	М-протеин, нейромышечный респираторный блок, остеосклероз с остеолитом, экссудативный плеврит и перикардит, гнойный бронхит
А.	Плазмноклеточный	Тяжелое	СНОР-21 (4 курса)	Не достигнут, исход – смерть	Амилоид в ткани л/у, почечная недостаточность, экссудативный плеврит, перикардит, сенсорно-моторно-болевая нейропатия. В крови свободные цепи, $\lambda/\kappa = 10/1$
С.	Смешанный	Тяжелое	6 курсов СНОР-21 с поддержкой интерфероном	Полный ответ, который сохранялся в течение 18 мес.	Рецидив через месяц после отмены интерферона. Появление эозинофилов в ткани л/у. Гранулема в костном мозге из эозинофилов и эпителиоидных клеток
Г-а	Плазмноклеточный	Тяжелое	3 курса R-СНОР-21, 2 курса ДНАР – АТПСК	Полный ответ с нормализацией размеров узлов в течение 3 лет	Рецидив, проявившийся экссудацией в полость плевры и брюшины
Ц.	Плазмноклеточный	Тяжелое	3 курса РАД с АТПСК	Полный ответ в течение 6 мес. В последующем курс многопольной лучевой терапии	Наличие вируса в спинном ликворе. Инвалидизирующая полинейропатия, ангиоматоз кожи. Гистохимически – $\lambda/\kappa = 10/1$
Е-в	Смешанный	Тяжелое	1 курс СНОР с последующим введением ритуксимаба по 375 мг/м <sup>2</sup>	Частичный ответ, который сохраняется 12 мес.	Сочетание вирусемии HHV8 с развитием контаминации крови <i>B. acinetobacter</i> и наличием в крови ДНК актиномицетов
А-в	Смешанный	Средней тяжести	Специфическая терапия не проводилась	Сохраняется постоянная лимфаденопатия	Обнаружен HHV8 в ткани лимфоузла

по схеме СНОР, а частичный ответ со стороны л/у и проявлений РОЕМС был достигнут с использованием ритуксимаба с последующим назначением курса ганцикловира. Ответ сохраняется год, наблюдение за больным продолжается. В то же время использование для лечения РОЕМС и вирусемии у пациента С. последовательного назначения 6 курсов СНОР-21 с 18-месячным введением интерферона способствовало сохранению полной ремиссии в течение 4 лет с контрольным негативным исследованием на наличие HHV8 в крови. После прекращения введений интерферона возник рецидив МБК, вирусемии и симптомов

РОЕМС-синдрома. Костный мозг у всех обследованных больных с МБК, независимо от развития РОЕМС-синдрома и вирусемии, еще до начала лечения имел сниженную клеточность.

Без лечения наблюдались два человека. Больной МБК с развитием РОЕМС, единственный, у которого вирус был обнаружен в ткани л/у (рис. 3), находится в состоянии стабилизации 3 года. Лечение не получал из-за отказа. Возможно, что эта стабильная лимфаденопатия без вирусемии явилась результатом адекватного ответа иммунной системы на вирус, который не вышел за пределы иммунной системы.

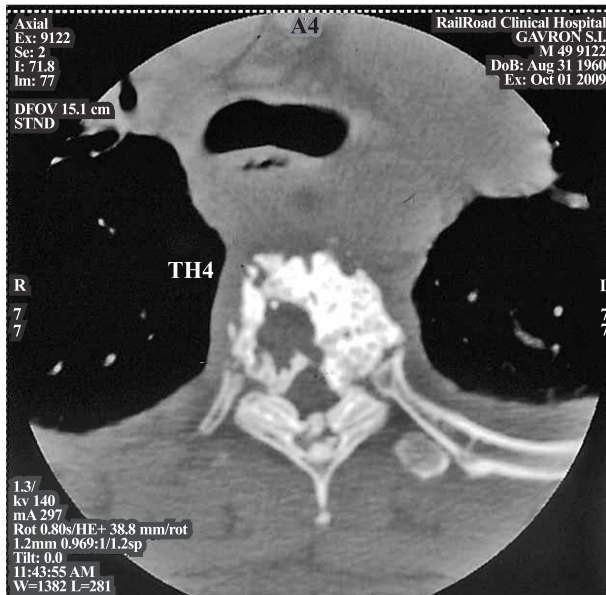


Рис. 2. Компьютерная томограмма 4 грудного позвонка у больного Г. Коаксиальная проекция. Сочетание остеосклероза и остеолитиза

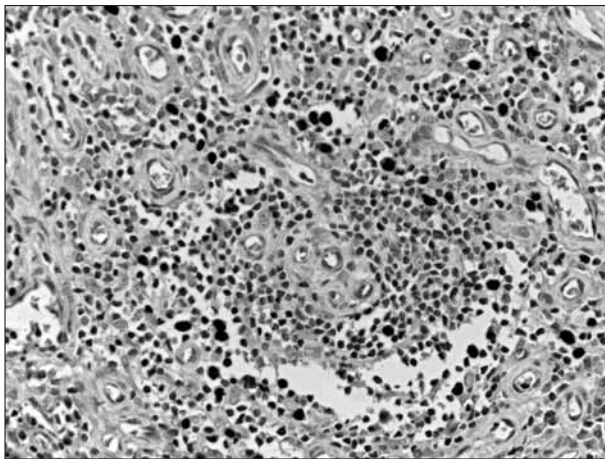


Рис. 3. Экспрессия HHV-8 LNA в ядрах клеток лимфатического узла при БК с POEMS-синдромом. Иммуногистохимическая реакция, × 400

Восьмая больная МБК, без развития POEMS и без наличия вируса, не получавшая лечения также из-за отказа, наблюдается в течение 3 лет. При очередном обследовании у нее обнаружено прогрессирование заболевания из локальной формы в многоцентровую. Решается вопрос о начале терапии.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о морфологических и гистохимических особенностях развития POEMS-синдрома и его отдельных симптомов у пациентов с многоцен-

тровой болезнью Каствлемана, зависевших от количества и функциональных свойств плазматических клеток в лимфатических узлах. Возможно, что присутствие HHV-8 в организме только этих больных и дополнительная продукция им белка, сходного по структуре с ИЛ-6, способствовали увеличенному содержанию плазматических клеток в ткани лимфатического узла, усиленной продукции VEGF и повышению его содержания в межклеточном пространстве с развитием полостных экссудатов и отеков подкожной клетчатки, а также легочной гипертензии. Это делает необходимым раннее использование цитостатической терапии для лечения POEMS-синдрома и противовирусной терапии у этих больных, на что указывают и другие авторы [8]. Отсутствие патогенетической и этиотропной терапии способствует прогрессированию заболевания с летальным исходом. Терапия интерфероном может оказать специфическое воздействие на костный мозг больных в виде развития гранулем.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клодзинский А.А., Рыжко В.В., Соркина О.М. и др. POEMS-синдром (описание наблюдения и обзор литературы) // Клинич. онкогематол. 2008. 2. 148–155.
2. Каминский Л.С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных. Л.: Медицина, 1964. 204 с.
3. Михайлов А.М., Бессмельцев С.С., Пожарисский К.М. и др. Болезнь Каствлемана и POEMS-синдром // Клинич. онкогематол. 2010. 3. 259–269.
4. Поддубная И.В. Неходжкинские лимфомы // Клиническая онкогематология / Ред. М.А. Волкова. М.: Медицина, 2007. 724–770.
5. Райт Д., Леон Э., Эддис Б. Морфологическая диагностика патологических лимфатических узлов. М.: Медицина, 2008. 20–27.
6. Bardwick P.A., Zvailer N.Y., Gill G.N. Plasma cell dyscrasia with polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein and skin changes: the POEMS syndrome. Report on two cases and a review of the literature // Medicine (Baltimore). 1960. 4. 311–322.
7. Belec L., Mohamed Ali S., Antier F.-J. et al. Human herpes virus 8 infection in patient with POEMS syndrome associated multicentric Castleman disease // Blood. 1999. 93. (11). 3643–3653.
8. Dispenziery A. POEMS syndrome // Blood Rev. 2007. 21. (5). 285–299.
9. Knowles D.M. Neoplastic Hematology. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 546–549.
10. Young N.S., Gerson S.L., High K.A. Clinical hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 322–324.



## **CASTLEMAN'S DISEASE WITH POEMS SYNDROME: CLINICAL AND HISTOPATHOLOGICAL FEATURES WITH REGARD TO LYMPH NODES AND BONE MARROW**

**Anatoliy Mikhailovich MIKHAILOV<sup>1</sup>, Stanislav Semenovich BESSMELTSEV<sup>2</sup>,  
Tatiana Avgustovna AGEeva<sup>3</sup>, Vadim Valentinovich BAYKOV<sup>4</sup>, Andrey Yurievich ZARITSKIY<sup>5</sup>,  
Nicolay Vasil'evich IL'IN<sup>6</sup>, Yuriy Aleksandrovich KRIVOLAPOV<sup>1</sup>, Sergey Vladimirovich LAPIN<sup>4</sup>,  
Vladimir Yaroslavovich MELNICHENKO<sup>7</sup>, Kazimir Marianovich POZHARISSKIY<sup>6</sup>,  
Tatiana Ivanovna POSPELOVA<sup>3</sup>, Viktor Ivanovich RUGAL<sup>2</sup>, Vasiliy Ivanovich TROFIMOV<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov of Minzdrav of Russia  
191015, Saint Petersburg, Kirochnay str., 41*

<sup>2</sup> *Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia  
191024, Saint Petersburg, 2nd Sovetskay str., 16*

<sup>3</sup> *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

<sup>4</sup> *Saint Petersburg State Medical University n.a. I.I. Pavlov of Minzdrav of Russia  
197022, Saint Petersburg, Lev Tolstoy str., 6/8*

<sup>5</sup> *Federal Center of Heart, Blood and Endocrinology n.a. V.A. Almazov of Minzdrav of Russia  
197341, Saint Petersburg, Akkuratov str., 2*

<sup>6</sup> *Russian Research Centre of Radiology and Surgical Technologies of Minzdrav of Russia  
197758, Saint Petersburg, village Pesochnyy, Leningradskay str., 70*

<sup>7</sup> *National Medical Surgical Center n.a. N.I. Pirogov of Minzdrav of Russia  
105203, Moscow, Nizhnyaya Pervomayskaya str., 70*

---

Clinical aspects and histopathological features of lymph nodes and the bone marrow were studied in 14 patients with Castleman's disease. Seven patients were complicated with POEMS syndrome. As compared with those without POEMS, patients with POEMS had higher plasma cell number in the lymph nodes involved,  $\lambda$ -chain preponderance both by immunohistochemistry and free light chain assay and extensive production of VEGF. Pulmonary hypertension appeared to be a constant finding in patients with POEMS. Delayed start of treatment had adverse effect on prognosis. Pathogenesis of amyloidosis and bone lesions in MCD has much in common with that in multiple myeloma. Amyloid deposits may affect lymph nodes and lead to amyloid neuropathy. Bone lesions manifest with combination of lysis and sclerosis. Bone marrow in all patients with multicentric form of Castleman's disease was hypocellular at presentation, interferon treatment induced epithelioid granulomas in the bone marrow.

---

**Key words:** lymph node, Castleman's disease, POEMS-syndrome, pulmonary hypertension, plasma cells, VEGF, herpes virus type 8, amyloidosis, bone marrow.

*Mikhaylov A.M. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for faculty and hospital therapy,  
e-mail: mihailov\_anatolii@mail.ru*

*Bessmeltsev S.S. – doctor of medical sciences, professor, deputy director, bsshem@hotmail.ru*

*Ageeva T.A. – doctor of medical sciences, professor of the chair for pathology. e-mail: ageta@mail.ru*

*Baykov V.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for pathology, e-mail: baikov02@mail.ru*

*Zaritskiy A.Yu. – doctor of medical sciences, professor, director*

*Il'in N.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the department for hemotherapy*

*Krivolapov Yu.A. – doctor of medical sciences, professor of chair for pathology*

*Lapin S.V. – candidate of medical sciences, head of laboratory of molecular diagnostic*

*Melnichenko V.Ya. – doctor of medical sciences, professor, head of the hematology and transplantation department*

*Pozharisskiy K.M. – doctor of medical sciences, professor, head of histochemical laboratory*

*Pospelova T.I. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for therapy, hematology and transfusiology*

*Rugal V.I. – doctor of medical sciences, professor, head of morphological department*

*Trofimov V.I. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for hospital therapy*

**СЛУЧАЙ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ С СОЧЕТАНИЕМ *bcr/abl*-ТРАНСЛОКАЦИИ И МУТАЦИИ ГЕНА *Jak2 V617F***

**Галина Анатольевна ГУСАРОВА, Елена Александровна СЕМЕНОВА,  
Манана Александровна СОКОЛОВА, Анастасия Витальевна БЫКОВА,  
Анна Григорьевна ТУРКИНА**

*ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России  
125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4а*

В статье представлен редкий случай сочетания двух молекулярных дефектов, а именно обнаружение транскрипта *bcr/abl* и мутации *Jak2 V617F* у больного 67 лет. Изначально был установлен диагноз Ph<sup>+</sup> хронического миелолейкоза, гранулоцитарно-мегакариоцитарный вариант по данным трепанобиопсии. В ходе начатого лечения обращало на себя внимание быстрое подавление Ph-позитивного клона со стабильными полными цитогенетическим и молекулярным ответами при отсутствии гематологической ремиссии, а также при сохраняющейся спленомегалии. Наличие у больного биклонального миелопролиферативного заболевания (хронического миелолейкоза и идиопатического миелофиброза) было подтверждено лишь спустя 5 лет терапии иматинибом: выявлен очаговый миелофиброз костного мозга, а при молекулярно-генетическом исследовании обнаружена мутация *Jak2 V617F*, что послужило поводом к смене терапии. Приведен краткий обзор зарубежных литературных данных о частоте встречаемости подобных случаев сочетания *bcr/abl* и *Jak2 V617F*. В большинстве случаев общим феноменом было быстрое подавление Ph-позитивного клона при терапии ингибиторами тирозинкиназ как более «слабого» по отношению к активации *Jak2 V617F*, что также было показано двумя группами авторов в ходе эксперимента при анализе эритроидных и гранулоцитарно-макрофагальных колоний, выращенных на метилцеллюлозе. Актуальным также является вопрос, не является ли обнаружение в трепанобиоптате при хроническом миелолейкозе выраженной пролиферации мегакариоцитарного ростка с наличием гигантских уродливых форм, наличием фиброза, признаком второго, Ph-негативного хронического миелопролиферативного заболевания. Обсуждаются вопросы выбора оптимальной тактики терапии подобных состояний.

**Ключевые слова:** хронический миелолейкоз, хронические Ph-негативные миелопролиферативные заболевания, идиопатический миелофиброз, *bcr/abl*, *Jak2 V617F*.

В последние годы множество открытий в области молекулярной генетики привели к пониманию патогенетических основ значительного числа онкологических заболеваний, к созданию препаратов направленного молекулярного действия, произведших кардинальный переворот в прогнозе и самой биологии заболеваний, при которых они оказались эффективны.

Но нередко бывает, что понимание ключевого механизма патогенеза той или иной болезни затрудняют случаи, не укладывающиеся в только что сложившуюся и казавшуюся безупречной картину.

В качестве примера одного из таких феноменов можно привести сочетание в гемопозитических клетках одного больного транслокации (9; 22), патогномоничной для хронического миелолейкоза (ХМЛ), и мутации гена *Jak2 V617F*, роль которой с 2005 г. считается ключевой в развитии Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваний (ХМПЗ).

ХМЛ – заболевание, как будто специально созданное природой как модель для изучения онкогенеза: одна генетическая поломка – один химерный ген, кодирующий онкопротеин, вызы-

*Гусарова Г.А.* – к.м.н., старший научный сотрудник научно-консультативного отделения химиотерапии миелопролиферативных заболеваний, e-mail: galina1966@bk.ru

*Семенова Е.А.* – к.м.н., старший научный сотрудник патолого-анатомического отделения

*Соколова М.А.* – к.м.н., старший научный сотрудник научно-консультативного отделения химиотерапии миелопролиферативных заболеваний

*Быкова А.В.* – аспирант научно-консультативного отделения химиотерапии миелопролиферативных заболеваний

*Туркина А.Г.* – д.м.н., проф., зав. научно-консультативным отделением химиотерапии миелопролиферативных заболеваний

вающий трансформацию нормальной стволовой кроветворной клетки в опухолевую [1].

ХМПЗ – заболевания с более сложным, не до конца расшифрованным патогенезом. Открытие соматической мутации гена *Jak2*, приводящей к замене валина на фенилаланин в кодоне 617 полипептидной цепи тирозинкиназы JAK2 (V617F), казалось, дало ключ к пониманию патогенеза ХМПЗ. Данная мутация приводит к потере инактивирующей активности кодона JH1 и, следовательно, к повышению активности кодона JH2, транскрипционных факторов STAT 5, 3 и 1 и, в итоге, к избыточной, независимой от экзогенной цитокиновой стимуляции, продукции тех или иных зрелых клеток крови [2]. Но, к сожалению, мутация *Jak2* V617F не стала такой же патогномоничной ни для одной из форм ХМПЗ, как транслокация (9; 22) для ХМЛ. Это относится даже к истинной полицитемии, при которой данная мутация выявляется у 95 % больных.

Несмотря на открытие мутации *Jak2* V617F, а также мутаций в 12 экзоне этого гена, гена MPL (W515A,L и др.), LNK, мутаций в эпигенетических регуляторах (TET2, IDH 1/2, DNMT3A, ASXL1, EZH2 и др), остается множество нерешенных вопросов.

– Феномен «одна мутация – три нозологические формы» остается не до конца объясненным. Исследования в этом направлении дали несколько теорий, но ни одна из них не стала пока аксиомой.

– Мутация гена *Jak2* V617F встречается не только при трех Ph-негативных ХМПЗ (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, хронический идиопатический миелофиброз), но и при других миелоидных неоплазмах [3].

– Каков патогенез тех ХМПЗ, при которых не выявляется мутация гена *Jak2* V617F, – примерно 5 % больных с истинной полицитемией, 30–40 % – с эссенциальной тромбоцитемией, 50–60 % – с хроническим идиопатическим миелофиброзом.

В нашем центре мы наблюдаем четырех пациентов с сочетанием BCR/ABL- и JAK2 V617F-позитивных клонов. Приводим один из клинических случаев.

#### Пациент М, 67 лет.

В декабре 2003 г. при ультразвуковом исследовании брюшной полости выявлено увеличение селезенки (150×83 мм), печени до +2 см из-под реберной дуги. В анализе крови на тот момент наблюдался небольшой лейкоцитоз –  $13,7 \times 10^9/\text{л}$ . В течение года к гематологу не обращался, соответственно, никакого лечения не получал.

В марте 2004 г. проведено комплексное обследование.

Клинический анализ крови 02.03.04: содержание гемоглобина (Hb) 131 г/л, эритроцитов (эр)  $4,47 \times 10^{12}/\text{л}$ , тромбоцитов (тр)  $141 \times 10^9/\text{л}$ , лейкоцитов (л)  $16,4 \times 10^9/\text{л}$ , миелоцитов (мц) 3 %, палочкоядерных нейтрофилов (п/я) 2 %, сегментоядерных нейтрофилов (с/я) 61 %, эозинофилов (э) 2 %, базофилов (б) 2 %, моноцитов (м) 12 %, лимфоцитов (лф) 18 %, СОЭ 4 мм/ч.

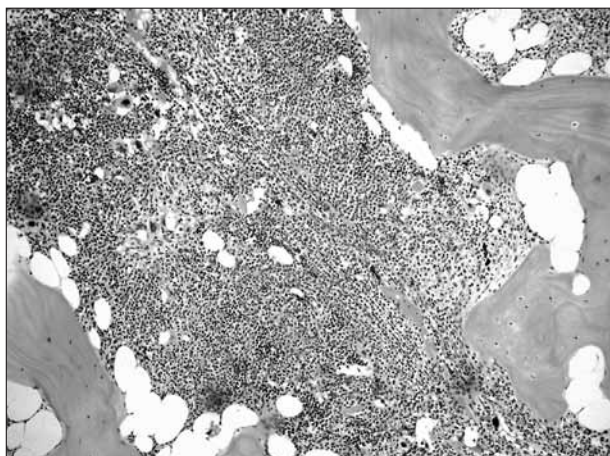
Миелограмма 18.03.04: содержание бластов 1 %, мц 1 %, п/я 6 %, с/я 66 %, э 2 %, б 1 %, м 6 %, ретикулярных клеток 17 %, эритробласты 7 %, количество кариоцитов резко уменьшено.

Цитогенетическое исследование 18.03.04: митозов не обнаружено. Методом FISH выявлено 55 % BCR/ABL-позитивных ядер из 200 проанализированных.

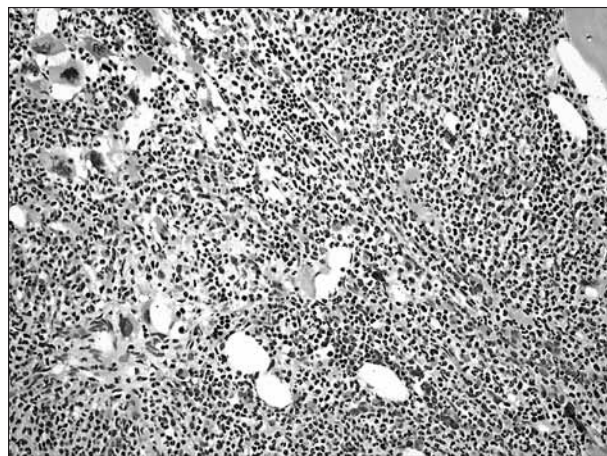
Гистологическое исследование костного мозга 22.03.04: костные балки не утолщены, с признаками гладкой резорбции и с очаговым новообразованием в виде напластований остеоида на старую кость, пролиферации остеобластов; костно-мозговые полости широкие; жировой костный мозг существенно редуцирован – сохранены лишь небольшие группы липоцитов, преимущественно вдоль костных трабекул; ядродержащие клетки лежат довольно плотно; резко гиперплазирован гранулоцитарный росток, представлен преимущественно зрелыми формами, существенно увеличено количество мегакариоцитов, среди них преобладают микроформы, но есть уродливые клетки обычных размеров, расположены мегакариоциты поодиночке, группами и единичными мелкими кластерами возле синусов в центральных отделах полостей; элементы эритроидного ростка выявляются в немного сниженном количестве, видны небольшие очажки фиброза в участках расположения кластеров мегакариоцитов; синусы слегка расширены, заполнены кровью. Заключение: хронический миелолейкоз, гранулоцитарно-мегакариоцитарный вариант (рис. 1 и 2) (по классификации, разработанной в ГНЦ [4]).

На основании полученных данных был установлен диагноз: хронический миелолейкоз, хроническая фаза.

В течение 9 месяцев после установления диагноза проводилось лечение препаратами  $\alpha$ -интерферона. Полного гематологического ответа не достигнуто – сохранялся умеренный лейкоцитоз (л до  $16 \times 10^9/\text{л}$ ), миелоцитарный сдвиг, тромбоцитоз (тр до  $500 \times 10^9/\text{л}$ ), спленомегалия. Интересно, что еще до начала лечения глиевком был зафиксирован полный цитогенетический ответ (ПЦО) и полный молекулярный ответ (ПМО), однако гематологический ответ так и не



**Рис. 1.** Трепанобиоптат подвздошной кости в 2004 г. Гематоксилин-эозин.  $\times 100$ . Признаки несовершенного остеогенеза в виде наложений остеоида на старую кость. Редукция жирового костного мозга – сохранены лишь отдельные липоциты. Ядродержащие клетки лежат рыхловато. Видны группы и кластеры атипичных мегакариоцитов



**Рис. 2.** Фрагмент того же препарата.  $\times 200$ . Резко преобладают элементы гранулоцитопоэза. Среди мегакариоцитов преимущественно микроформы

был достигнут, отмечалось нарастание анемии, тромбоцитоза, активности лактатдегидрогеназы. В марте 2005 г. начата терапия гливеком по 400 мг/сут, но клинико-гематологическая картина не изменилась, отмечалось нарастание анемии (Hb 105–109 г/л), тромбоцитоза (тр 483–564  $\times 10^9$ /л). Состояние было расценено как резистентность, в связи с чем через год от начала лечения гливеком доза последнего была увеличена до 600 мг/сут. Улучшения гематологических показателей, уменьшения размеров селезенки не достигнуто. Отмечено резкое нарастание анемии до 2–3 степени (Hb 79–82 г/л), что было расценено как гематологическая токсичность, доза гливека снижена вновь до 400 мг/сут. Терапия гливеком продолжалась до 2010 г., т.е. в течение 5 лет. За все это время сохранялись ПЦО и ПМО, но в течении болезни наметилась тенденция к прогрессии – увеличение размеров селезенки (179 $\times$ 100 мм), появление эпизодов немотивированного субфебрилитета, сохранялись лейкоцитоз (л (15–17) $\times 10^9$ /л) с миелоцитарным сдвигом, тромбоцитоз (тр (430–500) $\times 10^9$ /л), повышение активности лактатдегидрогеназы. Это послужило основанием для дополнительного обследования. 24.08.10 повторно выполнена трепанобиопсия: костные балки правильной формы, с признаками рассасывания и выраженной очаговой остеобластической реакцией. Полости широкие. Жировые клетки распределены очень неравномерно: в части полостей единичные, в некоторых содержание увеличено. Строма отечная, с множественными очагами огрубения. Миелокариоциты

лежат очень рыхло, их содержание крайне мало. Выявляются отдельные мелкие группы эритрокариоцитов, среди которых относительно много молодых, есть мегалоидные формы. Обнаруживаются отдельные созревающие гранулоциты, отдельные мегакариоциты мелкие и плеоморфные. Сохранившиеся синусы расширены, склерозированы, просветы их пусты. Число капилляров очагово увеличено. Заключение: картина трепаната не поддается однозначной трактовке, четких признаков какого-либо заболевания системы крови нет, выявлены очаговый миелосклероз и опустошение костного мозга неясного генеза. При сопоставлении с результатами исследования первого трепанобиоптата сделано заключение о развитии остеомиелосклероза в исходе миелопролиферативного заболевания.

Впервые было высказано предположение о наличии у больного биклонального миелопролиферативного заболевания – хронического миелолейкоза и идиопатического миелофиброза (сублейкемического миелоза), что было подтверждено при молекулярно-генетическом исследовании методом качественной ПЦР от 16.09.10 – выявлена мутация *Jak2* V617F. Мутаций в 12 экзоне гена *Jak2*, гене *MPL-1* не выявлено. При количественной ПЦР экспрессия мутантного гена составила 87,5 %. Все ПЦР-исследования проводились с помощью коммерческих наборов «Интерлабсервис».

Исходя из наличия стабильного полного молекулярного ответа (отрицательный результат ПЦР-исследования на наличие *bcr/abl*-транскрипта в течение более 1,5 лет) и прогрессии сублейкемического миелоза (увеличение селезенки до 8–10 см из-под ребра, нарастание анемии, симптомы интоксикации), принято решение о смене

терапии. Гливек был отменен с целью назначения адекватных доз гидроксимочевины. В связи с тромбоцитопенией не удавалось проводить лечение гидреа в дозах более 0,5–1 г/сут. На этом фоне достигнута частичная клинико-гематологическая ремиссия (нормализация гемограммы, уменьшение размеров селезенки), уменьшение количества *Jak2* V617F-положительных клеток в костном мозге (до 45,5 %). С июля 2012 г. в связи с сохраняющейся спленомегалией, увеличением содержания *Jak2* V617F-клеток (до 81,5 %), больной переведен на терапию рофероном А в дозе 3 млн МЕ 2 раза в неделю, продолжающуюся по настоящее время. На этом фоне достигнута полная клинико-гематологическая ремиссия. В гемограмме 08.08.12: Нб 139 г/л, эр  $4,29 \times 10^{12}/л$ , тр  $223 \times 10^9/л$ , л  $8,6 \times 10^9/л$ , п/я 7 %, с/я 74 %, э 1 %, б 0 %, м 7 %, лф 11 %, СОЭ 2 мм/ч. Селезенка уменьшилась в размерах (до 5–6 см из-под ребра). Проводится ПЦР-мониторинг уровня *bcr/abl* каждые 3 месяца – сохраняется полный молекулярный ответ.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

На примере данного клинического случая видны сложности диагностики и отсутствие общих подходов к лечению подобных состояний. Так, уже на первом этапе у пациента имело место несколько не типичных для ХМЛ особенностей: отсутствие прогрессии заболевания при неблагоприятном (гранулоцитарно-макрофагальном) варианте течения ХМЛ [4], в том числе в течение года без лечения, довольно низкий для «нелеченного» ХМЛ процент BCR/ABL-позитивных ядер при FISH-исследовании; изменения в трепатобиоптате (фиброз, новообразование кости, дисплазия мегакариоцитов), более характерные для сублейкемического миелоза.

Мы видим, что, несмотря на очень быструю элиминацию Ph-позитивного клона, что было доказано повторными цитогенетическими и молекулярными исследованиями, отсутствие нормализации показателей крови и размеров селезенки было расценено врачами, ведущими больного, как проявление гематологической резистентности, в связи с чем было принято решение о повышении дозы гливека. Развившаяся анемия была расценена как гематологическая токсичность гливека, что привело к отсрочке назначения гидроксимочевины, показанной при прогрессии сублейкемического миелоза. Таким образом, правильный диагноз был установлен лишь через 5 лет после дебюта заболевания.

В зарубежных публикациях нам встретилось несколько описаний клинических случаев соче-

тания *bcr/abl* и *Jak2* V617F [5–15]. По-видимому, впервые описан случай развития ХМЛ у пациента с истинной полицитемией в 1990 г. [5]. В четырех случаях вначале был установлен диагноз ХМПЗ, затем присоединялись клинические признаки ХМЛ и обнаруживался *bcr/abl*-транскрипт. В остальных 6 случаях молекулярные маркеры обоих заболеваний выявлялись одновременно на момент установления диагноза (чаще всего для этого требовалось обнаружение мутации *Jak2* V617F ретроспективно, в сохранявшихся с момента дебюта заболевания образцах). В подавляющем большинстве случаев, где указывался ответ на лечение ингибиторами тирозинкиназ, как и у 3 наших пациентов (в одном случае ответ оценивать рано), общим феноменом было быстрое подавление Ph-позитивного клона со стабильными ПЦО и ПМО. Это позволяло назначать адекватную дозу гидроксимочевины для лечения ХМПЗ. Лишь в одном случае потребовалось повторное кратковременное назначение гливека в связи с потерей *bcr/abl*-негативности [6].

Естественно, исследователи задавались вопросами, какое событие первично – мутация гена *Jak2* или транслокация (9; 22); существуют ли 2 патологических клона происхождением из разных стволовых клеток крови или более поздних предшественников миелопоэза, или обе мутации происходят в одной клетке. Доказать то или иное положение на данном этапе очень сложно.

По мнению большинства авторов [6–10, 12, 13], транслокация (9; 22) возникает как вторичное событие при уже существующем *Jak2* V617F-позитивном заболевании. Это подтверждается, во-первых, тем, что мутация *Jak2* V617F выявлялась всегда раньше, чем *bcr/abl*, или одновременно с ним, но никогда – изолированно. Во-вторых, Ph-позитивный клон иногда был представлен лишь в части анализируемых клеток, тогда как мутация *Jak2* V617F выявлялась в 100 % случаев [6, 7]. В-третьих, во всех случаях после лечения иматинибом наблюдалось быстрое и стабильное подавление Ph-позитивного клона. По-видимому, более сильная активация *Jak2* во всех общих клетках-предшественниках препятствовала клональному увеличению BCR/ABL-позитивных клеток. Ph-позитивный клон оказывался более «слабым»: так, у описанного нами пациента он был довольно быстро элиминирован даже при лечении интерфероном. Интересными являются факты, полученные в ходе эксперимента двумя группами авторов [6, 8]. В замороженных образцах моноклеаров больного, полученных путем лейкофереза, на момент установления диагноза ХМПЗ мутация *Jak2* V617F была выявлена во всех клетках CD34+, CD15+, CD14+, но не CD3+,

CD19+, *bcr/abl* – ни в одном из клеточных компартиментов. При анализе эритроидных (БОЕ-Э) и гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ) колоний, выращенных на метилцеллюлозе, в большинстве колоний были найдены обе мутации, в немногих – только *Jak2* V617F и ни в одной – только *bcr/abl*. В работе M. Bornhäuser et al. [6] *bcr/abl*-транскрипт не был выявлен даже в БОЕ-Э. Таким образом, создается впечатление, что t (9; 22) действительно возникает в более поздние сроки при уже существующей мутации гена *Jak2*, причем в более коммитированных гранулоцитарно-макрофагальных предшественниках, а не в полипотентной стволовой кроветворной клетке. Известно, что присутствие в геноме мутантного *Jak2* приводит к его нестабильности и способствует возникновению дополнительных генетических поломок. Так, известны случаи сочетания мутаций *Jak2* V617F и в 12 экзоне, а также *MPL* W515L. Поэтому данное событие вполне возможно и для *bcr/abl*. G. Büsche с соавторами высказали логичное предположение, что и мутация *Jak2* V617F, и транслокация (9; 22) могут быть вторичными по отношению к уже существующему неизвестному дефекту стволовой кроветворной клетки, который индуцирует клональный гемопоэз [17].

Представленные случаи показывают важность проведения трепанобиопсии при установлении диагноза. Сейчас она практически исключена из плана обследований больных. Давно была показана гистологическая неоднородность ХМЛ, при этом вариант с расширением и выраженной дисплазией в мегакариоцитарном ростке, тенденцией к фиброзу считался прогностически неблагоприятным: более частая резистентность к терапии, более быстрое развитие бластной трансформации [4]. В свете данных, содержащихся в вышеперечисленных работах, возникает вопрос: не является ли обнаружение в трепанобиоптате при ХМЛ выраженной пролиферации мегакариоцитарного ростка с большим числом гигантских уродливых форм и фиброза признаком наличия второго, Ph-негативного ХМПЗ? В этих случаях показано молекулярно-генетическое исследование на мутации, характерные для ХМПЗ. И, конечно, если у больного ХМЛ на фоне стабильного цитогенетического/молекулярного ответа нет полной клинико-гематологической ремиссии, необходимо выполнение трепанобиопсии и дополнительное молекулярно-генетическое обследование на мутации гена *Jak2* (V617F, 12 экзоне), мутацию W515L гена *MPL*.

Тактика ведения описанных больных пока не разработана. Ясно, что наличие в арсенале гематологов ингибиторов BCR/ABL-тирозинкиназы

дает возможность быстрой и длительной элиминации Ph-позитивного клона, что позволяет в дальнейшем сосредоточить усилия на терапии сопутствующего ХМПЗ, причем применяя не только гидроксимочевину и интерфероны, но и новые терапевтические средства, предназначенные для молекулярно-направленной терапии при ХМПЗ. В зависимости от признаков проявления обоих заболеваний и возможностей костно-мозгового резерва кроветворения возможна сочетанная терапия или первоначальное подавление BCR/ABL-клона ингибиторами тирозинкиназ с последующей их отменой под контролем регулярного ПЦР-исследования, а затем проведение терапии, направленной на подавление второго мутантного клона, характерного для Ph-негативного ХМПЗ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z. et al. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy // Ann. Intern. Med. 1999. 131. 207–219.
2. Vainchenker W. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms // Hematology Education: The education program for the annual congress of the European Hematology Association. 2012. 6. 261–272.
3. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasm: The 2008 World Health Organisation criteria and point-of-care diagnostic algorithms // Leukemia. 2008. 22. 14–22.
4. Семенова Е.А., Хохлова М.П., Хорошко Н.Д. и др. Гистологические варианты хронического миелолейкоза и их клиническое значение // Гематол. трансфузиол. 1988. 3. 24–28.
5. Haq A.U. Transformation of polycythemia vera to Ph-positive chronic myelogenous leukemia // Am. Hematol. 1990. 35. 110–113.
6. Bornhäuser M., Mohr B., Oelschlaegel U. et al. Concurrent *Jak2* (V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis // Leukemia. 2007. 21. 1824–1826.
7. Jallades L., Hayette S., Tigaud I. et al. Emergence of therapy-unrelated CML on background of BCR-ABL-negative *Jak2* V617F-positive chronic idiopathic myelofibrosis // Leuk. Res. 2008. 32. 1608–1610.
8. Bocchia M., Vannucci A.M., Gostetti A. et al. Insights into *Jak2* V617F mutation in CML // Lancet Oncol. 2007. 8. 864–866.
9. Conchon M.R., Costa J.L., Novaes M.M.Y. et al. Simultaneous detection of *Jak2* V617F mutation and BCR-ABL translocation in a patient with chronic myelogenous leukemia // Int. J. Hematol. 2008. 88. 243–245.
10. Hussein K., Bock O., Seegers A. et al. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting

BCR-ABL translocation and *Jak2* V617F mutation // Blood. 2007. 109. 4106–4107.

11. Inami M., Inokuchi K., Okabe M. et al. Polycythemia associated with the *Jak2* V617F mutation emerged during treatment of chronic myelogenous leukemia // Leukemia. 2007. 21. 1103–1104.

12. Kramer A., Reiter A., Kruth J. et al. *Jak2* V617F mutation in a patient with Philadelphia- chronic-positive chronic myeloid leukemia // Lancet Oncol. 2007. 8. 658–660.

13. Mirza I., Frantz C., Clarke G. et al. Polycythemia vera to chronic myelogenous leukemia // Arch. Pathol. Lab. Med. 2007. 131. (11). 1719–1724.

14. Nadali F., Federdowski S., Karimzadeh P. et al. *Jak2* V617F mutation and Philadelphia positive chronic myeloid leukemia // Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res. 2009. 3. (3). 43–45.

15. Yokus O., Kurnaz F., Balcik O.S. et al. Coexistence of *Jak2* V617F mutation and BCR-ABL translocation in one patient // J. Clin. Exp. Invest. 2010. 1. (2). 138–140.

16. Vainchenker W. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms // Hematol. Educ. 2012; 6. 261–272.

17. Büshe G., Hussein K., Bock O., Kreipe H. Insights into *Jak2*-V617F mutation in CML // Lancet Oncol. 2007. 8. 863–864.

## THE CASE OF CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISORDER WITH COMBINATION OF A *bcr-abl* TRANSLOCATION AND *Jak2* V617F MUTATION

**Galina Anatol'evna GUSAROVA, Elena Aleksandrovna SEMENOVA,  
Manana Aleksandrovna SOKOLOVA, Anastasiya Vital'evna BYKOVA,  
Anna Grigor'evna TURKINA**

*FSBI Hematological Scientific Center of Minzdrav of Russia  
125167, Moscow, Novy Zhykovsky proezd, 4a*

A rare case of a combination of two molecular defects in a male patient of 67 years old such as simultaneous detection of *Jak2* V617F mutation and BCR-ABL translocation has been presented. According to marrow histology a chronic myeloid leukemia (CML), granulocyte-megakaryocytoid variant, was initially diagnosed. During the treatment a fast suppression of Ph-positive clone with stable complete cytogenetic and molecular responses with lack of hematologic remission and also with splenomegaly persisted was noticed. Biclinal myeloproliferative disorders (CML and chronic idiopathic myelofibrosis) was diagnosed 5 years after imatinib mesylate therapy: bone marrow local myelofibrosis was discovered and *Jak2* V617F mutation was also found at molecular genetic testing. All this led to a change in therapy. Also in the article a short review of foreign literature data about incidence with combination of a BCR-ABL translocation and *Jak2* V617F mutation is presented. In most cases the common factor was the fast suppression of a Ph-positive clone due to its weakness compared with *Jak2* V617F activation on-treatment tyrosine kinase inhibitors. It was reported by two groups of researchers during experimental analysis of erythroid and granulocytic-macrophage colonies based on methylcellulose. There is an important question if discovering of evident proliferation of megakaryocytic lineage with giant ugly forms and fibrosis found in bone marrow histology at CML is the evidence of the second Ph-negative myeloproliferative disorders. Optimal treatment strategy in similar cases is discussed.

**Key words:** chronic myeloid leukemia, Ph-negative chronic myeloproliferative disorders, idiopathic myelofibrosis, *bcr/abl*, *Jak2* V617F.

**Gusarova G.A.** – candidate of medical sciences, senior researcher of the scientific advisory department for chemotherapy of myeloproliferative disorders, e-mail: galina1966@bk.ru

**Semenova E.A.** – candidate of medical sciences, senior researcher of the department for morbid anatomy

**Sokolova M.A.** – candidate of medical sciences, senior researcher of the scientific advisory department for chemotherapy of myeloproliferative disorders

**Bykova A.V.** – postgraduate student of the scientific advisory department for chemotherapy of myeloproliferative disorders

**Turkina A.G.** – doctor of medical sciences, professor, head of the scientific advisory department for chemotherapy of myeloproliferative disorders

## ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭРОЗИВНОГО ПОРАЖЕНИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ: КЛИНИКО-ЭНДОСКОПИЧЕСКИЕ, МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВМЕШАТЕЛЬСТВА

**Тарас Алексеевич ГРИЦЕНКО, Игорь Леонидович ДАВЫДКИН,  
Алексей Михайлович ОСАДЧУК**

*НИИ гематологии, трансфузиологии и интенсивной терапии ГБОУ ВПО  
Самарский государственный медицинский университет Минздрава России  
443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89*

Цель исследования – оптимизировать лечение эрозивного колита на основе применения схемы лечения с дибикором у пациентов с гемобластозами, получающих полихимиотерапию (ПХТ). Назначение дибикора (таурин) в схеме лечения эрозивного поражения слизистой оболочки толстой кишки у пациентов с гемобластозами в течение 4 недель на фоне ПХТ сопровождается более высокой степенью клинической эффективности лечения колоректальной патологии. При этом степень восстановления кишечного микробиоценоза и процессов, характеризующих клеточное обновление колоноцитов (апоптотическая активность, экспрессия молекул Ki-67 и TLP) у пациентов, принимающих лечение с дибикором, была достоверно выше, чем у больных, в схему терапии которых дибикор не включался. Последнее может быть объяснено цитопротективным и противовоспалительным эффектами дибикора.

**Ключевые слова:** дибикор, эрозивный колит, гемобластозы, полихимиотерапия, апоптотическая активность, Ki-67, TLP.

Заболеваемость гемобластозами в России составляет 14,8 для мужчин и 11,0 для женщин на 100 тысяч населения, значительно уступая по частоте наиболее распространенным злокачественным новообразованиям легкого, желудка, толстой кишки и молочной железы. Тем не менее экономические потери, связанные с лечением и нетрудоспособностью пациентов с гемобластозами, в высокоразвитых странах занимают 2-е место после наиболее распространенного в мире рака легкого [1]. Увеличение продолжительности жизни пациентов со злокачественными новообразованиями системы крови предопределило появление актуальной проблемы онкогематологии – токсического воздействия ПХТ, сопровождающейся поражением различных органов и систем человеческого организма [1, 8]. Колоректальная патология у пациентов с гемобластозами, получающих ПХТ, представляет собой отдельную проблему, связанную с развитием мукозитов [5], в значительной мере ухудшающих

жизненный прогноз пациентов и увеличивающих сроки госпитализации [4, 7]. Доказывается, что применение ПХТ сопровождается нарушениями пролиферативной и апоптотической активности эпителиоцитов слизистой оболочки толстой кишки (СОТК), прогрессирование которых ведет к развитию катаральных, атрофических и эрозивно-язвенных поражений слизистых оболочек [9]. Существенная роль в регуляции процессов клеточного гомеостаза принадлежит регуляторным молекулам, таким как p53, Ki-67, TLP [10], роль которых в патогенезе колоректальной патологии, связанной с применением индуцированной ПХТ, недостаточно изучена, что создает невозможность прогнозирования ее развития и, следовательно, адекватного лечения. В последнее время для терапии различных заболеваний желудочно-кишечного тракта используется препарат таурина дибикор, обладающий цитопротективным, апоптотическим и противовоспалительным эффектами [3, 6].

*Гриценко Т.А. – врач-гематолог, соискатель кафедры госпитальной терапии с курсом трансфузиологии,  
e-mail: taras876@mail.ru*

*Давыдкин И.Л. – д.м.н., проф., зав. кафедрой госпитальной терапии с курсом трансфузиологии,  
e-mail: dagi2006@rambler.ru*

*Осадчук А.М. – проф. кафедры госпитальной терапии с курсом трансфузиологии,  
e-mail: maxlife2004@mail.ru*



Цель исследования – оптимизировать лечение эрозивного колита на основе применения схемы лечения с дибикором у пациентов с гемобластомами, получающих ПХТ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Набор клинического материала проводился на базе двух гематологических отделений клиник Самарского государственного медицинского университета с 2009 по 2011 г. Критерии включения: пациенты с гемобластомами в периоде полной клинико-гематологической ремиссии на фоне поддерживающей ПХТ с мукозитами слизистой оболочки колоректального отдела кишечника II степени (эрозивный колит) в возрасте 18–65 лет. Критерии исключения: терминальные состояния, сопутствующие заболевания в периоде обострения и декомпенсации, мукозиты I, III и IV степеней, отсутствие полной клинико-гематологической ремиссии гемобластома.

Всего обследовано 60 пациентов с эрозивным поражением колоректального отдела толстой кишки на фоне онкологической патологии системы крови, получающих ПХТ. Возраст обследованных составлял от 42 до 73 лет, в среднем  $64,0 \pm 2,3$  года. Пациенты были разделены на две равные группы, сопоставимые по клиническим, возрастным и половым признакам в зависимости от схемы лечения мукозита колоректального отдела кишечника. В 1-ю группу вошли 30 больных с гемобластомами в сочетании с мукозитом колоректального отдела толстой кишки II степени (эрозивный колит), получающих лечение энтеролом и линексом. 2-ю группу составили 30 больных с гемобластомами в сочетании с мукозитом колоректального отдела толстой кишки II степени (эрозивный колит), получающих лечение энтеролом, линексом и препаратом таурина (дибикор), обладающим цитопротективным и пребиотическим эффектом. Энтерол назначался в дозе 2 капсулы 2 раза в сутки в течение 10 дней, линекс – по 2 капсулы 3 раза в день в течение 4 недель, дибикор – в дозе 500 мг 2 раза в сутки в течение 4 недель.

Все больные обследованы по единой программе в динамике (до назначения лечения и спустя 4–6 недель), включающей клинико-эндоскопические, морфологические, иммуногистохимические и лабораторные исследования. Контрольную группу составили 30 практически здоровых добровольцев, обследованных однократно по той же программе, что и больные. Средний возраст лиц из контрольной группы составил  $25,3 \pm 2,4$  года (18–37 лет).

Бактериологическая оценка микробиоценоза толстой кишки основывалась на исследовании микрофлоры кала с выделением степеней дисбактериоза.

У всех обследованных при колоноскопии забирали биопсию слизистой оболочки средней трети сигмовидного отдела толстой кишки. Морфологические и иммуногистохимические исследования колоноцитов проводили на базе Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии Северо-Западного отделения РАМН. Для оценки степени тяжести мукозита использована шкала критерии токсичности NCI-CTC.

Для выявления апоптотических ядер исследуемый материал импрегнировали по Мозеру, гибель клеток определяли по формуле:  $I_{\text{АПТ}} = (N_a/N) \times 100$ , где  $I_{\text{АПТ}}$  – индекс апоптоза (%);  $N_a$  – число апоптотических ядер, окрашенных по методу Мозера;  $N$  – общее число ядер.

Имуногистохимическое исследование выполняли с использованием первичных моноклональных антител к протеину TLP (tumor liberated protein) (1:100, клон ab3605, Abcam, Великобритания), протеину Ki-67 (1:150, Novocastra, Великобритания). В качестве вторых антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышиные и антикроличьи иммуноглобулины; визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit, Novocastra). Проявление пероксидазы проводили диаминобензидином (Dako, Дания).

Для проведения иммуногистохимической реакции использовали стандартный одноэтапный протокол.

Цифровую микроскопию и морфометрическое исследование выполняли с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400 (Япония), цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Видеотест-Морфология 4.0». В каждом случае анализировали 10 полей зрения при увеличении  $\times 200$ .

Экспрессию Ki-67 оценивали по формуле  $I_{\text{Ki-67}} = (X_{\text{Ki}}/X) \times 100$ , где  $I_{\text{Ki-67}}$  – индекс экспрессии Ki-67 (%);  $X_{\text{Ki}}$  – количество ядер, иммунопозитивных к Ki-67;  $X$  – общее количество ядер, окрашенных гематоксилином. Расчет производили на 1 поле зрения микроскопа при увеличении  $\times 200$ . Степень экспрессии белка TLP определяли как среднее число иммунопозитивных клеток на  $1 \text{ мм}^2$ . Количество TLP-иммунопозитивных клеток на  $1 \text{ мм}^2$  обозначали аббревиатурой  $N_{\text{TLP}}$ .

При обработке материала вычисляли средние значения и их ошибку. При сравнении средних показателей использовали *t*-критерий Стьюдента, при сравнении качественных показателей – точный критерий Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При клинико-инструментальном исследовании у лиц контрольной группы не выявлено каких-либо указаний на имеющиеся на момент осмотра или перенесенные в прошлом заболевания толстой кишки. У части обследованных имелись жалобы, недостаточные для постановки диагноза синдрома раздраженного кишечника: у 4 (13,3 %) – запоры, у 5 (16,7 %) – метеоризм на протяжении последних 1–2 месяцев перед обследованием. Незначительную болезненность при пальпации ободочной кишки отметили 2 (6,7 %) пациента, у 3 (10 %) имелось повышение массы тела на 2–4 кг за последние 6 месяцев, а у 2 (6,7 %) – снижение на 2–4 кг, связанное с особенностями питания. У 3 (10 %) пациентов наблюдалась небольшая тахикардия в пределах 90–100 ударов в минуту, укладывающаяся в синдром «белого халата».

При копрологическом обследовании у 2 (6,7 %) лиц контрольной группы обнаруживалась незначительная примесь слизи.

При морфологическом исследовании биоптатов слизистая оболочка интактной сигмовидной кишки была представлена однослойным цилиндрическим эпителием, состоящим из каемчатых и бескаемчатых призматических колоноцитов и бокаловидных клеток. Основным компонентом собственной пластинки слизистой оболочки являлась рыхлая соединительная ткань, в которой находились фибробласты, апудоциты, лимфоциты, плазматические, тучные клетки, нейтрофильные, эозинофильные лейкоциты.

Анализ кала на дисбактериоз у 3 (10 %) обследованных выявил I степень дисбиотических нарушений (табл. 1). Изменения касались в основном снижения содержания кишечной палочки и бифидобактерий. У 90 % клинически здоровых людей дисбактериоза не обнаружено.

При анализе биоптатов слизистой оболочки сигмовидной кишки носительство цитомегаловируса выявлено у 4 (13,3 %) клинически здоровых лиц. Указанные изменения не сопровождались какими-либо морфологическими изменениями СОТК. Возможность дисбиотических нарушений в микрофлоре кала у так называемых условно здоровых лиц отмечали и другие исследователи, объясняя подобные явления особенностями рациона, экологическими факторами, изменяющими характер флоры [2].

Иммуногистохимическое исследование биоптатов СОТК обнаруживало экспрессию Ki-67 в  $16,8 \pm 1,7$  % колоноцитов исследованных биоптатов (рис. 1, а, табл. 2). Явления апоптоза колоноцитов обнаруживались достаточно редко. В среднем определялось  $18,8 \pm 2,1$  TLP-иммунопозитивных клеток (NTLP) в 1 мм<sup>2</sup> биоптата СОТК (рис. 2, а, табл. 2).

У пациентов с мукозитом II степени (эрозивный колит) длительность полной клинико-гематологической ремиссии гемобластоза составляла от 2 до 34 мес., в среднем  $14,6 \pm 3,4$  мес. Все пациенты со II степенью мукозита колоректального отдела толстой кишки жаловались на учащение стула до 3–7 раз в сутки. При этом определялась кашицеобразная или жидкая форма стула. 32 (53,3 %) человека обнаруживали в кале примесь слизи, 23 (38,3 %) – примесь крови. Все пациенты с мукозитом II степени предъявляли жалобы на вздутие живота, урчание, переливание в кишечнике. Жалобы на боль по ходу толстой кишки легкой и средней интенсивности указывали 38 (63,3 %) больных; у 3 (5 %) определялась интен-

Таблица 1

Характеристика степеней кишечного дисбактериоза у пациентов с мукозитом II степени до проведения лечения и спустя 4–6 недель

Степень дисбактериоза	Группа обследованных				
	Практически здоровые (n = 30)	1-я группа пациентов (n = 30)		2-я группа пациентов (n = 30)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
I	3 (10 %)	0 (0 %)	16 (53,3 %) #	0 (0 %)	24 (80 %) #, ^
II	0 (0 %)	20 (66,6 %) *	14 (46,7 %) #	19 (63,3 %) *	6 (20 %) #, ^
III	0 (0 %)	10 (33,3 %) *	0 (0 %) #	11 (36,7 %) *	0 (0 %) #

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначения статистически значимых отличий ( $p < 0,05$ ) от величин соответствующих показателей: \* – в группе контроля, # – пациентов до проведения терапии, ^ – пациентов I группы после коррекции кишечных расстройств.

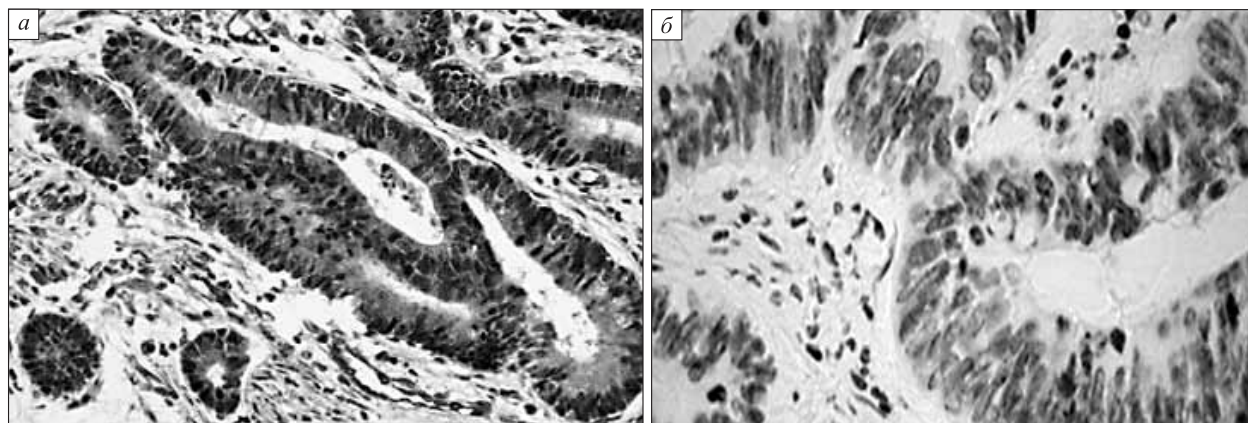


Рис. 1. Экспрессия фактора пролиферации Ki-67 в слизистой оболочке толстой кишки. а – контроль; б – мукозит II степени (эрозивный колит). Иммуногистохимический метод. Увеличение  $\times 200$

Таблица 2

Показатели, характеризующие клеточный гомеостаз колоноцитов у пациентов с эрозивным поражением СОТК на фоне полихимиотерапии до проведения лечения и спустя 4–6 недель

Показатель	Группа обследованных				
	Практически здоровые (n = 30)	1-я группа пациентов (n = 30)		2-я группа пациентов (n = 30)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
IKi-67	$16,8 \pm 1,7$	$4,7 \pm 1,1^*$	$10,2 \pm 1,3\#$	$5,0 \pm 1,1^*$	$13,3 \pm 1,5\#,^{\wedge}$
NTPP	$18,8 \pm 2,1$	$35,7 \pm 2,7^*$	$29,7 \pm 2,4\#$	$34,9 \pm 2,6^*$	$24,6 \pm 2,3\#,^{\wedge}$
IAPT	$1,8 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,9^*$	$2,9 \pm 0,4\#$	$4,9 \pm 1,0^*$	$2,4 \pm 0,4\#,^{\wedge}$

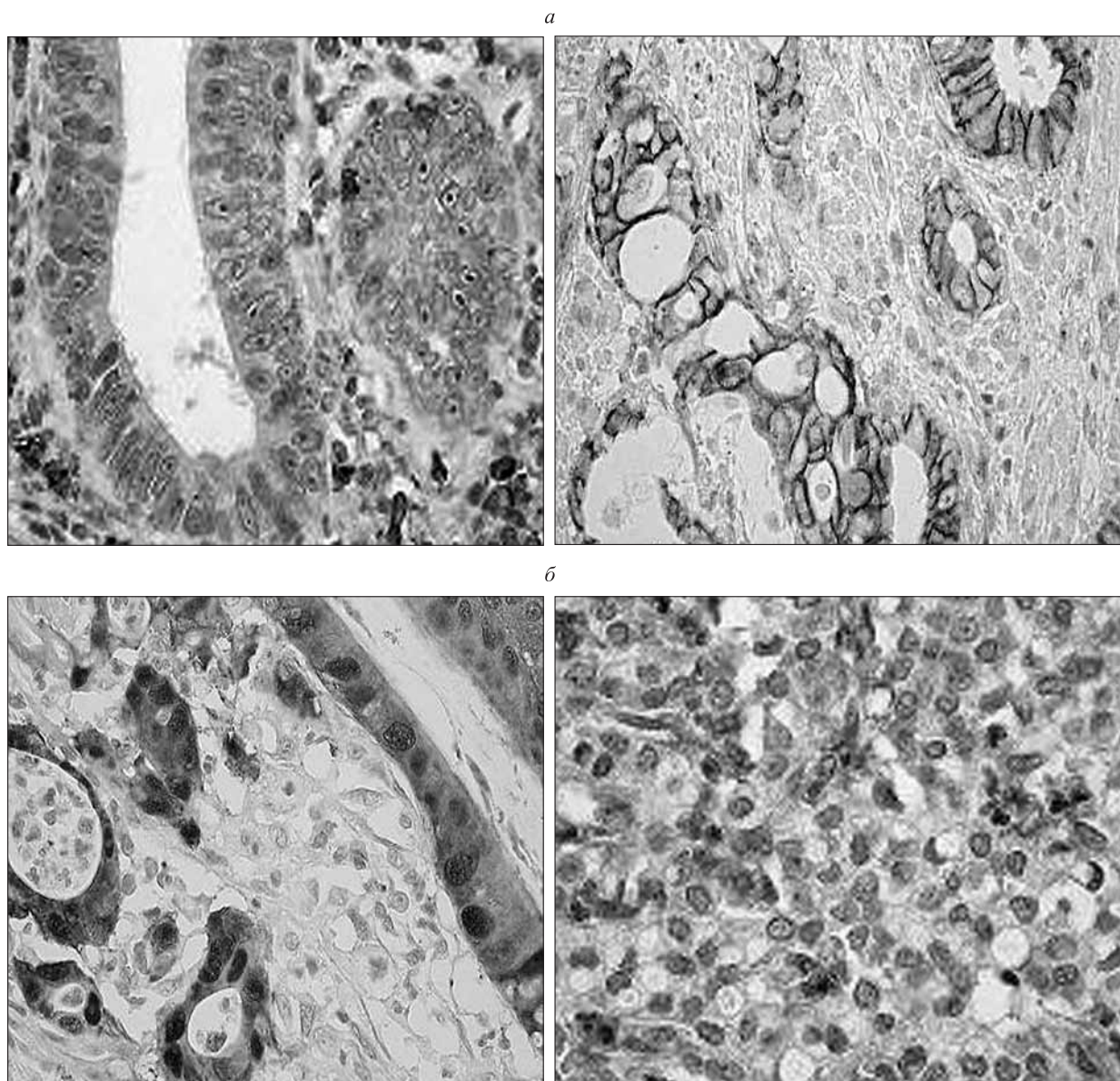
сивная боль. На болезненные позывы к дефекации предъявляли жалобы 27 (45 %) человек. Боли при пальпации в проекции сигмовидной кишки обнаруживались у 57 (95 %) обследованных. Проведенная сигмоскопия свидетельствовала о наличии относительно небольшого количества эрозий, гиперемии и отека слизистой оболочки прямой и сигмовидной кишок, а морфологическое исследование биоптатов определяло наличие как эрозивного поражения, так и нейтрофильной и мононуклеарной инфильтрации СОТК. При анализе копрограммы примесь крови в кале в виде свежих эритроцитов определялась у всех пациентов с мукозитом II степени. Повышенное содержание в кале лейкоцитов обнаруживалось у всех обследованных больных.

У пациентов с мукозитом II степени колоноскопии толстой кишки при количественном изучении состава кишечной микрофлоры определялся дефицит бифидо- и лактобактерий, увеличивалась численность неполноценных в ферментативном плане кишечных палочек и гемолизующей микрофлоры, констатировалась пролиферация кокковой микрофлоры, кандид, синегнойной палочки. Вирусологическое исследование выявило маркеры цитомегаловируса в

кале у 31 (51,7 %) больного. У всех пациентов с эрозивным поражением толстой кишки наблюдался кишечный дисбиоз: у 39 (65 %) – II степени, у 21 (35 %) – III степени.

Проведенное иммуногистохимическое исследование у пациентов с мукозитом II степени свидетельствует о значительном снижении пролиферативной активности колоноцитов, выраженной в снижении IKi-67 (см. рис. 1, б, табл. 2), нарастании IAPT и экспрессии молекулы TLP (см. рис. 2, б, табл. 2).

У 22 (73,3 %) пациентов первой группы, получающих терапию энтеролом и линексом через 4–6 недель, определялось купирование клинической симптоматики заболевания. У 8 (26,7 %) больных наблюдалась резидуальная клиническая симптоматика в виде метеоризма, абдоминального дискомфорта в нижних отделах живота, периодически возникающего кашицеобразного или жидкого стула. При динамическом эндоскопическом исследовании определялись гиперемия и отечность СОТК у 11 (36,7 %) пациентов, у 19 (63,3 %) происходила нормализация макроскопического состояния СОТК. Морфологическое исследование СОТК обнаруживало сохранение инфильтративных изменений в СОТК у 17 (56,7 %)



**Рис. 2.** Экспрессия TLR в толстом кишечнике. а – контроль; б – мукозит II степени (эрозивный колит). Иммуногистохимический метод. Увеличение  $\times 200$

пациентов 1-й группы. Проведенный анализ состояния микробиоценоза СОТК констатировал достоверное снижение степени выраженности и дисбиотических расстройств у пациентов 1-й группы. Однако состояние зубиоза не достигалось ни в одном из случаев (см. табл. 1). У пациентов 1-й группы в периоде после лечения эрозивного поражения колоректального отдела кишечника так же, как и до проведения терапии, отмечалось снижение содержания бифидобактерий. Чаще, чем в контрольной группе, выявлялись лактозонегативные штаммы кишечной палочки, сохранялось уменьшенное количество лактобактерий; содержание протея, грибов рода *Candida* и другой условно-патогенной микрофлоры было повышенным. Указанное обстоя-

тельство может являться следствием проводимой цитостатической терапии, ухудшающей состояние общего и местного иммунитета, и сохраняющегося нарушения процессов клеточного гомеостаза СОТК.

По сравнению с периодом, предшествующим назначению терапии энтеролом и линексом, у пациентов с мукозитом СОТК II степени 1-й группы констатировалось достоверное снижение  $I_{\text{АПТ}}$ ,  $N_{\text{ТЛР}}$  и статистически значимое увеличение  $I_{\text{Ки-67}}$ , не достигающих величин соответствующих показателей клеточного гомеостаза лиц контрольной группы (см. табл. 2), что свидетельствует о стойкости их нарушений и может являться предиктором развития диспластических изменений СОТК и колоректального рака.

У 28 (93,3 %) пациентов 2-й группы, получающих лечение энтеролом, линексом и дибикором, через 4–6 нед происходило купирование клинической симптоматики. У 2 (6,7 %) больных определялась резидуальная клиническая симптоматика в виде метеоризма, абдоминального дискомфорта в нижних отделах живота, периодически возникающего кашицеобразного стула. Статистический анализ показал наличие достоверной разницы частоты встречаемости резидуальной клинической симптоматики у пациентов 1-й и 2-й групп. Признаки эндоскопического и морфологического поражения СОТК у пациентов 2-й группы, получающих терапию с дибикором, определялись достоверно реже, чем у пациентов 1-й группы, лечившихся без дибикора. Так, гиперемия и отек СОТК наблюдались лишь у 6 (20 %) пациентов, а морфологические признаки воспалительного процесса – у 10 (33,3 %) человек. Назначение в группе пациентов с мукозитом II степени дибикора сопровождалось достижением достоверно лучших результатов коррекции дисбиотических расстройств и нарушений параметров клеточного гомеостаза. При этом полное восстановление процессов клеточного обновления колоноцитов у пациентов 2-й группы, лечившихся с дибикором, также не было достигнуто (см. табл. 1).

Таким образом, в основе поражения СОТК у пациентов с гемобластомами на фоне ПХТ лежит нарушение процессов клеточного гомеостаза, связанное со снижением пролиферации, усилением апоптотической активности и нарушением дифференцировки колоноцитов. Прогрессирующее нарастание интенсивности апоптоза колоноцитов ( $I_{\text{АПТ}}$ ) наряду со снижением их пролиферативной активности ( $I_{\text{Ки-67}}$ ) у пациентов с мукозитами лежит в основе эрозирования СОТК, развившегося на фоне ПХТ. Изменение экспрессии TLR колоноцитами пораженной СОТК свидетельствует о нарушении дифференцировки колоноцитов на фоне ПХТ, что может являться предиктором развития диспластических изменений и колоректального рака. Схема лечения мукозита II степени с дибикором показала в значительной степени большую клиническую эффективность, чем без дибикора. При этом степень восстановления кишечного микробиоциноза и процессов, характеризующих клеточное обновление колоноцитов ( $I_{\text{АПТ}}$ ,  $I_{\text{Ки-67}}$ ,  $N_{\text{TLR}}$ ) у пациентов, принимающих лечение с дибикором, была достоверно выше, чем у больных, в схему терапии которых дибикор не включался. Последнее может быть объяснено цитопротективным и противовоспалительными эффектами дибикора.

## ВЫВОДЫ

1. В основе возникновения эрозивного поражения СОТК у пациентов, получающих ПХТ, лежит нарастание апоптотической активности колоноцитов на фоне снижения пролиферативного потенциала эпителиоцитов СОТК. Увеличение экспрессии TLR у пациентов с эрозивным поражением СОТК свидетельствует о нарушении дифференцировки колоноцитов, что может быть предиктором возникновения диспластических изменений эпителия.

2. Назначение дибикора (таурин) в схеме лечения эрозивного поражения СОТК у пациентов в течение 4 недель на фоне ПХТ сопровождается более высокой клинической эффективностью лечения колоректальной патологии. При этом определяется достоверно лучшее качество восстановления нарушенного кишечного эубиоза и параметров клеточного гомеостаза эпителиоцитов ( $I_{\text{АПТ}}$ ,  $I_{\text{Ки-67}}$ ,  $N_{\text{TLR}}$ ) СОТК.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булиева Н.Б. Эпидемиология оппортунистических инфекций при гемобластозах // Мед. альманах. 2011. (5). 132–137.
2. Логинов А.С., Парфенов А.И. Болезни кишечника. М., 2000. 632 с.
3. Осадчук А.М., Детюченко В.П., Милова-Филиппова Л.А., Кветной И.М. Влияние антигеликобактерной терапии с дибикором на показатели клеточного гомеостаза (Ki-67, Vcl-2 и апоптоз) эпителиоцитов желудка при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. 2008. (3). 55–61.
4. Полевиченко Е.В. Алиментарные мукозиты онкологических больных: новые пути нутритивной поддержки // Лечащий врач. 2009. (8). 81–83.
5. Телетаева Г.М. Цитокины и противоопухолевый иммунитет // Практич. онкол. 2007. 8. (4). 211–218.
6. Шестопалова Е.Л. Клиническая эффективность таурина в комплексном лечении хронического гастрита и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с инфекцией *Helicobacter pylori*: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Волгоград, 2008.
7. Barasch A., Peterson D.E. Risk factors for ulcerative mucositis in cancer patients: Unanswered questions // Oral Oncol. 2003. 39. (2). 91–100.
8. Gruson D., Hilbert G., Boiron J.M. et al. Severe respiratory failure requiring ICU admission in bone marrow transplants recipients // Eur. Respir. J. 2009. 13. 883–887.

9. Sonis S.T., Elting L.S., Keefe D. et al. Perspectives on cancer therapy induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology and consequences for patients // Cancer. 2004. 100. (9, Suppl.). 1995–2025.

10. Tarro G., Perna A., Esposito C. et al. Early diagnosis of lung cancer by detection of tumor liberated protein // J. Cell. Physiol. 2005. 203. 1–5.

## **OPTIMIZATION OF EROSIVE COLON LESIONS HEMOBLASTOSES TREATMENT: CLINICO-ENDOSCOPICAL, MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES OF INTERVENTION**

**Taras Alekseevich GRITSENKO, Igor Leonidovich DAVYDKIN, Aleksei Mikhailovich OSADCHUK**

*Research Institute of Haematology, Transfusiology and Intensive Therapy of Samara State Medical University of Minzdrav of Russia  
443099, Samara, Chapayevskay str., 89*

---

The purpose of the study was to optimize the treatment of erosive colitis by applying the regimens with dibicorum at the patients with hemoblastosis undergoing polychemotherapy (PCT). The dibicorum (taurine) administration in the erosive lesions of colon mucosa treatment scheme of the patients with hemoblastosis within 4 weeks against the backdrop of PCT is accompanied with the higher degree of clinical effectiveness of colorectal disorders treatment. The degree of intestinal microbiocenosis recovery and processes characterizing cellular turnover of colon cells (apoptosis activity, Ki-67 expression of molecules and TLP) in the patients undergoing dibicorum treatment was significantly higher than in the patients undergoing treatment without dibikor. The latter can be explained by the cytoprotective and anti-inflammatory effects of dibicorum.

---

**Key words:** dibicorum, erosive colitis, hematological malignancy, polychemotherapy, apoptosis, Ki-67, TLP.

**Gritsenko T.A.** – hematologist, applicant of the chair for hospital therapy with the course of transfusiology,  
e-mail: taras876@mail.ru

**Davydkin I.L.** – doctor of medical sciences, head of the chair for hospital therapy with the course of transfusiology,  
e-mail: dagi2006@rambler.ru

**Osadchuk A.M.** – professor of the chair for hospital therapy with the course of transfusiology,  
e-mail: maxlife2004@mail.ru

## ВОЗМОЖНОСТИ НЕМЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ ЛИМФОМАМИ

Нина Петровна КАРЕВА<sup>1</sup>, Людмила Михайловна МАСЛОВА<sup>2</sup>,  
Владимир Дмитриевич КОПТЕВ<sup>3</sup>, Иван Борисович ВОРОТНИКОВ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630005, г. Новосибирск, Красный пр., 52

<sup>2</sup> МБУЗ Государственная клиническая больница № 2  
630051, г. Новосибирск, ул. Ползунова, 21

<sup>3</sup> ФГВО ВПО Новосибирский государственный университет

<sup>4</sup> МБУЗ НЦРБ, пос. Краснообск

Представлены результаты клинического исследования влияния КВЧ-терапии на функциональное состояние печени в условиях цитостатического воздействия. Метод КВЧ-терапии основан на применении низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) крайне высокой частоты (КВЧ), которое оказывает иммуномодулирующее, цитопротекторное и нейростимулирующее действие при отсутствии теплового эффекта. Показано, что при проведении полихимиотерапии в сопровождении КВЧ-терапии у 52 больных лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами с токсико-медикаментозным поражением печени наблюдается коррекция имеющихся нарушений функции печени: снижается уровень маркеров синдромов цитолиза (активность трансаминаз) и холестаза (содержание общего и прямого билирубина, активность щелочной фосфатазы), имеется тенденция к нормализации средних значений индикаторов синдрома гепатодепрессии.

**Ключевые слова:** лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, полихимиотерапия, гепатотоксичность, крайне высокочастотная терапия, электромагнитное излучение низкой интенсивности.

Современная химиотерапия, применяемая в онкогематологии, позволяет не только реально продлить жизнь больным гемобластомами, но и во многих случаях добиться их полного излечения. Так, общая выживаемость больных неходжкинскими лимфомами (НХЛ), удельный вес которых в структуре гемобластозов превышает 50 %, колеблется от 3 до 8–10 лет, а при лимфоме Ходжкина (ЛХ) безрецидивная 20-летняя выживаемость достигается более чем в 60 % случаев [1, 12]. Однако успехи терапии гемобластозов лимитируются низкой органоспецифичностью цитостатических препаратов и связанной с этим их высокой общей токсичностью. В качестве средств, способных ослабить токсические эффекты противоопухольевой терапии, используются лекарственные препараты, однако в последнее десятилетие показана возможность применения с этой целью лечебных факторов физической природы, в частности, низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) или, иначе, миллиметрового диапазона, используемого в методе КВЧ-терапии. Известно, что ЭМИ КВЧ

оказывает выраженный иммуномодулирующий эффект, обеспечивает тренировку адаптационных возможностей и повышение защитных сил организма при отсутствии теплового действия на ткани, что значительно расширяет круг показаний к использованию КВЧ-терапии [3, 4]. В исследованиях, проведенных в 70–90-х годах прошлого столетия, доказано отсутствие стимуляции опухолевого роста при изолированном применении волн миллиметрового диапазона и усиление противоопухольевого действия цитостатических препаратов и рентгеновского излучения при включении КВЧ-терапии в программу лечения больных онкологического профиля [9, 10]. Особый интерес вызывает возможность применения КВЧ-терапии в онкогематологии, так как ЭМИ КВЧ в комбинации с противоопухольевыми препаратами, широко используемыми в лечении гемобластозов, оказывает протекторное действие на клетки костного мозга, снижает проявления цитостатической депрессии гемопоэза и усиливает торможение роста экспериментального лейкоза и лимфосаркомы [2, 11].

*Карева Н.П.* – д.м.н., проф. кафедры госпитальной терапии и медицинской реабилитации,  
e-mail: knpnsk@mail.ru

*Маслова Л.М.* – врач-гематолог, зав. гематологическим кабинетом

*Коптев В.Д.* – к.м.н. кафедры терапии, e-mail: chaton06@mail.ru

*Воротников И.Б.* – врач-гематолог, e-mail: post\_gem@mail.ru

К числу наиболее частых осложнений химиотерапии (ХТ) лимфом относится лекарственно-индуцированное поражение печени, так как многие цитостатики, составляющие основу программного лечения, обладают гепатотоксичностью. Токсические реакции со стороны печени нередко носят кумулятивный характер, что ведет к нарушению сроков проведения курсов ХТ, снижению интенсивности противоопухолевой терапии и, соответственно, ее эффективности [5, 13]. В экспериментальном исследовании, выполненном на модели цитотоксического поражения печени, было установлено, что ЭМИ КВЧ в условиях действия цитостатиков оказывает гепатопротекторный эффект и стимулирует репаративные процессы в печеночной ткани в ранний постцитостатический период [6]. Учитывая полученные результаты, была изучена возможность применения КВЧ-терапии в целях коррекции токсико-медикаментозного поражения печени у больных лимфомами на этапе индукции-консолидации ремиссии, включающем 6–8 курсов полихимиотерапии.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для решения поставленного вопроса проведено клиническое исследование, в котором изучалось влияние ЭМИ КВЧ на динамику функциональных печеночных проб у больных с впервые выявленными неходжкинскими лимфомами (55 человек) и лимфомой Ходжкина (37 человек). Критерием включения в исследование служило наличие биохимических маркеров гепатотоксических синдромов после 3-го курса полихимио-

терапии (ПХТ) у пациентов, не имевших до начала периода индукции-консолидации ремиссии признаков специфического поражения и/или нарушения функции печени. В качестве маркеров синдрома мезенхимального воспаления рассматривались гиперпротеинемия, повышение тимоловой пробы и содержания в сыворотке крови  $\gamma$ -глобулинов, синдрома гепатодепрессии – гипопропротеинемия, гипоальбуминемия, снижение протромбинового индекса; синдром холестаза диагностировался при повышении активности щелочной фосфатазы, содержания общего и прямого билирубина в сыворотке крови; синдром цитолиза – при повышении активности аланин-(АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и лактатдегидрогеназы. Критериями исключения служили возраст старше 70 лет и наличие на момент обследования острого воспалительного процесса любой этиологии.

Химиотерапия во всех случаях проводилась по стандартным протоколам I линии, включающим антрациклины, антиметаболиты и стероиды, для которых характерна умеренная гепатокардиопульмонологическая токсичность [8].

Клиническая характеристика обследованных представлена в табл. 1.

Анализ данных биохимического исследования крови после 3-го курса ПХТ показал, что у больных с токсико-медикаментозным поражением печени (92 человека) чаще всего встречался синдром цитолиза – в 43,4 % случаев (40 человек), у 33 пациентов были признаки синдрома мезенхимального воспаления (35,9 %), у 36 (39,1 %) – холестаза, у 33 (35,9 %) – гепатодепрессии. Все больные методом рандомизации были разделены

Таблица 1

Клиническая характеристика больных лимфомами

Показатель	НХЛ (n = 55)		ЛХ (n = 37)	
	Абсолютное число	%	Абсолютное число	%
Средний возраст, лет	51,2 ± 2,29		32,2 ± 2,79	
Пол:				
мужчины	29	52,7	10	27,0
женщины	26	47,3	27	73,0
НХЛ высокой степени злокачественности	15	34,9		
НХЛ низкой степени злокачественности	28	65,1		
Варианты ЛХ:				
нодулярный склероз			20	54,1
смешанно-клеточный вариант			17	45,9
Стадия заболевания:				
II	6	10,9	23	62,2
III	6	10,9	6	16,2
IV	43	78,2	8	21,6



на две группы: основную, в которую вошли 52 пациента (32 с НХЛ и 20 с ЛХ), и группу сравнения – 40 больных (23 человека с НХЛ и 17 – с ЛХ). Обе группы по основным клиническим показателям были репрезентативны. При проведении очередного курса ПХТ в основной группе в качестве терапии сопровождения использовалось ЭМИ КВЧ, больные обеих групп получали гепатопротекторы (эссенциале, эсливер).

Контрольную группу составили 30 человек в возрасте от 20 до 55 лет (14 мужчин и 16 женщин), не имеющих хронических заболеваний в стадии обострения.

Для воздействия ЭМИ КВЧ использовались аппараты КВЧ-терапии «КВЧ-М-1И-5,6/7,1-МТА» и «Стелла-1» (рег. удостоверения МЗ РФ № 29/0691101/4153-02; № 29/06080994/3757-02). Технические параметры аппаратов «КВЧ-МТА» и «Стелла-1»: выходная мощность – не менее 5–7 мВт и 0,001 мкВт, плотность потока мощности ЭМИ на облучаемой поверхности – 10 мВт/см<sup>2</sup> и 0,002 мкВт/см<sup>2</sup> соответственно. Во всех случаях применялись излучатели, работающие на частоте 42,19 ГГц, что соответствует длине волн электромагнитного излучения 7,1 мм. КВЧ-терапия проводилась при получении добровольного информированного согласия пациента и разрешения локального этического комитета.

КВЧ-терапию совместно с приемом гепатопротектора начинали за 3–4 дня до начала очередного курса полихимиотерапии, во время цикла ПХТ КВЧ-воздействие осуществлялось в дни, свободные от внутривенного введения цитостатических препаратов, 2–4 процедуры проводили по окончании курса ПХТ. Общее число процедур на курс составило 10–12. Прием эссенциальных фосфолипидов продолжался в межкурсовой промежуток, предшествующий следующему циклу химиотерапии. Биохимические показатели функции печени оценивались перед началом КВЧ-терапии и/или приема медикаментозных гепатопротекторов и по окончании межкурсового интервала, разделяющего анализируемый и следующий за ним курсы ПХТ.

Статистическая обработка полученных данных включала вычисление средних значений и стандартной ошибки для переменных, подчиняющихся нормальному распределению. Тип распределения определялся с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для сравнения средних значений независимых выборок применяли критерий Стьюдента, *t*-тест для зависимых выборок. При анализе показателей, не подчиняющихся нормальному распределению, применяли непараметрические критерии: Вилкоксона для зависимых выборок, *U*-тест по методу Манна–

Уитни для независимых выборок. Для анализа сопряженности переменных, относящихся к порядковой или номинальной шкале, применяли критерий  $\chi^2$  по Пирсону, точный критерий Фишера (при малом числе наблюдений), тест  $\chi^2$  по Мак–Немару (при анализе дихотомических переменных с учетом временного фактора).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нарушение функции печени у больных обеих групп после трех курсов ПХТ в основном соответствовало первой степени по критериям CTC-NCI (Clinical Trial Centre, National Cancer Institute, США), в единичных случаях – второй. При данной степени токсического поражения печени очередной курс химиотерапии проводится без увеличения межкурсового промежутка, но со снижением на 25–50 % дозы ряда препаратов, среди которых доксорубин, винакалоиды, этопозид, входящие в протоколы лечения НХЛ и ЛХ I линии. Таким образом, при лечении лимфом даже относительно легкие нарушения функции печени могут влиять на эффективность противоопухолевой терапии из-за необходимости модификации дозы препаратов, входящих в основные программы ПХТ [7, 8]. Степень и частота отклонений отдельных биохимических тестов, как и частота основных биохимических синдромов поражения печени, в обеих группах были одинаковыми (табл. 2, 3). 2–3 биохимических синдрома одновременно регистрировались у 42,3 % пациентов основной группы и у 45,0 % – в группе сравнения, один синдром – у 57,7 и 55,0 % соответственно ( $p > 0,05$ ).

Проведение очередного курса ПХТ на фоне медикаментозного гепатопротектора и КВЧ-терапии привело к появлению существенных различий в характере изменений изучаемых показателей в сопоставляемых группах.

В группе сравнения, несмотря на сопутствующую терапию эссенциальными фосфолипидами, проведение химиотерапии сопровождалось увеличением доли больных с синдромом цитолиза с 42,5 до 45,0 % и ростом активности трансаминаз ( $p < 0,01$ ). Изменения средних значений индикаторов синдромов холестаза и гепатодепрессии после курса лечения химиопрепаратами не являлись статистически значимыми, но во всех случаях, за исключением активности щелочной фосфатазы, носили отрицательный характер и были прямо противоположны изменениям, зарегистрированным в основной группе, в которой пациенты получали ПХТ на фоне КВЧ-терапии (см. табл. 3). Цитостатическая терапия не вызвала в группе сравнения отрицательной динамики

Таблица 2

Динамика частоты отклонений биохимических тестов у больных с токсико-медикаментозным поражением печени на фоне ПХТ и КВЧ-терапии

Показатель	Характер изменений показателя	Группа наблюдения (n = 52)				Группа сравнения (n = 40)			
		До курса ПХТ + КВЧ		После курса ПХТ + КВЧ		До курса ПХТ		После курса ПХТ	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Общее содержание белка	↑	5	9,6	2	3,8	4	10,0	3	7,5
Содержание $\gamma$ -глобулинов	↑	4	7,7	2	3,8	3	7,5	2	5,0
Содержание $\alpha_2$ -глобулинов	↑	8	15,4	4	7,8	6	15,0	4	10,0
Тимоловая проба	↑	15	28,8	9	17,3	11	27,5	8	20,0
Содержание альбумина	↓	9	17,3	6	11,5	8	20,0	8	20,0
Протромбиновый индекс	↓	9	17,3	5	9,6	7	17,5	6	15,0
Общее содержание билирубина	↑	8	15,4	3	5,8	5	12,5	7	17,5
Содержание прямого билирубина	↑	12	23,1	5	9,6#	8	20,0	10	25,0^
Активность щелочной фосфатазы	↑	12	23,1	4	7,8###	10	25,0	9	22,8^
Активность АсАТ	↑	22	42,3	7	13,4###	16	40,0	14	35,0^
Активность АлАТ	↑	23	44,2	8	15,4###	17	42,5	16	40,0^^
Активность лактатдегидрогеназы	↑	6	11,5	3	5,8	4	10,0	1	2,5

Примечание. абс. – абсолютное число больных с отклонением показателя; здесь и в табл. 3 обозначены статистически значимые отличия: # – от величины соответствующего показателя до курса ПХТ (# – при  $p < 0,05$ , ## – при  $p < 0,01$ ), ^ – от величины соответствующего показателя в группе наблюдения после курса ПХТ (^ – при  $p < 0,05$ , ^^ – при  $p < 0,01$ ).

показателей. Напротив, после курса ПХТ наблюдалось снижение тимоловой пробы и концентрации  $\gamma$ -глобулинов, а доля больных с синдромом мезенхимального воспаления уменьшилась с 35,0 до 25,0 %, однако эти изменения не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ). По окончании курса ПХТ один биохимический синдром регистрировался у 60,0 % больных, доля пациентов, имевших сочетание нескольких синдромов поражения печени, сократилась с 45,0 до 35,0 % ( $p > 0,05$ ). У 5 человек (5,0 %), имевших до начала лечения признаки синдрома мезенхимального воспаления, отклонений биохимических тестов не было обнаружено.

Таким образом, проведение ПХТ в сопровождении медикаментозного гепатопротектора сопровождалось прогрессированием синдрома цитолиза и незначительным усилением нарушений синтетической и желчеобразующей функций печени. В то же время под влиянием ПХТ уменьшились проявления синдрома мезенхимального воспаления. Выявленные изменения согласуются с данными М.И. Лосевой и соавторов [7], показавших, что прогрессирование синдрома цитолиза у больных лимфомами обусловлено увеличением токсической нагрузки на печень, участвующей в метаболизме продуктов лизиса опухолевой ткани и самих противоопухолевых препаратов, тогда как регресс синдрома мезенхимального воспали-

ния связан с подавлением лимфоидной пролиферации в результате адекватной химиотерапии.

В основной группе, в отличие от группы сравнения, наблюдалась существенная положительная динамика биохимических тестов. После окончания курса ПХТ в сопровождении КВЧ-терапии произошло достоверное снижение частоты гиперферментемии и гипербилирубинемии, являющихся маркерами синдромов цитолиза и холестаза. Так, доля больных с повышенной активностью АсАТ уменьшилась в 3,2 раза, АлАТ – в 2,9 раза, щелочной фосфатазы – в 3,0 раза ( $p < 0,01$ ), доля пациентов с повышенным уровнем прямого билирубина снизилась в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ), общего билирубина – в 2,4 раза, но в последнем случае разница не была статистически значимой ( $p > 0,05$ ). Средние значения данных показателей на фоне КВЧ-терапии также имели тенденцию к нормализации (см. табл. 3).

Значительно уменьшилась доля больных с признаками синдрома мезенхимального воспаления – с 36,5 до 17,3 % ( $p < 0,05$ ). Статистически значимо снизилась тимоловая проба на фоне ПХТ в сопровождении КВЧ-терапии ( $p < 0,01$ ), концентрация  $\gamma$ -глобулинов имела тенденцию к снижению ( $p > 0,05$ ) (см. табл. 3).

Под влиянием ЭМИ КВЧ отмечена тенденция к нормализации средних значений всех показателей, характеризующих малую печеночную

Таблица 3

Динамика биохимических тестов у больных с токсико-медикаментозным поражением печени на фоне ПХТ и КВЧ-терапии

Показатель	Референтные значения	Контроль (n = 30)	Группа наблюдения (n = 52)		Группа сравнения (n = 40)	
			До курса ПХТ + КВЧ	После курса ПХТ + КВЧ	До курса ПХТ	После курса ПХТ
Общее содержание белка, г/л	65,0–85,0	77,5 ± 0,9	71,4 ± 1,0***	72,1 ± 1,1***	70,6 ± 1,2***	68,1 ± 1,0***, ^
Содержание γ-глобулинов, %	15,3–22,1	21,98 ± 0,87	22,88 ± 1,35	22,32 ± 1,05	22,72 ± 1,41	22,54 ± 1,26
Содержание α <sub>2</sub> -глобулинов, %	6,8–10,9	10,54 ± 0,37	11,04 ± 0,49	10,78 ± 0,37	11,28 ± 0,57	11,33 ± 0,29
Тимоловая проба, ед.	0–4	2,2 ± 0,2	4,4 ± 0,7***	3,5 ± 0,5**, ##	4,1 ± 0,8***	4,5 ± 1,0***, ^^
Содержание альбумина, г/л	35,0–50,0	45,7 ± 1,1	38,9 ± 1,3**	41,2 ± 1,2**	40,4 ± 1,1**	37,8 ± 1,5**, ^
Протромбиновый индекс, %	80–120	87,6 ± 1,3	79,4 ± 1,3***	83,6 ± 1,1*	78,5 ± 1,3***	79,0 ± 1,0**, ^
Общее содержание билирубина, мкмоль/л	8,5–20,5	9,8 ± 0,7	14,4 ± 0,9***	12,1 ± 0,8#	13,9 ± 1,0***	14,0 ± 1,0***, ^
Содержание прямого билирубина, мкмоль/л	2,2–5,1	3,1 ± 0,2	4,7 ± 0,5***	3,6 ± 0,3*, #	4,5 ± 0,5***	5,1 ± 0,5***, ^
Активность щелочной фосфатазы, ЕД/л	70–270	157,8 ± 8,7	242,6 ± 30,86**	194,8 ± 28,38**, ##	236,3 ± 31,37**	217,5 ± 21,9**, ^^
Активность АсАТ, мкмоль/(мл × ч)	0,1–0,45	0,22 ± 0,02	0,42 ± 0,03***	0,29 ± 0,02*, ##	0,38 ± 0,03***	0,47 ± 0,05***, ##, ^^
Активность АлАТ, мкмоль/(мл × ч)	0,1–0,68	0,21 ± 0,02	0,69 ± 0,07***	0,39 ± 0,04***, ##	0,62 ± 0,07***	0,71 ± 0,09***, ##, ^^
Активность лактатдегидрогеназы, МЕ/л	120–240	138,0 ± 6,4	180,5 ± 10,9***	170,4 ± 17,3***	177,8 ± 19,5***	162,6 ± 15,3**

Примечание. Отличие от величины соответствующего показателя в контроле статистически значимо \* – при p < 0,05, \*\* – при p < 0,01, \*\*\* – при p < 0,001.

недостаточность, в том числе общего содержания белка, альбумина, протромбинового индекса, что привело к появлению достоверных различий по этим показателям в сравниваемых группах после курса лечения (см. табл. 3).

По окончании курса КВЧ-терапии доля больных, имевших сочетание нескольких биохимических синдромов, сократилась с 42,3 до 11,5 % ( $p < 0,01$ ). У 14 человек (26,9 %), имевших до начала комплексного лечения признаки одного синдрома, отклонений результатов биохимических тестов не было обнаружено.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнонаправленность изменений данных биохимических тестов под действием ПХТ и КВЧ-терапии обусловила появление в сравниваемых группах исходно отсутствовавших различий по целому ряду показателей. В основной группе достоверно реже, чем в группе сравнения, регистрировались отклонения от нормы индикаторов синдромов холестаза и цитолиза: содержания прямого билирубина, активности щелочной фосфатазы и аминотрансфераз. В целом признаки синдромов холестаза и цитолиза встречались у больных, которым в качестве терапии сопровождения проводилось воздействие ЭМИ КВЧ, в 2,2 раза реже, чем у больных, получавших только ПХТ ( $p < 0,05$ ). Проявления синдрома гепатодепрессии (снижение общего белка, альбуминов, протромбинового индекса) в основной группе фиксировались в 1,3–1,9 раза реже, чем в группе сравнения, но эти различия не были статистически достоверными ( $p > 0,05$ ). В то же время средние значения всех перечисленных показателей после курса лечения были существенно выше в основной группе ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует об уменьшении степени нарушения синтетической функции печени под влиянием ПХТ при условии применения ЭМИ КВЧ. Нормализация биохимических показателей функционального состояния печени наступила у 26,9 % пациентов, получавших в качестве терапии сопровождения ЭМИ КВЧ и медикаментозные гепатопротекторы, и лишь у 5,0 % больных, которым ПХТ проводилась в сопровождении эссенциальных фосфолипидов ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, использование КВЧ-терапии при проведении курсовой ПХТ ведет к уменьшению степени выраженности и частоты синдромов цитолиза и холестаза у больных лимфомами с токсико-медикаментозным поражением печени. Под влиянием ЭМИ КВЧ активизируется регресс признаков синдрома мезенхимального воспали-

ния, наблюдается тенденция к восстановлению сниженной синтетической функции печени. Полученные данные позволяют рассматривать КВЧ-терапию в качестве перспективного метода сопровождения при лечении противоопухолевыми препаратами больных неходжкинскими лимфомами и лимфомой Ходжкина с целью профилактики и коррекции токсико-медикаментозного поражения печени.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» ФГБУ «НЦКЭМ» СО РАМН в рамках ГК № 16.522.11.7057.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демина Е.А. Современная терапия первичных больных лимфомой Ходжкина: автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2006.
2. Жукова Г.В., Гаркави Л.Х., Златник Е.Ю., Евстратова О.Ф. К вопросу о возможности активизации опухолеспецифических защитных механизмов с помощью модулированных ЭМИ КВЧ // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 2005. 4. (40). 3–12.
3. Зубкова С.М. Антиоксидантная активность физических факторов // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2006. (4). 3–11.
4. Истомина И.Е. Крайне высокочастотная терапия в клинической практике // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2012. (2). 47–52.
5. Казюлин А.Н., Вельшер Л.З., Данилевская Н.Н., Маевская Е.А. Лекарственная гепатотоксичность при проведении противоопухолевой химиотерапии онкологических заболеваний и возможности ее коррекции // Фарматека. 2012. (8). 37–43.
6. Карева Н.П., Ефремов А.В., Лосева М.И. и др. Модификация токсического действия противоопухолевых препаратов под влиянием миллиметровых волн в эксперименте // Патологич. физиол. эксперим. терапия. 2007. (4). 19–21.
7. Лосева М.И., Поспелова Т.И., Солдатова Г.С. и др. Отдаленные последствия противоопухолевой терапии гемобластозов. Новосибирск: Art-Avenue, 2005. 364 с.
8. Поддубная И.В., Орел Н.Ф., Смирнова Н.Б., Егоров Г.Н. Побочные реакции и осложнения противоопухолевой лекарственной терапии и борьба с ними // Химиотерапия опухолевых заболеваний / Ред. Н.И. Переводчикова. М., 2000. 336–359.
9. Соколов В.В., Кабисов Р.К., Поддубный Б.К., Барчук А.С. Новые физические методы в лечении злокачественных заболеваний основных локализаций // Рос. онкол. журн. 1996. (3). 35–41.
10. Улащик В.С. Состояние и перспективы использования лечебных физических факторов в он-

кологии // *Вопр. курортол. физиотерапии лечеб. физкультуры.* 2004. (4). 50–53.

11. *Chidichimo G., Beneduci A., Nicoletta M. et al.* Selective inhibition of tumoral cells growth by low power millimeter waves // *Anticancer Res.* 2002. 22. (3). 1681–1688.

12. *Hennessy B. Hanraban E., Daly P.* Non-Hodgkin's lymphoma; an update // *Lancet.* 2004. 5. 341–353.

13. *Rodriguez-Tries E.A., Lee W.M.* Cancer Chemotherapy I: hepatocellular injury // *Clin. Liver Dis.* 2007. 11. 641–642.

## **POSSIBILITIES OF NON-DRUG PREVENTION AND CORRECTION OF CYTOSTATIC DEFEAT OF A LIVER IN PATIENTS WITH LYMPHOMAS**

**Nina Petrovna KAREVA<sup>1</sup>, Lyudmila Mikhailovna MASLOVA<sup>2</sup>, Vladimir Dmitrievich KOPTEV<sup>3</sup>, Ivan Borisovich VOROTNIKOV<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia*  
630005, Novosibirsk, Krasny av., 52

<sup>2</sup> *Municipal Clinical Hospital № 2*  
630051, Novosibirsk, Polzunov str., 21

<sup>3</sup> *Novosibirsk State University*  
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

<sup>4</sup> *Novosibirsk Central Regional Hospital*  
630501, Novosibirsk region, Krasnoobsk

---

The results of clinical study on the influence of EHF-therapy on the liver functional state under cytostatic treatment have been presented. The EFH-therapy method is based on low intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency (EHF) producing immunomodulatory, cytoprotective, and neuro-stimulative effect in the heat effect absence. In patients with Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma with toxicomedicamental damage of the liver (52 patients), polychemotherapy combined with EHF-therapy is shown to correct the liver dysfunction: the level of cytotoxicity and cholestasis syndrome markers (general, direct bilirubin, alkaline phosphatase) decreases and there is a tendency to normalization of the average values of hepatodepression syndrome indices.

---

**Key words:** Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, polychemotherapy, hepatotoxicity, extremely high frequency therapy, low intensity electromagnetic radiation.

---

*Kareva N.P.* – doctor of medical sciences, professor of the chair of hospital therapy and rehabilitation,  
e-mail: [knpsk@mail.ru](mailto:knpsk@mail.ru)

*Maslova L.M.* – haematologist

*Koptev V.D.* – candidate of medical sciences, assistant of the chair for therapy, e-mail: [chaton06@mail.ru](mailto:chaton06@mail.ru)

*Vorotnikov I.B.* – candidate of medical sciences, hematologist, e-mail: [post\\_gem@mail.ru](mailto:post_gem@mail.ru)