

ДИНАМИКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНОЧНОЙ ДОЛЬКИ КРЫС С КАРЦИНОСАРКОМОЙ WALKER 256

**Татьяна Анатольевна КУНЦ, Анатолий Васильевич ЕФРЕМОВ,
Елена Владимировна ОВСЯНКО, Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА**

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

Проведено исследование морфометрических показателей сосудистой системы печени крыс Wistar в динамике развития перивисцеральной карциносаркомы Walker 256. Выявлены реактивные изменения стромы токсического и обструктивного генеза: преимущественно лимфоцитарная инфильтрация с формированием агрегатов, стойкая дилатация центральных и поддольковых вен, мозаичность кровенаполнения синусоидов. Возрастное структурной плотности лимфатических пространств Малла прямо коррелировало с обтурационными изменениями сосудов портальных трактов и синусоидов. Обнаружена метастатическая инвазия карциносаркомы Walker 256 по гематогенному пути с образованием внутридольковых метастазов. На ранних стадиях развития опухоли отмечена активация цитотоксической функции печени с некрозом опухолевых очагов.

Ключевые слова: печень, карциносаркома Walker 256, сосудистая система, прелимфатики, метастазы.

Опухолевый процесс сопровождается развитием паранеопластического синдрома, обусловленного факторами неспецифической эндогенной интоксикации с выделением токсических продуктов, оказывающих повреждающее действие на органы и ткани [3]. В результате опухолевого распада с высвобождением цитокинов и факторов лизиса токсические субстанции распространяются в организме, благодаря системе циркуляции крови и межорганным гуморальным связям [7, 10, 13]. Выброс опухолевыми клетками различных факторов свертывания крови приводит к активации коагуляционного каскада через сосудисто-тромбоцитарное звено гемостаза и выражается в повышенном образовании фибриногена, нарушении реологических свойств крови [6, 9], что определяет большое количество тромбозов и тромбоэмболических осложнений, сопутствующих опухолевому росту [17].

При длительном воздействии факторов паранеопластической интоксикации при прогрессировании опухоли запускаются адаптационные гормональные реакции, увеличивается внеклеточное жидкостное пространство, возрастает функциональное напряжение органов детоксикации, в том

числе печени [11, 18, 19]. Система кровообращения печени, как и в любом другом органе, является ключевой в формировании патологии полифункционального характера [20]. Сосудистое русло печени участвует в координировании метаболических процессов, в частности, эндотелий синусоидов на клеточном уровне осуществляет основную функцию микроциркуляторной системы – транскапиллярный обмен, снабжение клеток питательными и пластическими веществами и удаление отработанных продуктов. Именно через стенки сосудов осуществляется процесс массопереноса и перемещение интерстициальной жидкости [2, 16]. Компоненты крови, проникая в субэндотелиальное пространство и подвергаясь окислению, взаимодействуют с эндотелиальной поверхностью [9, 15, 20]. Поскольку эндотелиальная выстилка сосудов печени обеспечивает сосудистый тонус и миграцию клеток крови через сосудистую стенку, при дисфункции эндотелия наблюдается дисбаланс между факторами, регулирующими эти процессы [12, 14], что может приводить к нарушению гемореологии и гемостаза в органе [9, 15, 20]. Патологический процесс в печени может формироваться в силу ослабления

*Кунц Т.А. – к.б.н., научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории,
e-mail: tkunts@ngs.ru*

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

Овсянко Е.В. – д.м.н., доцент кафедры анатомии человека педиатрического факультета

Пустоветова М.Г. – д.м.н., проф., зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией

адаптивных способностей клеточных элементов стромы и паренхимы, затрагивая различные звенья системы кровообращения органа. В связи с этим чрезвычайную актуальность приобретает проблема изучения особенностей реагирования сосудистого русла печени в динамике на фоне развития опухолевого процесса.

Целью настоящего исследования является изучение параметров сосудистого русла печени в динамике на фоне «естественного» развития карциносаркомы Walker 256.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Крысам-самцам Wistar массой 180–200 г в мышцу бедра осуществляли трансплантацию 106 клеток карциносаркомы Walker 256 (W256) [8]. Образцы печени для исследования забирали спустя 3, 5, 7 и 14 суток после перевивки опухоли. В качестве контроля использовали интактных крыс. Все манипуляции с лабораторными животными проводились с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Образцы печени фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина при комнатной температуре, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в смесь воска и парафина. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Светооптическое исследование и морфометрический анализ проводили в микроскопах Micros MS300A (Австрия) и Micromed (Россия). Микрофотографирование осуществляли с помощью цифровой камеры Baumer optronic CX13c, измерения объектов проводили с помощью программ ВидеоТест-Морфология (Россия) и Image J 1.42q (НИН, США).

При помощи окулярной морфометрической сетки, состоящей из 25 тестовых точек и 5 линий [1], на тестовой площади ($6,4 \times 10^4$ мкм²) при увеличении в 1000 раз определяли объемную

плотность (V_v) синусоидных капилляров. С помощью окуляр-микрометра измеряли диаметр (D) поддольковых и центральных вен, а также междольковых артерий, вен и желчных протоков, вычисляли площадь лимфатических пространств Малла в зоне триад (по 48 измерений каждого параметра с группы). Интенсивность процесса метастазирования в печени оценивали по площади метастазов ($S_{мет}$) и частоте метастазирования (ЧМ).

Статистическая обработка результатов заключалась в подсчете средних величин (M) и их стандартных ошибок (m). Достоверность различий оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферонни при 95 % уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через трое суток после имплантации клеток карциносаркомы W256 морфологическая картина была представлена умеренными изменениями микроциркуляции, свидетельствующими о нарушении кровообращения. Явления застоя крови были характерны для центральных и междольковых вен, выявлялось неравномерное расширение синусоидов (см. таблицу). На повышенную гидратацию интерстиция в области триад указывало увеличение площади лимфатических пространств Малла (в 2,1 раза по сравнению с интактными животными, $p < 0,05$). Лимфатические пространства Малла нередко содержали лимфоидные элементы, которые в виде мелких инфильтратов были видны и в паренхиме долек печени как признак повышения проницаемости микрососудов.

Через 5 суток развития карциносаркомы W256 отмечались более выраженные изменения, свидетельствующие о нарушении кровообращения: полнокровие междольковых, изредка центральных вен. Участки расширения просветов капиллярного русла чередовались с участками их

Таблица

Морфометрические данные сосудистого русла печени крыс с карциносаркомой W256, $M \pm m$

Структура	Контроль	Время после имплантации клеток карциносаркомы W256			
		3 сут	5 сут	7 сут	14 сут
Синусоидные капилляры	$0,13 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01^*$	$0,21 \pm 0,01^*$	$0,22 \pm 0,01^*$	$0,20 \pm 0,01^{*\wedge}$
Поддольковые вены	$85,25 \pm 2,46$	$91,63 \pm 2,14$	$92,55 \pm 1,58^*$	$93,23 \pm 2,23^*$	$97,31 \pm 2,32^*$
Центральные вены	$82,71 \pm 2,19$	$82,47 \pm 2,36$	$92,60 \pm 2,48^*$	$93,02 \pm 2,05^*$	$96,85 \pm 1,98^*$
Междольковые вены	$70,51 \pm 2,20$	$72,86 \pm 2,33$	$72,96 \pm 1,92$	$70,64 \pm 1,94$	$73,05 \pm 2,43$
Междольковые артерии	$59,03 \pm 1,69$	$69,81 \pm 2,39^*$	$70,15 \pm 2,23^*$	$62,63 \pm 1,74^\wedge$	$57,45 \pm 1,80^\wedge$

Примечание. Здесь и на рисунке обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – контроля, ^ – предыдущего срока.

сужения и выраженного торможения кровотока за счет обструкции капилляров сладжированными эритроцитами. Гепатоциты имели округлые контуры ядер, содержащих одно или два ядрышка. Отмечалось появление очагов дистрофии и некроза гепатоцитов. Клеточная инфильтрация, преимущественно лимфоцитарная, локализовалась в портальных трактах, междольковых перегородках; иногда в зонах мелких некротических фокусов формировались лимфоидные скопления. В перипортальных зонах печеночных долек имело место увеличение площади пространств Малла (в 2 раза по сравнению с контролем, $p < 0,05$), иногда выявлялись тучные клетки.

Через 7 суток развития карциносаркомы W256 в печени периферически и отчасти центрально-лобулярно имела место агрегация эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов, способствовавшая закупорке части капилляров и их расширению. В результате замедления кровотока в синусоидах и снижения оксигенации и трофики гепатоцитов часть их была дистрофически изменена, в другой части, в зонах фокальных некрозов, располагавшихся, как правило, вблизи центральных вен, ядра клеток паренхимы имели признаки пикноза, кариолизиса и кариорексиса. Дилатация центральных и поддольковых вен печени (см. таблицу) сопровождалась расширением вокруг них лимфатических коллекторов как свидетельство застойных явлений и нарушения оттока крови из органа. По расширенным тканевым щелям и лимфатическим сосудам происходила интенсивная миграция лимфоидных элементов в другие компартменты печеночных долек, площадь пространств Малла превышала контрольное значение в 1,8 раза. Как и в группе на 5-е сутки роста карциносаркомы W256, через 7 суток в зонах сосудов портальных трактов отмечались скопления клеток лимфоидного ряда, часто с образованием лимфоидных агрегатов.

На 14-е сутки после имплантации клеток карциносаркомы W256 усугублялись признаки нарушения крово- и лимфообращения в печени, проявляющиеся эритроцитарным сладжем в синусоидах, дилатацией и полнокровием центральных и поддольковых вен, сопровождающимися плазморрагиями и иногда геморрагиями. Наблюдалось увеличение площади лимфатических пространств Малла в 1,4 раза по сравнению с интактными животными.

На всех экспериментальных сроках развития опухоли имело место метастатическое поражение печени в виде одиночных опухолевых клеток на ранних сроках и их конгломератов на более поздних сроках. Опухолевые клетки, в соответствии с гематолимфогенным путем распростра-

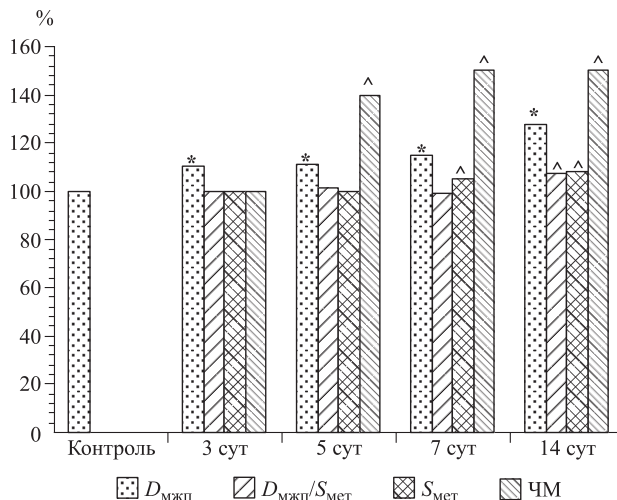


Рис. Корреляция параметров метастатической инвазии с диаметром холангиол крыс Wistar с карциносаркомой W256. D_{mjpi} – диаметр междольковых желчных протоков; S_{met} – площадь метастазов, ЧМ – частота метастазирования

нения карциносаркомы W256, обнаруживались в зоне портальных трактов, а затем мигрировали по синусоидам в паренхиме, образуя внутридольковые метастазы. Увеличение диаметра холангиол, отражающее холестатическое поражение печени, прямо коррелировало с площадью метастазов (см. рисунок). На 5-е и 7-е сутки спонтанного роста карциносаркомы W256 в печени обнаружена естественная цитотоксическая активность клеток: клеточные инфильтраты, содержащие лимфоциты, макрофаги, моноциты, эозинофилы, нейтрофилы, тучные клетки, которые перемещались в области некроза гепатоцитов и скоплений опухолевых клеток, осуществляя их лизис.

Выявленные гемодинамические изменения, сопровождающие развитие карциносаркомы W256, наблюдались на всех исследуемых сроках эксперимента. Неравномерное расширение синусоидных капилляров, обнаруживаемое уже через 3 суток после трансплантации опухолевых клеток, могло являться проявлением адаптивных реакций печени на нарушения микроциркуляции. По некоторым данным, эндотелиальные клетки капилляров, не обладая специфической сократительной функцией, в определенных условиях способны сокращаться. Изменение просвета капилляров может объясняться и пассивным механизмом, обусловленным разностью гидростатического давления внутри капилляра и окружающей ткани. В условиях патологии при появлении эритроцитарных агрегатов, закупоривающих отдельные капилляры, возрастает число капилляров, заполненных плазмой, которые при усиленной работе органа заполняются эритро-

цитами, кроме того, увеличивается число микрососудов [5]. Считается, что процесс агрегации эритроцитов обратим при восстановлении гемодинамических параметров. Накапливающиеся продукты метаболизма снижают тонус гладкомышечных клеток, вызывая дилатацию.

На более поздних стадиях развития опухоли в дополнение к нарушению сосудодвигательной функции ухудшение кровотока могло быть вызвано и воспалительными реакциями в печени, способствующими изменениям вязкости крови, создавшимися прокоагулянтными условиями [15], адгезией лейкоцитов к эндотелию [4] и увеличением сопротивления сосудов [6]. Известно, что особая роль в изменении реактивности сосудистой стенки принадлежит опухолевым цитокинам, в частности фактору некроза опухоли, который инициирует значительные морфологические изменения в цитоскелете эндотелиальных клеток, подавляя их пролиферативную активность, что *in vivo* проявляется повреждением эндотелия [9, 14]. Таким образом, патологический процесс постепенно приводил к истощению антиагрегационных, антикоагулянтных и фибринолитических возможностей эндотелия.

Расширение лимфатических пространств Малла в группах на 3-е и 5-е сутки после инокуляции карциносаркомы W256 могло свидетельствовать о сдвиге гематолимфатического равновесия, разбалансировке корней лимфатической системы и интенсификации процессов лимфатического дренажа с целью дезинтоксикации. На 7-е и 14-е сутки роста опухоли наблюдалось снижение площади пространств Малла вследствие ослабления дренажно-детоксикационной функции лимфатической системы, что могло приводить к развитию лимфотоксикоза и накоплению интерстициальной жидкости с высоким содержанием токсичных продуктов, обуславливая повреждение клеточных структур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инокуляция карциносаркомы Walker 256 крысам Wistar приводила к опухолевому поражению печени токсического и обструктивного генеза. Изменения динамических морфометрических показателей сосудистой системы печеночной доли были обусловлены нарастающими обтурационными и тромботическими поражениями микрососудов с развитием геморрагий на 14-е сутки после введения опухолевой культуры. Возрастание площади лимфатических пространств Малла отражало увеличение емкости тканевых пространств и прямо коррелировало с застойными явлениями в сосудах портальных трактов

и синусоидах. Реактивные изменения стромы выражались преимущественно лимфоцитарной инфильтрацией с формированием агрегатов. Обнаружена метастатическая инвазия карциносаркомы Walker 256 по гематогенному пути с образованием внутридольковых метастазов, на ранних стадиях развития опухоли выявлен некроз опухолевых очагов вследствие активации цитотоксической функции печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Бородин Ю.И., Мичурина С.В. Лимфатический регион печени как маркер экологического прессинга на организм // Морфология. 1998. 113. (3). 25–28.
3. Ганцев Ш.Х. Онкология. М., 2004. 516 с.
4. Жерносеков Д.Д. Адгезивные белки в процессе воспаления // Біополімери і клітина. 2007. 23. (6). 483–488.
5. Литасова Е.Е. Взаимосвязь и взаимообусловленность функционирования систем организма человека как единой информационной системы с позиции саморегуляции через систему кровообращения (введение в проблему). Новосибирск, 2011. 103 с.
6. Плотников М.Б., Маслов М., Алиев О.И. и др. Нарушения реологических свойств крови у крыс с карциносаркомой 256 Уокер и при химиотерапии циклофосфаном // Вопр. онкологии. 2001. 47. (3). 335–337.
7. Семенова А.И. Гиперкальциемия и синдром распада опухоли // Практич. онкология. 2006. 7. (2). 101–107.
8. Хегай И.И., Попова Н.А., Иванова Л.Н. Влияние экспрессии гена вазопрессина на рост карциносаркомы Walker 256 у крыс // Генетика. 2000. 42. (7). 993–995.
9. Bacurau R.F., O'Toole C.E., Newsholme P. et al. Sub-lethal concentrations of activated complement increase rat lymphocyte glutamine utilization and oxidation while lethal concentrations cause death by a mechanism involving ATP depletion // Cell Biochem. Funct. 2002. 20. 183–190.
10. Baeksgaard L., Sorensen J.B. Acute tumor lysis syndrome in solid tumors – a case report and review of the literature // Cancer Chemother. Pharmacol. 2003. 51. 187–192.
11. Finora K. Common paraneoplastic syndromes // Clin. Tech. Small Anim. Pract. 2003. 18. 123–126.
12. Lefter A.M., Ma X.L. Cytokines and growth factors in endothelial dysfunction // Crit. Care Med. 1993. 21. S9–S14.
13. Lovelace K., Vangessel Y., Asher L.V. et al. Spontaneous acute tumor lysis syndrome in a DBA/1J

mouse: a case report and review // *Toxicol. Pathol.* 2003. 31. 486–490.

14. Madge L.A., Pober J.S. TNF signaling in vascular endothelial cells // *Exp. Mol. Pathol.* 2001. 70. 317–325.

15. Menger M.D., Richter S., Yamauchi J. et al. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury // *Hepatogastroenterology.* 1999. 46 (2). 1452–1457.

16. Niir G.K., O'Morchoe C.C.C. Pattern and distribution of intrahepatic lymph vessels in the rat // *Anat. Rec.* 1986. 215. 351–360.

17. Racanelli V., Prete M., Minoia C. et al. Rheumatic disorders as paraneoplastic syndromes // *Autoimmun. Rev.* 2008. 7. 352–358.

18. Spiro S.G., Gould M.K. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes // *Chest.* 2007. 132. 149S–160S.

19. Tisdale M.J. Mechanisms of cancer cachexia // *Physiol. Rev.* 2009. 89. 381–410.

20. Vollmar B., Menger M.D. The Hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair // *Physiol. Rev.* 2009. 89. 1269–1339.

DYNAMICS OF MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF LIVER LOBULE VASCULAR SYSTEM IN WALKER 256-BEARING RATS WITH CARCINOSARCOMA

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

*Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

Morphometric characteristics of the liver vascular system in dynamics were investigated in Wistar rats transplanted with Walker carcinosarcoma 256. Reactive stromal changes revealed have toxic and obstructive genesis: lymphocytic infiltration with aggregates formation, persistent dilatation of the central and sublobular veins, irregular blood filling in the sinusoids. Structural density increase of lymphatic spaces of Mall directly correlated with obstructive vascular changes in triads and sinusoids. Metastatic invasion of carcinosarcoma Walker 256 cells was detected by blood-lymph way of spreading and intralobular node metastases were formed. In the early stages of tumor growth the cytotoxic liver activity, necrosis of the tumor foci were found out.

Key words: liver, carcinosarcoma Walker 256, vascular system, prelymphatics, metastases.

Kunts T.A. – candidate of biological sciences, researcher of central research laboratory

Efremov A.V. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMN, head of the chair for pathophysiology, honored scientist of the RF

Ovsyanko E.V. – doctor of medical sciences, associated professor of the chair for human anatomy

Pustovetova M.G. – doctor of medical sciences, professor, head of central research laboratory

АНАТОМО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МЫШЕЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГОЛОСОВОГО ТРАКТА ПРИ ПРОИЗНЕСЕНИИ АУТЕНТИЧНЫХ ГЛАСНЫХ СИБИРСКО-ТАТАРСКОГО ЯЗЫКА ПО ДАННЫМ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ

Андрей Юрьевич ЛЕТЯГИН^{1,3}, Юлия Александровна ГАНЕНКО¹,
Николай Сергеевич УРТЕГЕШЕВ²

¹ ФГБУН Институт «Международный томографический центр» СО РАН
630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3-А

² ФГБУН Институт филологии СО РАН
630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, 8

³ ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Впервые исследованы особенности анатомо-функциональных мышечных механизмов вокальных настроек аутентичных гласных сибирско-татарского языка «i», «ø» и «ö», отсутствующих в славянских и романских языках. Исследование выполнено по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ-ларингоскопии) высокого разрешения (на высокопольном МР-томографе). Это позволило визуализировать анатомо-функциональные особенности формирования голосового тракта при произнесении гласных носителем сибирско-татарского языка. Выявлены стереотипные и отличительные моменты работы мышц лица, шеи (передней поверхности) и гортани (стереотипными можно признать установки мышц гортани) и мышц, ответственных за установку корня языка (подъязычной кости) и нижней челюсти. Отличия выявлены в работе мышц губ (звуки «ø» и «ö» против звука «i»), тела языка и мягкого неба (различия во всех исследованных звуках). Исследования выполнены в рамках проекта СО РАН «Сравнительные исследования артикуляционных баз коренных народов Сибири методами высокопольной магнитно-резонансной томографии, дигитальной рентгенографии и ларингоскопии высокого разрешения».

Ключевые слова: голосовой тракт, магнитно-резонансная томография, МРТ-ларингоскопия, вокальные настройки, мышцы гортани, глотки, полости рта и лица.

Фонологическая система языка состоит из артикуляторных и акустических единиц, составляющих артикуляционно-акустическую базу (ААБ) – систему навыков произношения звуков (частей слов) и их акустических эффектов, являющуюся характеристикой этноса, а не только самого языка. ААБ складывается на ранней стадии формирования этнической группы и сохраняет свою специфику даже в том случае, если этнос в процессе своего исторического развития переходит на другой язык. При этом, приняв новый язык, но сохранив свою ААБ, этнос создает новый диалект этого языка с отличной от языка-источника фонетикой [4]. Отмеченные особенности ААБ позволяют использовать ее в качестве стандарта не только в лингвистических исследовани-

ях, но и при анализе нарушений речеобразования в логопедической практике.

Голосовой тракт (ГоТр) образован структурами верхних дыхательных путей: гортани, гортаноглотки, ротоглотки, рта, носоглотки и носовых ходов с придаточными пазухами носа. Опорным скелетом для этих структур служат хрящи гортани и кости лицевого черепа. ГоТр как морфофункциональная основа ААБ обладает двигательными механизмами, включающими мышцы гортани, гортаноглотки, ротоглотки, рта и лица, что обеспечивает фонацию на основе проведения и регулирования воздушного потока на выдохе [8]. При этом носители различных языков имеют морфофункциональные особенности ГоТр, позволяющие им произносить звуки, являющиеся

Летягин А.Ю. – д.м.н., ведущий научный сотрудник, руководитель отдела функциональной лимфологии,
e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Ганенко Ю.А. – аспирант

Уртегешев Н.С. – к.филол.н., старший научный сотрудник

особенностью данного языка. Актуальность исследования обусловлена недостаточностью или полным отсутствием прямых исследований механизмов речепорождения у носителей редких языков, одним из которых является сибирско-татарский язык.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) применяется в клинических исследованиях с 80-х годов прошлого века, является достоверным и безопасным методом медицинской визуализации. Развитие МРТ-технологий с высокой скоростью получения изображений на основе высокопольных томографов позволило в последние 10–15 лет осуществлять неинвазивные и безопасные для здоровья эксперименты по визуализации артикуляторных органов при произнесении звуков речи [9]. МР-томография является основой для виртуальной 3D-ларингоскопии [7].

Цель работы – с помощью высокопольного магнитно-резонансного томографа визуализировать структуры ГоТр и их моторику при произнесении вокальных единиц (гласных звуков) сибирско-татарского языка в медиали слова.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В программу МРТ-визуализации были включены три слова: два мягкорядных – *кил* ‘иди сюда’, *көц* ‘сила’ и одно твердорядное – *корэ* ‘сухой’, в которых в медиальной позиции в схожих позиционно-комбинаторных условиях четко (без вариантов) произносятся гласные «i», «ө» и «ö» (соответственно). Лингвистическая оценка артикуляторной рядности исследованных гласных проводилась по методике, разработанной В.М. Надеяевым [2, 3], для определения ступеней отстояния использовалась «Универсальная таблица» [5]. Звуку «i» было дано определение – гласный переднерядный слабоотодвинутый настройки 1-й основной ступени отстояния неогубленный неназализованный нефарингализованный – «i». Звук «ө» был определен как гласный переднерядный сильноотодвинутый настройки 3-й основной ступени отстояния огубленный назализованный сильнонапряженный нефарингализованный – «ө». Звук «ö» – гласный центральнозаднерядный основной настройки 3-й сильноприкрытой ступени отстояния огубленный назализованный сильнонапряженный нефарингализованный – «ö».

В исследовании участвовала специально подготовленная, давшая информированное согласие на участие, диктор-доброволец Сафарметова Динара Рашитовна, сибирская татарка. Родилась 9 октября 1968 г. в г. Тобольске Тюменской об-

ласти, где проживает до настоящего времени; сибирско-татарским языком владеет с детства.

МРТ-ларингоскопия производилась на высокопольном МР-томографе Philips Achieva Nova Dual 1.5 T, катушка Head/Neck synergy SENSE (Philips medical systems; Eindhoven, Нидерланды) в лаборатории медицинской диагностики ФГБУН Института «Международный томографический центр» СО РАН (г. Новосибирск). Для этого была разработана «статическая» T2-ВИ МРТ-последовательность с параметрами: FOV 250 mm, rFOV 90 %, Matrix scan 256x185, Reconstruction 256x256, Scan% 80, Slice thickness 8 mm, Flip angle 50, TR/TE 500.0/80.0, которая позволяла получить качественные изображения при произнесении слов, имеющих в медиальной позиции гласный звук (в течение 8–12 с), после достаточно глубокого вдоха. Графическая постобработка, архивация и морфометрия МР-томограмм выполнялись на рабочей станции Philips ViewForum RS.1 (Dell). Произнесение звуков одновременно записывалось на цифровой диктофон для контроля протокола МРТ-эксперимента и для последующего слухового анализа.

Сагиттальные срезы проходили точно по срединной сагиттальной плоскости (с захватом кончика носа, твердого неба, основания черепа), аксиальные пакеты срезов – через уровень истинных голосовых связок, через небную занавеску и верхние резцы.

Анатомо-функциональный анализ структур ГоТр, настройки модулирующих структур и работа мышечного аппарата проводились в соответствии с анатомической номенклатурой [1] и методическими подходами других исследователей в области МРТ-ларингоскопии [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

МРТ-срезы через структуры ГоТр при артикулировании гласного «i» (типа и) в слове *киль* ‘иди сюда’ в сибирско-татарском языке представлены на рис. 1.

Скелетотопически – подъязычная кость на уровне тела позвонка С3, голосовые связки – на уровне межпозвонкового диска С3–4 (при нейтральном положении – на один позвонок ниже), за счет сокращения мышц надподъязычной группы (шилоподъязычной и заднего брюшка двубрюшной мышцы), шилоглоточной и трубоглоточной мышц. Нижняя челюсть опущена за счет скоординированных сокращений мышц диафрагмы рта и подподъязычной группы. Губы разомкнуты – сокращение мышц-дилататоров рта при одновременном расслаблении m. orbicularis oris. Средняя часть спинки языка приближается во время

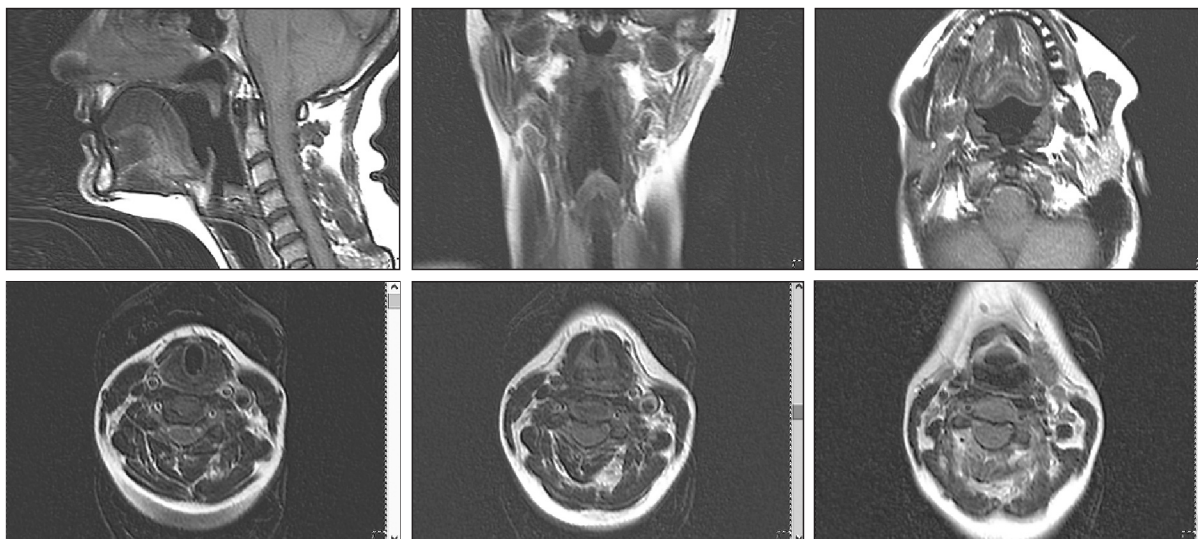


Рис. 1. МР-томограммы при артикулировании гласного «i» в слове киль 'иди сюда'. Верхний ряд, слева направо: срединный сагиттальный срез; фронтальный срез через глотку, гортань и трахею; аксиальный срез через ротоглотку. Нижний ряд, слева направо: аксиальные срезы через гортань на уровне подвязочного пространства; на уровне голосовых связок; на уровне входа в гортань

звукопорождения к средней части твердого неба. Верхушка языка практически контактирует с режущей поверхностью верхних резцов и вплотную прилежит к нижним резцам (см. рис. 1). Для создания данной артикуляции активно работают поперечная и нижняя продольные мышцы языка – это реализуется в подъеме передней трети тела языка (вплотную к верхнему альвеолярному отростку и верхнему небу) с одновременным опущением вершины языка (к нижним резцам). Меньшая величина зубного отстояния (вершины языка от зубного ряда) относительно величины губного отстояния (расстояния между губами) указывает на *неогубленность* артикуляции гласного «i». Корень языка при этом сдвигается кпереди (за счет сокращения подбородочно-язычной мышцы). Сомкнутая с задней стенкой глотки небная занавеска свидетельствует о *неназализованном* характере гласного – это обеспечивается сокращением мышц, поднимающих и напрягающих нёбную занавеску. Надгортанник смещен кзади от корня языка за счет сокращения черпалонадгортанной мышцы. Истинные голосовые связки натянуты и сужены: перстнещитовидная мышца (*m. cricothyreoideus*) сокращена совместно с аддукторами (боковая перстнечерпаловидная, щиточерпаловидная, поперечная черпаловидная и косая черпаловидная мышцы) (см. рис. 1, таблицу).

Голосовой тракт при произнесении гласного «i» формируется в виде двух сужений, разделенных расширением (см. рис. 1). Широкий воздухоносный путь кверху от суженных голосовых

связок – в области ротоглотки за счет того, что корень языка и подъязычная кость находятся в переднем положении, и за счет отсутствия напряжения задней стенки глотки (гласный *нефарингализованный* и *неназализованный* – без контакта с носовыми ходами). Дистальное тракт сужается к передней трети твердого неба и альвеолярного отростка верхней челюсти (сверху), и верхушкой языка и режущей поверхностью верхних резцов.

МРТ-срезы через структуры ГоТр при артикулировании гласного типа «ө» в слове көц 'сила' представлены на рис. 2. Скелетотопически – подъязычная кость на уровне тела позвонка С3, голосовые связки – на уровне межпозвонкового диска С3–4 (при нейтральном положении – на один позвонок ниже) за счет сокращения мышц надподъязычной группы (шилоподъязычной и заднего брюшка двубрюшной мышцы), шилоглоточной и трубоглоточной мышц. При продуцировании гласного ө губы разомкнуты (сокращение мышц-дилататоров рта при одновременном расслаблении *m. orbicularis oris*). Нижняя челюсть опущена за счет скоординированных сокращений мышц диафрагмы рта, подподъязычной группы (челюстно-подъязычной, двубрюшной и подбородочно-подъязычной мышц) (см. рис. 2).

Средняя часть спинки языка поднята и приближена к задней части твердого неба (что характеризует настройку как *переднерядную сильно-отодвинутую*). Расстояние от верхушки языка до режущей поверхности верхних зубов составляет лишь 55,56 % от расстояния между спинкой языка и твердым небом, верхушка языка прилегает

Таблица

Мышцы, активно формирующие голосовой тракт при произнесении звуков «і», «ø» и «ò»

Мышцы / Звуки	«і»	«ø»	«ò»
Мышцы окружности рта – констрикторы	Расслаблены	Сокращены	Сокращены
Мышцы окружности рта – дилататоры	Сокращены	Расслаблены	Расслаблены
Жевательные мышцы	Расслаблены	Расслаблены	Расслаблены
Мышцы языка внешние	Сокращение подбородочно-язычной мышцы	Сокращение хрящезычной и подъязычно-язычной мышц	Сокращение челюстно-подъязычной, двубрюшной (переднее брюшко), подбородочно-подъязычной, хрящезычной и подъязычно-язычной мышц
Мышцы языка внутренние	Сокращение поперечной и нижней продольной мышц языка	Сокращение верхней продольной, нижней продольной, поперечной мышц языка	Сокращение верхней продольной, нижней продольной и вертикальной мышц языка
Мышцы мягкого неба	Сокращение мышц, поднимающих и напрягающих небную занавеску	Сокращение мышцы, напрягающей небную занавеску	Сокращение небно-язычной, небно-глоточной мышц, и мышцы, напрягающей небную занавеску
Внешние мышцы гортани – надподъязычная группа	Сокращены шилоподъязычная и заднее брюшко двубрюшной мышцы	Сокращены шилоподъязычная и заднее брюшко двубрюшной мышцы	Сокращены шилоподъязычная и заднее брюшко двубрюшной мышцы
Внешние мышцы гортани – подподъязычная группа	Сокращены	Сокращены	Сокращены
Собственные мышцы гортани – дилататоры голосовой щели (абдукторы голосовых связок)	Расслаблены	Расслаблены	Расслаблены
Собственные мышцы гортани – констрикторы голосовой щели (аддукторы голосовых связок)	Сокращены перстнещитовидная, боковая перстнечерпаловидная, щиточерпаловидная, поперечная и косая черпаловидная	Сокращены перстнещитовидная, боковая перстнечерпаловидная, щиточерпаловидная, поперечная и косая черпаловидная	Сокращены перстнещитовидная, боковая перстнечерпаловидная, щиточерпаловидная, поперечная и косая черпаловидная
Мышцы, напрягающие голосовые связки (тензоры голосовых связок)	Сокращены	Сокращены	Сокращены
Мышцы, расслабляющие голосовые связки	Расслаблены	Расслаблены	Расслаблены
Группа протекторов гортани	Сокращение черпало-надгортанной мышцы	Сокращение черпало-надгортанной мышцы	Сокращение черпало-надгортанной и подбородочно-язычной мышц
Мышцы глотки	Сокращение шилоглоточной и трубоглоточной мышц. Констрикторы – расслаблены	Сокращение шилоглоточной и трубоглоточной мышц. Констрикторы – расслаблены	Сокращение шилоглоточной и трубоглоточной мышц. Констрикторы – расслаблены

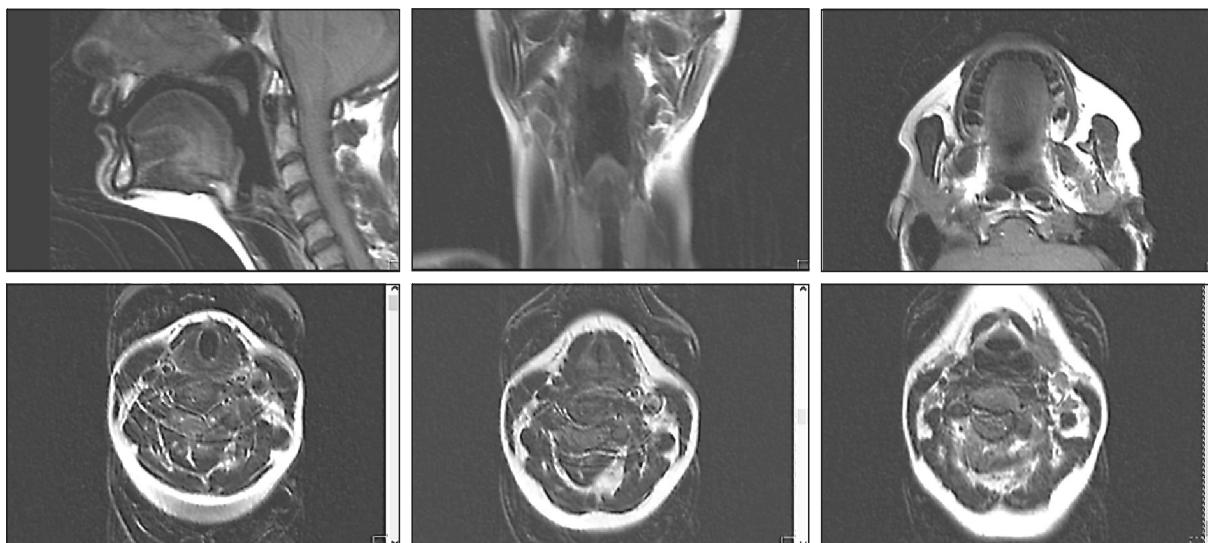


Рис. 2. МР-томограммы при артикулировании гласного «о» в слове *кѡц* 'сила'. Верхний ряд, слева направо: срединный сагиттальный срез; фронтальный срез через глотку, гортань и трахею; аксиальный срез через ротоглотку. Нижний ряд, слева направо: аксиальные срезы через гортань на уровне подвязочного пространства; на уровне голосовых связок; на уровне входа в гортань

к нижним резцам (соответствует *настройке 3-й основной ступени*) за счет верхней продольной (меньше), нижней продольной и поперечной мышц языка (больше) (сокращение в переднезаднем направлении и подъем спинки языка, опущение верхушки языка), при этом корень языка занимает «заднее» положение за счет сокращения хрящезычной и подъязычно-язычной мышц. Большая величина зубного отстояния (вершины языка от зубного ряда) относительно губного (расстояния между губами) свидетельствует о *лабиализованности* гласного «о». Нёбная занавеска открывает вход в носовую полость за счет мышцы, напрягающей нёбную занавеску (артикуляция *назализованная*).

Надгортанник занимает почти вертикальное положение и вплотную примыкает к корню языка, находящегося в крайнем заднем положении (положение надгортанника обеспечивается сокращением черпало-надгортанной мышцы и расслаблением подбородочно-язычной). При этом просвет ротоглотки сохраняется (надгортанник значительно отстоит от задней стенки глотки). «Заднее» положение корня языка, но наличие свободного пространства до задней стенке глотки – звук *сильнонапряженный*, но *нефарингализованный*.

Истинные голосовые связки сужены: боковая перстнечерпаловидная, щиточерпаловидная, поперечная черпаловидная и косая черпаловидная мышцы – сокращаются, и *lig. vocalis* натягиваются за счет сокращения перстнечитовидной мышцы (см. рис. 2, таблицу).

Голосовой тракт при продуцировании гласного *о* представляет собой сложную систему: над сомкнутыми голосовыми связками формируется умеренных размеров резонансная полость в области ротоглотки, которая разделяется надвое мягким небом (один поток в ротовую полость, другой – в полость носоглотки и носовые ходы). При этом звуковой поток в ротовой полости движется по примерно равномерному сечению между спинкой языка и твердым небом.

МРТ-ларингоскопические срезы через структуры *GoTr* при артикулировании гласного «о» в слове *кѡрѣ* 'сухой' представлены на рис. 3. Скелетотопически – подъязычная кость на уровне тела позвонка С3, голосовые связки – на уровне тела позвонка С4 (при нейтральном положении – на один позвонок ниже), за счет сокращения мышц надподъязычной группы (шилоподъязычной и заднего брюшка двубрюшной мышцы), шилоглоточной и трубоглоточной мышц.

Губы разомкнуты (сокращение мышц-дилататоров рта при одновременном расслаблении *m. orbicularis oris*); нижняя челюсть опущена и зубы разомкнуты за счет скоординированных сокращений мышц диафрагмы рта, подъязычной группы (челюстно-подъязычной, двубрюшной и подбородочно-подъязычной мышц) (см. рис. 3, таблицу).

Расстояние от верхушки языка до режущей поверхности верхних зубов составляет лишь 66,67 % от расстояния между спинкой языка и твердым небом, верхушка языка плотно прилегает к нижним резцам (соответствует *сильнопри-*

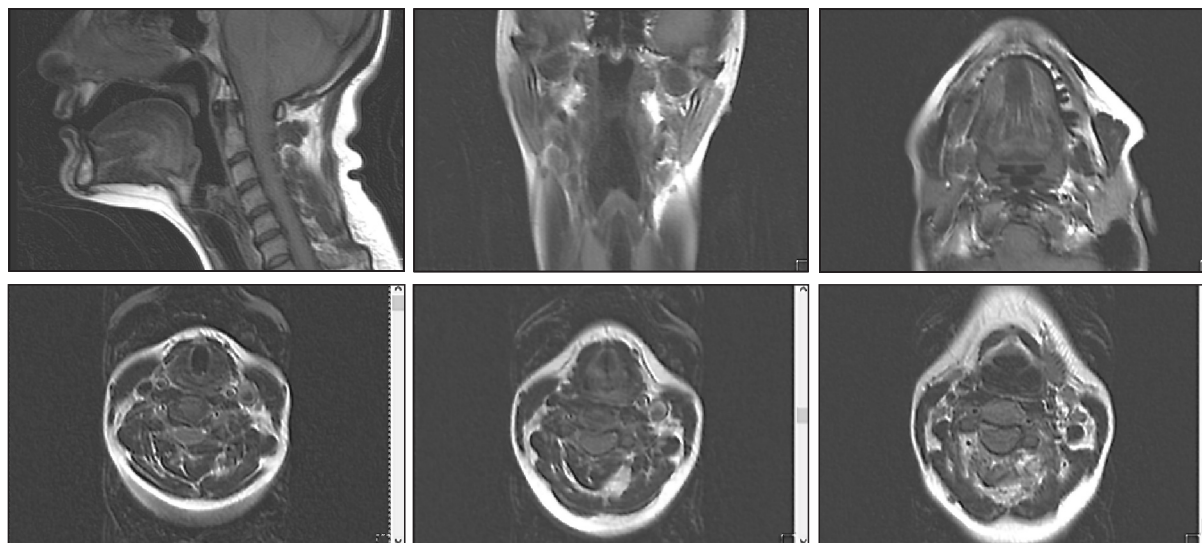


Рис. 3. МР-томограммы при артикулировании гласного «о» в слове корэ 'сухой'. Верхний ряд, слева направо: срединный сагиттальный срез; фронтальный срез через глотку, гортань и трахею; аксиальный срез через ротоглотку. Нижний ряд, слева направо: аксиальные срезы через гортань на уровне подсвязочного пространства; на уровне голосовых связок; на уровне входа в гортань

закрытой настройке 3-й ступени) за счет верхней продольной (меньше), нижней продольной и вертикальной мышц языка (больше) происходит смещение корня языка кзади, уплощение спинки языка с опущением верхушки; при этом корень языка занимает «заднее» положение за счет сокращения хрящезычной и подъязычно-язычной мышц. Большая величина зубного отстояния (вершины языка от зубного ряда) относительно величины губного отстояния (расстояния между губами) свидетельствует о *лабиализованности* гласного «о». Задняя треть спинки языка приближена к передней поверхности мягкого неба (см. рис. 3), что характеризует настройку как *центральнозаднерядную основную*.

Выявляется заднее смещение корня языка, но с наличием свободного пространства до задней стенки глотки – звук *сильнонапряженный*, но нефарингализованный. Надгортанник вплотную примыкает к корню языка, и при этом значительно отстоит от задней стенки глотки (сокращаются черпало-надгортанная и подбородочно-язычная мышцы). Нёбная занавеска опущена и открывает вход в носовую полость (сокращение нёбно-язычной, нёбно-глоточной мышц и мышцы, напрягающей нёбную занавеску) – артикуляция *нализованная*.

Истинные голосовые связки сужены под воздействием боковой перстнечерпаловидной, щиточерпаловидной, поперечной черпаловидной и косой черпаловидной мышц; натяжение lig. vocalis – за счет сокращения перстнечитовидной мышцы (см. рис. 3).

Голосовой тракт при продуцировании гласного «о» представляет собой сложную систему: над сомкнутыми голосовыми связками формируется умеренных размеров резонансная полость в области ротоглотки, которая разделяется надвое мягким небом (меньший поток направлен в ротовую полость, больший – в полость носоглотки и носовые ходы). При этом звуковой поток в ротовой полости попадает в резонансную полость в виде расширения между твердым небом и передней частью спинки языка и затем с сужением на уровне режущих кромок зубных рядов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ звукообразования вокальных настроек «i», «ø» и «o» сибирско-татарского языка выявляет следующие анатомо-функциональные моменты работы ГоТр.

При произнесении гласных звуков «i», «ø» и «o» можно отметить основные общие эффекты работы мышечного аппарата лица и шеи: опущение нижней челюсти (зубы разомкнуты), подъем подъязычной кости и гортани на один позвонок выше «нейтральной» позиции.

Звуки «i», «ø» и «o» произносятся при сомкнутых и напряженных истинных голосовых связках – без явных морфологических отличий в состоянии голосовой щели (при идентичном состоянии мышц гортани). Надгортанник при этом занимает положение, близкое к вертикальному, оставаясь на большом расстоянии от задней стенки глотки. При артикулировании данных гласных

мышцы глотки не принимают активного участия – звуки *нефарингализованные*.

Различия наблюдаются в положении корня языка (и подъязычной кости): в ряду звуков «і», «ø», «ò» корень языка смещается дорзальнее (кзади).

При произнесении звука «і» над истинными голосовыми связками между надгортанником, задней и боковыми стенками глотки образуется достаточно широкая единая резонансная полость из ротоглотки и полости рта (носоглотка «отсекается» мягким небом), продолжающаяся кверху и кпереди – в узкое пространство между спинкой языка и твердым небом.

При произнесении звуков «ø» и «ò» над истинными голосовыми связками между надгортанником, задней и боковыми стенками глотки также формируется резонансная полость, но меньшего объема (чем при звуке «і») за счет смещения корня языка кзади. Анатомически при «ø» ротоглотка расширена не так сильно, как при «і», но сильнее, чем при «ò», что говорит о разной степени смещенности тела языка в ротовой полости. Вверху резонансная полость разделяется мягким небом на две части: переднюю – в достаточно широкое пространство между спинкой языка и твердым небом (шире, чем при звуке «і»), и заднюю – между мягким небом и задней стенкой глотки (чего не происходит при произнесении звука «і»).

Имеются также различия во взаимоотношениях языка и твердого неба: при произнесении «і» и «ø» наиболее узкая часть формируется средней частью спинки языка, но в первом случае – со средней третью твердого неба, а во втором – с задней третью. Гласный «ò» характеризуется тем, что задняя часть спинки языка демонстрирует более высокий подъем, чем при звуках «і» и «ø», и почти касается занавески мягкого неба.

Имеются различия в участии губ: гласные «ø» и «ò» образуются при активной работе губ – звуки лабиализованные, в то время как при артикулировании «і» губы не задействованы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МРТ-ларингоскопия позволяет получать информацию о механизмах специфических модуляций образования вокальных единиц голоса.

При произнесении звуков «і», «ø» и «ò» выявлено единообразие просвета между истинными и ложными голосовыми связками, в сочетании с однообразным положением надгортанника (относительно входа в гортань и задней стенки глотки).

Выявлены различия в положении корня языка (и подъязычной кости) относительно основания

череп (твердого неба) и задней стенки глотки (передней поверхности шейного отдела позвоночного столба), а также в состоянии мягкого неба (относительно задней стенки глотки и хоан), языка и губ относительно верхних и нижних зубных рядов, твердого и мягкого неба. Активные сокращения мышц формируют различия в строении голосового тракта, особенности огубленности (лабиализации), назализованности и фарингализованности при артикуляции гласных звуков «і», «ø» и «ò».

С одной стороны, эти результаты имеют лингвистическую и этнографическую ценность для сохранения «исчезающих» языков и набора данных для создания объемно-динамической модели ГоТр, с перспективой создания «искусственного голоса» (голосового процессора). С другой стороны – данные МРТ-ларингоскопии имеют клинико-диагностическое приложение в логопедии и восстановительной ЛОР-хирургии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Президента Российской Федерации (НШ-2429.2012.3), Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК и соглашения № 16.740.11.0605, № 14.132.21.1787, № 8158), Президиума СО РАН (проекты № V.48.1.1, № 87, № 28, № 121).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Международная анатомическая терминология (с официальным списком русских эквивалентов). Terminologia Anatomica / Ред. Л.Л. Колесников. М.: Медицина, 2003. 424 с.
2. Наделяев В.М. Проект универсальной унифицированной фонетической транскрипции (УУФТ). М.; Л., 1960.
3. Наделяев В.М. Экспериментально-фонетическое рентгенографирование артикуляторных настроек гласных (Методические заметки). Приложение к статье «Артикуляционная классификация гласных» // Фонетические исследования по сибирским языкам. Новосибирск, 1980. 44–91.
4. Наделяев В.М. Исследования звуковых систем языков Сибири. Новосибирск: Наука, 1984. 201 с.
5. Уртегешев Н.С. Артикуляторные характеристики гласных: методика определения ступеней отстояния // Гум. науки в Сибири. 2007. (4). 10–16.
6. Ahmad M., Dargaud J., Morin A., Cotton F. Functional morphology of phonation evaluated by dynamic MRI // Surg. Radiol. Anat. 2006. 28. 481–485.
7. Kettenbach J., Birkfellner W., Sorantin E., Aschoff A.J. Virtual laryngoscopy // Image Processing in Radiology: Current Applications. 2008. 183–198.

8. Wippold II F.J. Neck // *Computed Body Tomography with MRI Correlation* / Eds. J.K.T. Lee, R.J. Stanley, S.S. Sagel, J.P. Heiken. Lippincott-Raven, 1998. 107–182.

9. Wismueller A., Behrends J., Hoole P. et al. Human vocal tract analysis by in vivo 3D MRI during phonation: A complete system for imaging, quantitative modeling, and speech synthesis // *Med. Image Comput. Comput. Assist. Interv.* 2008. 11. (Pt. 2). 306–312.

ANATOMIC AND FUNCTIONAL MUSCULAR MECHANISMS OF A VOICE PATH'S FORMING AT PRONOUNCING OF AUTHENTIC VOWELS OF THE SIBERIAN TATAR LANGUAGE ACCORDING TO THE MAGNETIC RESONANCE TOMOGRAPHY

**Andrey Yurevich LETYAGIN^{1,3}, Yulia Aleksandrovna GANENKO¹,
Nikolay Sergeevich URTEGESHEV²**

¹ *Institute «International Tomography Center» of SB RAS
630090, Novosibirsk, Institutskaya str., 3-A*

² *Institute of Philology of SB RAS
630090, Novosibirsk, Nikolaev str., 8*

³ *Institute of Clinical and Experimental Lymphology of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

For the first time the features of anatomic and functional “muscles” mechanisms of vocal adjustments of authentic vowels of the Siberian Tatar language «i», «ø» and «ò», absent in Slavic and Romance languages are described. The research is carried out according to a magnetic resonance tomography of the high resolution (on the high field MR-scanner) data. It has allowed visualizing anatomic and functional features of formation of the voice path at pronouncing vowels by carrier (speaker) of the Siberian Tatar language. The stereotypic and distinctive moments of work of muscles of a face, neck (forward surface) and throats are revealed. Stereotypic it is possible to recognize installations of muscles of the throat, and muscles responsible for installation of a radix of language (hypoglossal bone) and mandibula bone. Differences are revealed in work of muscles of lips (sounds «ø» and «ò» against a sound «i»), body of language and the soft palatinum (distinction in all investigated vowel sounds). Researches are executed within the limits of the project of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science «Comparative researches of articulation acoustic bases of authentic peoples of Siberia by methods of a high field magnetic resonance tomography, digital R-graphy and larhyngoscopy of the high resolution».

Key words: voice path, magnetic resonance tomography, MRI-laryngoscopy, vocal adjustments, muscles of a throat, oral cavities and face.

*Letyagin A.Yu. – doctor of medical sciences, head of the department for functional lymphology, leading researcher,
e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru*

Ganenko Yu.A. – postgraduate student

Urtegeshev N.S. – candidate of philological sciences, senior researcher

ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ПРИРОДНЫХ ВОД НА КЕРАТИНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Наталья Сергеевна ЗАЙЦЕВА, Антон Владимирович ЧЕЧУШКОВ,
Петр Михайлович КОЖИН, Анна Евгеньевна ЛЕМЗА,
Виктор Олегович ТКАЧЕВ, Наталия Геннадьевна ЛУЗГИНА

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

Природные высокоминерализованные воды широко применяют для лечения заболеваний кожи. Вместе с тем механизмы их влияния на клетки кожи человека не достаточно изучены. В данной работе на кератиноцитах человека HaCaT *in vitro* было показано, что рапа озера Малое Островное в дозах, не обладающих цитотоксическим эффектом, вызывает арест клеточного цикла в фазе G0/G1 с последующим торможением пролиферации и увеличением экспрессии маркеров дифференцировки кератиноцитов, лорикрина и филагтрина. Полученные результаты свидетельствуют о начале терминальной дифференцировки кератиноцитов под влиянием рапы и могут быть использованы для модуляции процессов воспаления в эпидермисе, связанных с дисрегуляцией и/или десинхронизацией процессов клеточной пролиферации и дифференцировки.

Ключевые слова: высокоминерализованные воды, гиперосмотический стресс, кератиноциты, пролиферация, дифференцировка.

В физиологических условиях процессы пролиферации и последующей дифференцировки кератиноцитов кожи в направлении от базального к роговому слою обеспечивают формирование эпидермального барьера, одна из функций которого состоит в защите внутренней среды организма. При ряде заболеваний кожи, в частности при atopическом дерматите, происходит усиление пролиферации клеток кожи и нарушение их последующей дифференцировки, а также угнетение апоптоза, что приводит к нарушению барьерных свойств эпидермиса и избыточности продуктивной фазы воспаления [1].

Одним из методов лечения atopического дерматита является бальнеотерапия высокоминерализованными природными водами, в частности рапой, полученной из воды озера Малое Островное Краснозерского района Новосибирской об-

ласти [4]. После воздействия рапой на очаги лихенификации кожи, проявляющейся, наряду с другими симптомами, повышенной пролиферацией кератиноцитов, снижается интенсивность воспаления и пролиферативных акантозов, исчезают косметические проявления воспаления [2, 3]. Однако механизмы, лежащие в основе описанных эффектов, остаются недостаточно изученными.

В качестве модели кератиноцитов человека в работе использована клеточная линия HaCaT, полученная из спонтанно трансформированных эпителиальных клеток кожи взрослого человека [5]. Клетки линии HaCaT сохраняют полный дифференцировочный потенциал, и, в определенных условиях, экспрессируют классические маркеры дифференцировки кератиноцитов, такие как цитокератины-1 и 10, инволюкрин и филаггрин.

Зайцева Н.С. – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов физиологии и патологии клетки, e-mail: nszaitseva@gmail.com

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

Кожин П.М. – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов физиологии и патологии клетки, e-mail: kozhinpr@gmail.com

Лемза А.Е. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов физиологии и патологии клетки, e-mail: lemza.ae@gmail.com

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

Лузгина Н.Г. – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов физиологии и патологии клетки, e-mail: ngluzgina@gmail.com

Клетки данной линии способны полноценно дифференцироваться и образовывать многоядные упорядоченные пласты [6, 7].

Цель работы – исследовать *in vitro* клеточные механизмы гиперосмотического стрессирования кератиноцитов человека природными высокоминерализованными водами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клетки линии HaCaT культивировали в среде F12/DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 4,5 мг/мл глутамина, 50 ЕД/мл пенициллина, 200 мг/мл трептомицина (полная ростовая среда) (Invitrogen, США) при 37 °C в 5 % атмосфере CO₂.

Гиперосмотическое воздействие на клетки линии HaCaT моделировали добавлением в культуральную среду раствора соли «Рапан» (rP) из рапы озера Малое Островное Краснозерского района Новосибирской области в концентрациях 2, 4 и 8 г/л.

Для определения количества жизнеспособных клеток использовали МТТ-тест. После образования полумонослоя в лунках культурального планшета клетки культивировали в течение 24 ч с rP в диапазоне концентраций 2–8 г/л, после чего добавляли МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0,15 мг/мл. Через 3 ч среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (Биолот, Россия) и измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 540 нм, используя планшетный спектрофотометр BioTek ELx808 (Biotek, США).

Для определения пролиферативной активности клеточную суспензию инкубировали в течение 10 мин с 20 мкМ раствором сукцинимидильного эфира карбоксиметилфлуоресцеина (CFSE, Sigma-Aldrich) при 37 °C в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4, Биолот, Россия), содержащем 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA, Amresco-Inc., США). После инактивации избытка CFSE PBS клетки ресуспендировали в полной ростовой среде, рассаживали в лунки 96-луночного планшета и культивировали в течение 24 ч с rP в диапазоне концентраций 2–8 г/л, после чего отмывали и меняли культуральную среду. Флуоресценцию CFSE измеряли через 24 и 48 ч после отмывки, используя проточный цитофлуориметр FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Исследование клеточного цикла проводили при помощи йодида пропидия (Sigma-Aldrich, США). После культивирования с rP в течение заданного времени клетки снимали с культураль-

ного пластика, отмывали от культуральной среды PBS и фиксировали в ледяном 70 % этаноле в течение 2 ч, после чего инкубировали в течение 15 мин в гипотоническом растворе йодида пропидия (PI, Sigma, США) с РНКазой (Invitrogen, США) (10 мл 0,1 % Triton X-100 (Биолот, Россия), 2 мг РНКазы, 20 мкг/мл PI). Флуоресценцию PI определяли с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur.

Индукцию апоптоза и некроза определяли по величине трансмембранного митохондриального потенциала (с помощью флуоресцентного красителя 3,3'-дигексилоксакарбоцианина йодида, DiOC₆, Invitrogen, США) и целостности клеточной мембраны (по проницаемости для PI) соответственно. Для этого кератиноциты инкубировали в течение 15 мин при +37 °C в полной культуральной среде, содержащей 40 нМ DiOC₆, затем отмывали от избытка красителя раствором PBS и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в PBS, содержащем 10 мкг/мл PI. После однократной отмывки флуоресценцию клеток ($\lambda_{\text{Em}} = 520$ нм для DiOC₆ и $\lambda_{\text{Em}} = 670$ нм для PI) измеряли с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur. Клетки с высоким значением интенсивности флуоресценции DiOC₆ и неповрежденной клеточной мембраной принимали за жизнеспособные, клетки со сниженным митохондриальным потенциалом и непроницаемые для PI – за находящиеся на ранних стадиях апоптоза, клетки с нарушенной целостностью мембраны – за некротически измененные клетки.

Индукцию терминальной дифференцировки оценивали по экспрессии филаггрина и лорикрина при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания. Клетки инкубировали на покровных стеклах в течение 24 ч с добавлением различных концентраций rP. После отмывки от rP клетки помещали в полную культуральную среду еще на 48 ч. Препараты фиксировали в 4%-м растворе формалина в PBS, пермеабилizировали в растворе 0,125 % Тритона X-100 в течение 3 мин, затем 2 раза отмывали PBS (pH 7,4) и инкубировали с блокирующим буфером (2 мг/мл BSA в PBS) в течение 30 мин. Все процедуры проводили при комнатной температуре. Не отмывая, препараты инкубировали в течение 2 ч с разведенными в блокирующем буфере поликлональными антителами кролика к филаггрину и лорикрину (Abcam, Великобритания; ab24584 и ab85679 соответственно), затем отмывали PBS (2 раза по 10 мин), инкубировали с флуоресцентно мечеными антителами к иммуноглобулинам кролика (Abcam, ab15085; ab150087) и вновь отмывали PBS 2 раза по 10 мин. Ядра окрашивали DAPI в антифей-

де ProlongGold (Invitrogen). Последующий анализ готовых препаратов проводили при помощи конфокальной микроскопии на лазерном сканирующем микроскопе LSM710 с использованием программного обеспечения ZEN 2011 (Carl Zeiss, Германия).

Достоверность различия средних величин исследуемых параметров определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Фишера, наличие и степень корреляционной зависимости определяли с помощью критерия Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты МТТ-теста (рис. 1, А) свидетельствуют о том, что, начиная с концентрации рР 2 г/л, имело место дозозависимое уменьшение общего количества жизнеспособных клеток, что можно объяснить наличием цитотоксических (индукция апоптоза или некроза) или цитостатических (торможение пролиферации) свойств рР.

Для проверки наличия цитотоксических свойств рР было исследовано количество клеток с признаками различных типов гибели (см. рис. 1, Б). Культивирование кератиноцитов с рР в концентрациях, приводящих к значительному сокращению количества жизнеспособных клеток в культуре, вызывало апоптоз лишь у незначительного количества клеток (8 г/л) либо вовсе не обладало апоптогенным эффектом (4 г/л). Также не наблюдалось усиления некротической гибели кератиноцитов, подвергнутых воздействию рР.

Было проведено исследование темпов пролиферации клеток под действием указанных концентраций рР при помощи трейсерного флуоресцентного красителя CFSE, по степени разведения

которого судили о количестве совершенных за заданное время актов деления (рис. 2, А). Обнаружено, что в экспериментальных группах величина пролиферирующего пула клеток по сравнению с контролем не изменялась, но воздействие рР в концентрациях 4 и 8 г/л приводило к снижению количества клеток, совершивших более одного деления. Этот эффект наблюдался через 24 и 48 ч после начала инкубирования с рР.

При исследовании клеточного цикла клеток НаСаТ было выявлено, что через 24 ч после воздействия рР в концентрациях 4 и 8 г/л количество клеток, находящихся в фазах G0/G1, существенно увеличивалось относительно контроля и, соответственно, снижалось количество кератиноцитов, находящихся в фазах S и M/G2. Однако через 48 ч кератиноциты, обработанные рР, восстанавливали нормальный характер распределения по фазам клеточного цикла (см. рис. 2, Б).

При исследовании признаков индукции терминальной дифференцировки наблюдалось заметное усиление экспрессии основных маркеров дифференцировки кератиноцитов – филагтрина и лорикрина, и их накопление в цитоплазме (рис. 3) через 72 ч после начала инкубации клеток с рР в концентрации 8 г/л.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения клеток линии НаСаТ под влиянием высокоосмотических рР в целом напоминают эффекты, описанные для гиперосмотического стресса. К ним относят арест клеточного цикла, торможение транскрипции и трансляции, деполаризацию митохондриальных мембран с последующей гибелью клеток путем апоптоза или некроза [8].

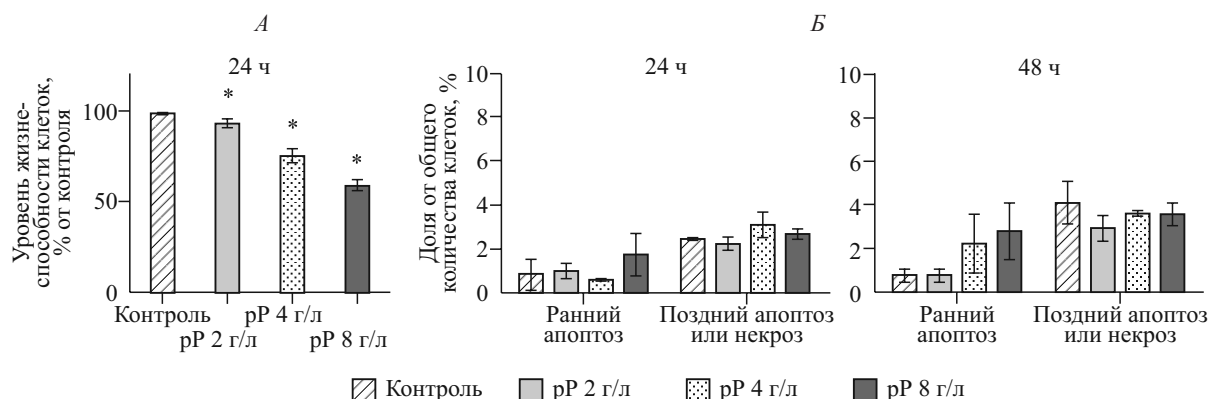


Рис. 1. А – жизнеспособность клеток линии НаСаТ через 48 ч после гиперосмотического воздействия растворами соли «Рапан». Здесь и далее * – отличие от величины соответствующего показателя в контроле статистически значимо при $p < 0,05$. Б – уровень апоптотической и некротической гибели клеток линии НаСаТ через 24 и 48 ч после гиперосмотического воздействия

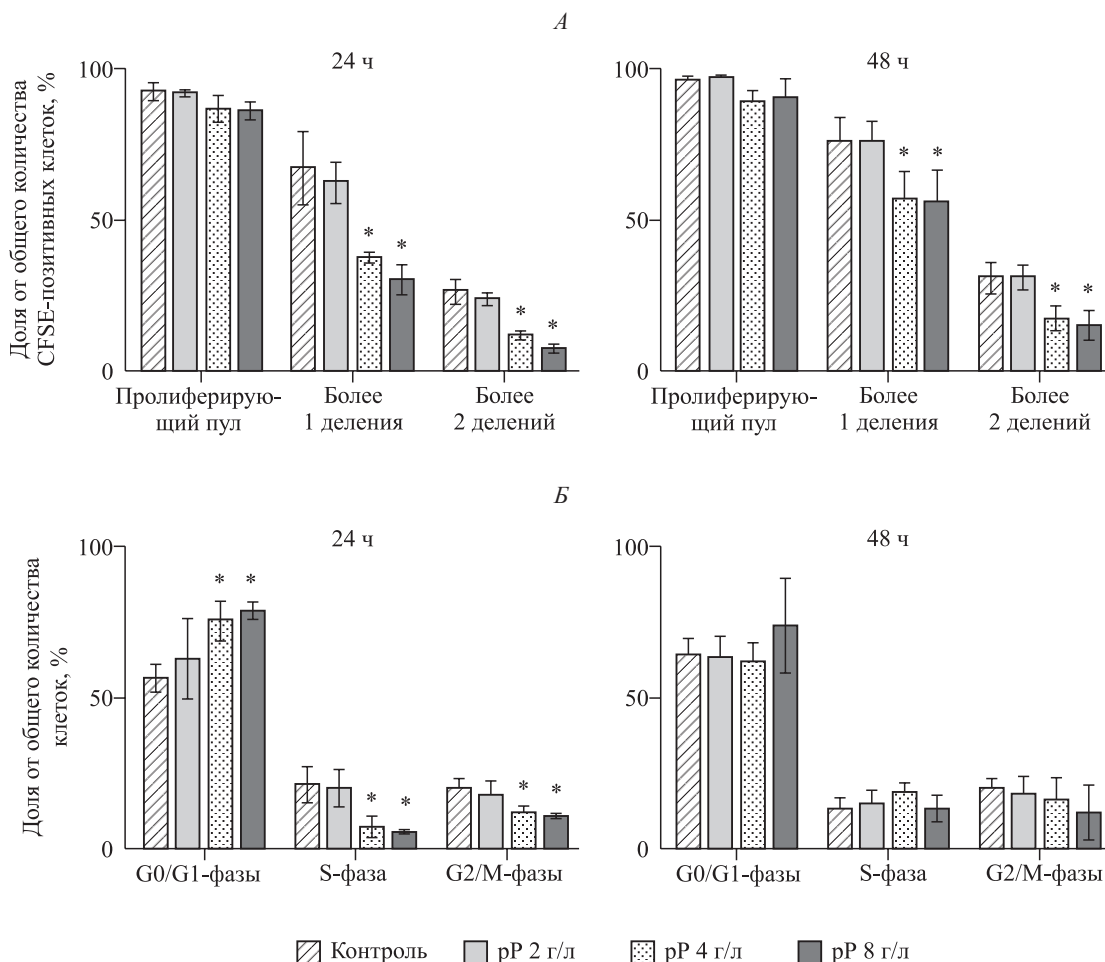


Рис. 2. А – пролиферативная активность кератиноцитов линии HaCaT через 24 и 48 ч после гиперосмотического воздействия растворами соли «Рапан»; Б – распределение кератиноцитов линии HaCaT по фазам клеточного цикла спустя 24 и 48 ч после инкубации с растворами соли «Рапан»

В то же время для гиперосмотического воздействия характерен запуск внутриклеточных механизмов адаптации, направленных на восстановление внутриклеточного ионного гомеостаза (в частности, усиление экспрессии белков теплового шока). Благодаря этим механизмам при низкой интенсивности гиперосмолярного воздействия возможно восстановление нормальной клеточной структуры и функций, в том числе клеточного цикла [8].

rP в концентрациях 4 и 8 г/л вызывает торможение пролиферации кератиноцитов линии HaCaT, продолжающееся в течение 48 ч после окончания воздействия. При этом в первые 24 ч возрастает количество клеток, находящихся в фазе G0/G1, что, однако, не приводит в дальнейшем к их смерти. Кроме того, показано увеличение экспрессии лорикрина и филагтрина в цитоплазме клеток через 72 ч после воздействия rP,

что свидетельствует о начале дифференцировки этих клеток. Подобным образом кератиноциты реагируют на различные высокоосмолярные соединения [11], что свидетельствует в пользу гиперосмотического стресса как одного из механизмов воздействия рапы на кератиноциты.

Вероятно, торможение пролиферации обусловлено активацией стресс-активируемой протеинкиназы p38 MAPK, отвечающей за регуляцию клеточного цикла, в частности, в условиях гиперосмотического стресса [9]. В свою очередь, киназа p38 увеличивает экспрессию белков теплового шока, в том числе HSP27, который участвует в сборке кератинов. Уровень активации HSP27 положительно коррелирует с темпом дифференцировки кератиноцитов [10]. К отсроченным эффектам активации p38 относится усиление пролиферации клеток, опосредованное повышением уровня экспрессии рецептора к эпидермальному

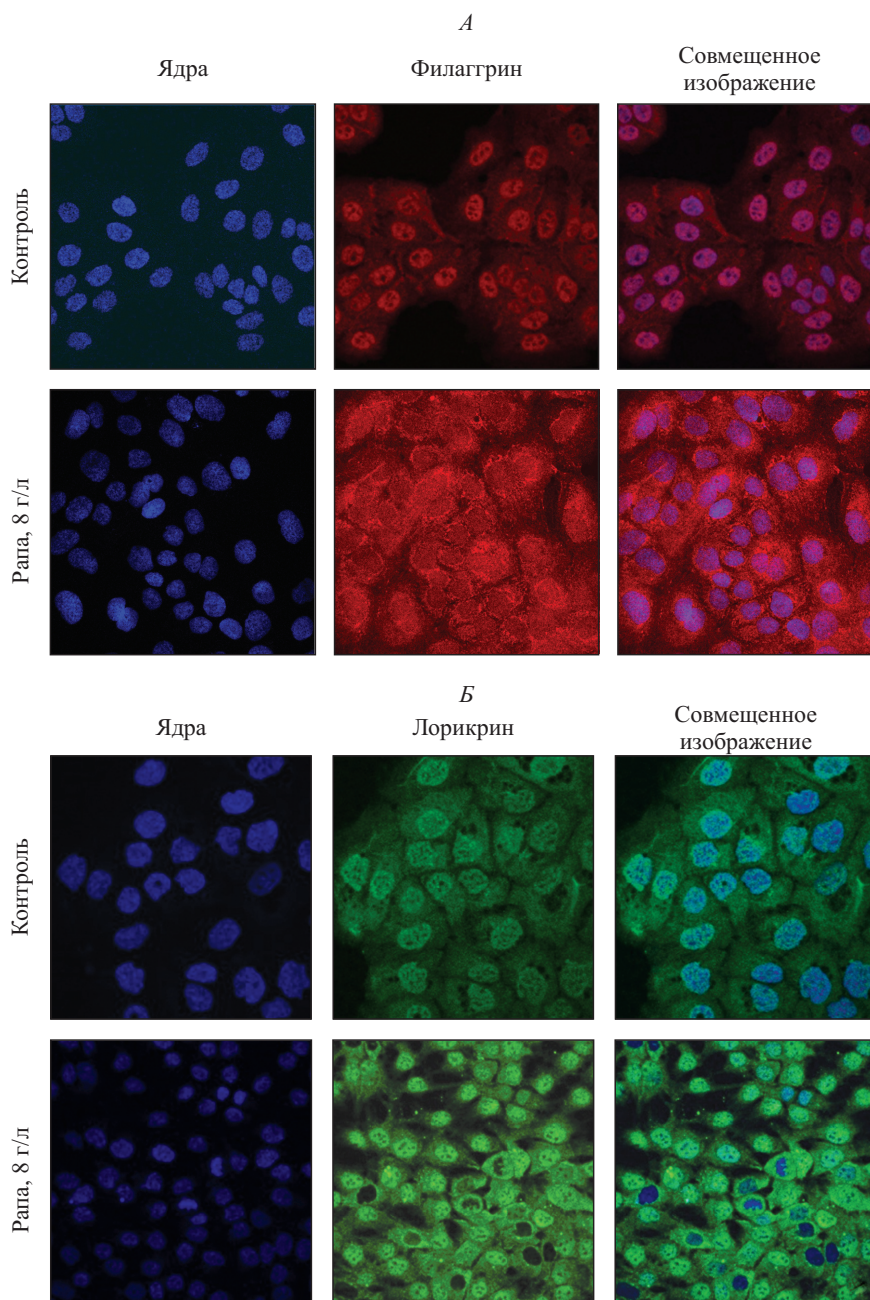


Рис. 3. Внутриклеточное распределение филлагрина (А) и лорикрина (Б) кератиноцитами линии HaCaT после воздействия раствором соли «Рапа» (rapa) в концентрации 8 г/л. Фотографии получены на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM710 (Carl Zeiss). Увеличение $\times 400$

фактору роста [9]. В то же время в настоящем исследовании не наблюдалось повышения темпов клеточного деления, а лишь отмечалось восстановление нормальной динамики клеточного цикла.

Вероятно, влияние рР на кератиноциты не может быть объяснено только развитием гипертонического стресса. В связи со сложным составом использованной рапы не исключены и другие возможные механизмы ее влияния на пролиферацию

и дифференцировку – в частности, развитие окислительного стресса либо прямое вмешательство компонентов соли в передачу сигналов по внутриклеточным путям, что требует дальнейшего изучения. Более полное представление о механизмах действия рапы на пролиферирующие кератиноциты позволит создать эффективные схемы лечения заболеваний кожи, ассоциированных с состояниями воспаления и гиперпролиферации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 8788 и ГК № 16.552.11.7057)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кунгуров Н.В., Сазонов С.В., Кохан М.М. Особенности пролиферативных процессов в эпидермисе больных с различными типами атопического дерматита // Вестн. дерматол. венерол. 2000. (4). 24–27.
2. Лузгина Н.Г., Шкуруний В.А., Потапова О.В. и др. Особенности морфологических проявлений хронического воспалительного процесса в коже больных атопическим дерматитом при воздействии высокоминерализованными водами // Сибирский консилиум. 2007. (4). 114–115.
3. Лузгина Н.Г., Шкуруний В.А., Потапова О.В. Клинико-морфологические проявления атопического дерматита, ассоциированного с синдромом недифференцированной дисплазии соединительной ткани // Рос. иммунол. журн. 2008. 2. (11). 218.
4. Потапова О.В., Лузгина Н.Г., Шкуруний В.А. Патоморфологическая характеристика лихеноидных поражений кожи больных атопическим дерматитом при лечении природными высокоминерализованными водами в сочетании с ультрафиолетовым излучением // Дерматология. 2006. (2). 107–111.
5. Boukamp P., Tilgen W., Dzarlieva R.T. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin // J. Natl. Cancer Inst. 1982. 68. (3). 415–427.
6. Boukamp P., Rupniak H.T., Fusenig N.E. Environmental modulation of the expression of differentiation and malignancy in six human squamous cell carcinoma cell lines // Cancer Res. 1985. 45. 5582–5592.
7. Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line // J. Cell Biol. 1988. 106. (3). S761–771.
8. Burg M.B., Ferraris J.D., Dmitrieva N.I. Cellular response to hyperosmotic stresses // Physiol. Rev. 2007. 87. 1441–1474.
9. Garmyn M., Mammone T., Pupe A. et al. Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27 // J. Invest. Dermatol. 2001. 117. (5). 1290–1295.
10. Jonak C., Klosner G., Trautinger F. Heat shock proteins in the skin // Int. J. Cosmetic Sci. 2006. 28. 233–241.
11. Mammone T., Ingrassia M., Goyarts E. Osmotic stress induces terminal differentiation in cultured normal human epidermal keratinocytes // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 2008. 44. (5–6). 135–139.

EFFECTS OF NATURALLY OCCURRING HIGHLY MINERALIZED WATER ON HUMAN KERATINOCYTES IN VITRO

**Natal'ya Sergeevna ZAYTSEVA, Anton Vladimirovich CHECHUSHKOV,
Petr Mikhaylovich KOZHIN, Anna Evgen'evna LEMZA,
Viktor Olegovich TKACHEV, Nalaliya Gennad'evna LUZGINA**

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

Naturally occurring highly mineralized water is widely used in skin diseases treatment. At the same time, mechanisms underlying its effects on human skin cells are poorly understood. In the present study the brine from Maloe Ostrovnnoe Lake in non cytotoxic concentrations had been shown to induce cell cycle arrest in G0/G1 phase followed by attenuation of cell proliferation and increased expression of differentiation markers: loricrin and filaggrin. This observation shows onset of keratinocyte terminal differentiation, and could be used for modulation of inflammatory processes in epidermis associated with dysregulation and/or desynchronisation of cellular proliferation and differentiation.

Key words: mineral water, hyperosmotic stress, keratinocytes, proliferation, differentiation.

*Zaytseva N.S. – researcher of laboratory of cell physiology and pathology molecular mechanisms,
e-mail: nszaitseva@gmail.com*

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

*Kozhin P.M. – researcher of laboratory of cell physiology and pathology molecular mechanisms,
e-mail: kozhinpm@gmail.com*

*Lemza A.E. – junior researcher of laboratory of cell physiology and pathology molecular mechanisms,
e-mail: lemza.ae@gmail.com*

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

Luzgina N.G. – candidate of medical sciences, leading researcher of laboratory of cell physiology and pathology molecular mechanisms, e-mail: ngluzgina@gmail.com

ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОЕКТА CHERISH

Игорь Николаевич ЛЕБЕДЕВ¹, Людмила Павловна НАЗАРЕНКО¹,
 Анна Александровна КАШЕВАРОВА¹, Николай Алексеевич СКРЯБИН¹,
 Ольга Александровна САЛЮКОВА¹, Наталья Николаевна ЧЕЧЁТКИНА¹,
 Екатерина Николаевна ТОЛМАЧЁВА¹, Елена Александровна САЖЕНОВА¹,
 Светлана Леонидовна ВОВК¹, Алексей Анатольевич РУДКО¹,
 Валерий Павлович ПУЗЫРЁВ¹, Памела МАГИНИ², Клаудио ГРАЦИАНО²,
 Джованни РОМЕО²

¹ ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН
 Россия, 634050, Томск, Набережная р. Ушайки, 10

² Alma Mater Studiorum – Università di Bologna
 Italy, 40126, Bologna, Via Zamboni, 33

Умственная отсталость – чрезвычайно гетерогенное заболевание, как с генетической, так и с клинической точек зрения. В большинстве случаев ее диагностика по-прежнему остается основанной на клиническом обследовании пациента и не включает молекулярно-генетическое тестирование. Получение новых знаний о наследственных причинах умственной отсталости и улучшение ее диагностики за счет применения современных высокопроизводительных геномных технологий явились основными целями исследовательского проекта «Улучшение диагностики умственной отсталости у детей в Центральной Восточной Европе и Центральной Азии через генетическую характеристику, биоинформатику и статистику» (CHERISH), выполненного при поддержке 7 Рамочной программы Европейского союза в 2009–2012 гг. научными коллективами 9 европейских стран, включая Россию. В настоящей статье представлена информация о данном проекте и его основных результатах.

Ключевые слова: умственная отсталость, врожденное слабоумие, матричная сравнительная геномная гибридизация, микроделеционные/микродупликационные синдромы, вариации числа копий ДНК, секвенирование нового поколения.

GENOMIC TECHNOLOGIES FOR DIAGNOSIS OF INTELLECTUAL DISABILITY: RESULTS OF THE «CHERISH» PROJECT

Igor Nikolaevich LEBEDEV¹, Lyudmila Pavlovna NAZARENKO¹,
 Anna Aleksandrovna KASHEVAROVA¹, Nikolay Alekseevich SKRYABIN¹,
 Olga Aleksandrovna SALYUKOVA¹, Natalia Nikolaevna CHECHETKINA¹,
 Ekaterina Nikolaevna TOLMACHEVA¹, Elena Aleksandrovna SAZHENOVA¹,
 Svetlana Leonidovna VOVK¹, Aleksei Anatol'evich RUDKO¹,
 Valeriy Pavlovich PUZYREV¹, Pamela MAGINI², Claudio GRAZIANO²,
 Giovanni ROMEO²

¹ Institute of Medical Genetics of SB RAMS
 Russia, 634050, Tomsk, Ushaika str., 10

² Alma Mater Studiorum – Università di Bologna
 Italy, 40126, Bologna, Via Zamboni, 33

Intellectual disability is a highly heterogeneous disorder both from genetic and clinical point of view. In most cases of idiopathic mental retardation the diagnosis is still based on clinical examination only and not involved molecular genetic testing. Generation of new knowledge about hereditary causes of intellectual disability and improving its diagnosis

through the application of modern high-throughput whole genome technologies was the main goal of the CHERISH project implemented within the 7th Framework Program of the European Union in 2009–2012 in 9 European countries, including Russia. Information about the project and its key results is given in this article.

Key words: intellectual disability, mental retardation, array-CGH, microdeletion/microduplication syndromes, copy number variation (CNV), next generation sequencing.

INTRODUCTION

Intellectual Disability (ID) is a neuro-developmental disorder characterized by a substantial limitation in cognitive functioning ($IQ < 70$), disturbances of adaptive and social behavior that manifests before the age of 18 years. It is one of the main disabling conditions in children, and is estimated to affect 2–3 % of the population. The frequency of the most severe forms (IQ less than 30) consists of 15 % among all cases of ID [32].

ID is a highly heterogeneous disorder, with the majority of cases (25–45 %) recognizing a genetic etiology. Chromosomal aberrations, such as aneuploidy, deletions, duplications and translocations, cause ID in approximately 30–35 % of all patients, in particular in syndromic cases, which accompany other clinical features. Tens of new microdeletion/microduplication syndromes associated with ID were described during last years due to application of high-resolution arrays technologies in cytogenetic studies [33]. However, the most cases of ID in patients with normal karyotype remain undiagnosed.

As regards to single gene bases of ID, it is known about 140 forms of syndromic X-linked ID, with

Martin-Bell syndrome is the most frequent, and 95 variants of non-syndromic ID. Primary gene defect is found for approximately 66 syndromic forms, whereas only specific X-chromosome regions are mapped for 50 forms [30]. Gene mutations are known for less than 50 % of non-syndromic X-linked ID. It is reported about mutations in 20 genes, which are associated with non-syndromic forms. They are genes of 5 protein's groups – transmembrane receptors, small GTP-regulators and effectors, enzymes and translation regulators [3]. A total of 80 genes were associated with X-linked ID [30].

Less definite situation is still remaining for autosomal forms of ID. It was no reports about gene mutations responsible for autosomal dominant ID. As concerns to autosomal recessive ID, which accounts for 25 % of mental retardation cases, 14 regions of linkage only were known several years ago before the introduction of the high-throughput technologies of next generation sequencing. Previously it was reported about mutations in 6 genes, which products belong to families of serine proteases (*PRSS12* – neurotrypsin) [24]. ATP-dependent proteases (*CRBN* – cereblon) [11], calcium-dependent transcription repressors (*CC2D1A*) [4], transmembrane glutamate

Лебедев И.Н. – д.б.н., зав лабораторией цитогенетики, e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Назаренко Л.П. – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, e-mail: ludmila.nazarenko@medgenetics.ru

Кашеварова А.А. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики, e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Скрябин Н.А. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики, e-mail: skryabinn@mail.ru

Салюкова О.А. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории наследственной патологии, e-mail: olga.salukova@mail.ru

Чечеткина Н.Н. – аспирант, e-mail: valet@mail.ru

Толмачева Е.Н. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики, e-mail: kate.tolmacheva@medgenetics.ru

Саженова Е.А. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики, e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Вовк С.Л. – зав. клинко-диагностической лабораторией генетической клиники, e-mail: svetlana.vovk@medgenetics.ru

Рудко А.А. – к.м.н., главный врач генетической клиники, e-mail: aleksey.rudko@medgenetics.ru

Пузырев В.П. – д.м.н., проф., академик РАМН, директор, e-mail: valery.puzryrev@medgenetics.ru

Magini Pamela – PhD, Laboratory of medical genetics, department of gynecology, obstetrics and pediatrics sciences, e-mail: pamelamagini@unibo.it

Graziano Claudio – MD, Laboratory of medical genetics, Department of gynecology, obstetrics and pediatrics sciences, e-mail: claudio.graziano@unibo.it

Romeo Giovanni – professor of medical genetics, medical school, e-mail: romeo@eurogene.org

receptors (*GRIK2*) [25], NF- κ B signaling proteins (*TRAPPC9*) [23, 28], and enzymes of long chain fatty acids conversion (*TECR*) [5].

Introduction of next generation sequencing rapidly increases the number of genes responsible for ID. At present this list contains approximately 50 genes [6, 26]. Mutations in more than 450 genes have been associated with ID and related cognitive disorders, such as autism [32]. However, majority of these mutations are reported in single patients or families. This means, that molecular epidemiology of new genetic variants associated with ID in different populations remains undefined. As before, the identification of primary gene defect responsible for ID in given patient is a hard task due to significant clinical and genetic heterogeneity as well as usual lack of national specific registers. In most cases the diagnosis of ID is still based on clinical examination only and not involved molecular genetic testing. Recent advances in gene identification techniques have revolutionized the clinical approach to ID. Thus, the search of new hereditary mutations involved in ID pathogenesis and development of standard for molecular genetic diagnosis of ID in childhood is a challenge for current basic and clinical research.

THE CHERISH PROJECT: MAIN TASKS

This aim was pursued during implementation of the research project within 7th Framework Program of the European Union «Improving diagnosis of mental retardation in children in Eastern Europe and Central Asia through genetic characterization and bioinformatics/statistics (CHERISH)» (grant agreement № 223692). The overall goal of the CHERISH project was to establish an interdisciplinary Eastern Europe and Central Asia consortium of experts to perform a research program of clinical, scientific and public activities for generation of new knowledge about genetic causes of ID. The main objectives of the project were: 1) the development of a standardized approach for clinical diagnosis of ID; 2) the creation of large database and bio-bank of DNA samples from patients with clinically well defined ID of unknown genetic etiology; 3) the identification of cryptic chromosomal rearrangements by molecular cytogenetic analysis; 4) the identification of new mutations and genes responsible for ID by linkage analysis in familial cases, sequencing of known genes and whole exome sequencing of the patients with ID; 5) the dissemination of knowledge about the project and its results in scientific publications, meetings and workshops for researchers, clinicians and society.

Ten Universities and research Institutes from 9 European and former USSR countries were involved in the investigations:

- 1) Alma Mater Studiourum – Università di Bologna, Italy (project coordinator);
- 2) University of Tartu (Institute of Molecular and Cell Biology), Estonia;
- 3) Vilnius University (Department of Human and Molecular Genetics), Lithuania;
- 4) Charles University of Prague (Department of Biology and Medical Genetics), Czech Republic;
- 5) Poznan University of Medical Sciences (Department of Medical Genetics), Poland;
- 6) Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine;
- 7) The Cyprus Institute of Neurology and Genetics (Department of Cytogenetics), Nicosia, Cyprus;
- 8) Institute of Medical Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russia;
- 9) Center of Medical Genetics and Primary Health Care, Erevan, Armenia;
- 10) European Genetic Foundation, Bologna, Italy.

PATIENTS SELECTION FOR THE STUDY: CLINICAL AND GENETIC CRITERIA

During the first Work Package of the CHERISH project an interdisciplinary Eastern European and Central Asia consortium of experts was established in order to lay down a basis for a significant improvement of clinical, educational and laboratory diagnostic developments in the field of genetics of ID. A standardized approach for the diagnosis of ID with common criteria for patient selection was defined, and allowed the creation of a large sample's collection of patients with clinically well defined ID. The consortium identified a web-based «Cartagenia» database tool [16] for the management of all the information regarding the phenotypic and genetic characteristics of the included patients, in order to obtain a secure system to share data to which the partners only could have access; this tool also allowed sample anonymization to be a routine process. Partners collected a blood sample from every patient enrolled in the project. For sporadic cases, samples from parents were collected whenever possible, while for familial cases, blood samples collection included patients and other family members who gave their informed consent.

One thousand and four hundred fifty seven patients with idiopathic ID (including 206 children recruited by Genetic Clinics of the Institute of Medical Genetics, SB RAMS, Tomsk) were sampled and analyzed during the project, aiding the detection of new genetic causes of neuro-developmental disorders. Thus, the CHERISH project was the largest investi-

Table

Summary of results of genetic and biochemical tests in patients with ID

Tests	Number of analyses	Number of patients with abnormal results
Karyotyping (G-banding)	1457	51 (4 %)
FISH for known microdeletion/microduplication syndromes	153	1 (0.7%)
FISH for subtelomeric rearrangements	67	5 (7.5 %)
MLPA for subtelomeric rearrangements	164	12 (7.3 %)
FRAXA molecular genetic testing	647	2 (0.3 %)
Other molecular genetic tests including Rett, Prader-Willi and Angelman syndromes testing	373	11 (2.9 %)
Amino acids (tandem mass-spectrometry)	442	7 (1.6 %)
Urinary organic acids	243	3 (1.2 %)
Lysosomal enzymes	25	0
Lactic acid	152	6 (3.9 %)
Creatine defect (creatinine/creatinine index from urine)	32	0
Other metabolic defects	156	11 (7 %)

gation of ID in European countries and Russia. Previously in Western Europe (Netherlands, Belgium, Germany, and France) the EURO-MRX project was performed focusing on genetics of X-linked ID [17]. More than 600 families were examined and 17 new X-linked genes were discovered.

In order to be enrolled, preliminary testing of all patients included standard karyotyping and, where indicated, Fragile X, Rett, Prader-Willi, Angelman syndrome molecular testing, FISH for known microdeletion/microduplication syndromes, FISH and MLPA analysis for subtelomeric rearrangements, neuro-metabolic screening. Summary results of these tests are presented in the table. As a rule, the data obtained for the incidence of the most frequent genetic and biochemical defects associated with ID were in agreement with literature data. Patients with normal results were enrolled in the main research part of the project.

WHOLE GENOME ARRAY-BASED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION IN PATIENTS WITH INTELLECTUAL DISABILITY AND NORMAL KARYOTYPE

This part contained three Work Packages – array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) testing, analysis of families with ID, and whole exome sequencing. Analyses of chromosomal microdeletions/microduplications and copy number variations (CNV) were performed by array-CGH in University of Bologna, The Cyprus Institute of Neurology and Genetics, and Institute of Medical Genetics (Tomsk, Russia). This study was performed on 44K, 105K, and 400K whole genome arrays (Agilent Technologies, USA). A total of 378 patients were

investigated and 563 CNVs were detected. The frequency of pathogenic CNVs varied from 10 to 20 % in different observed populations that is common for patients with ID.

Eighty Russian patients were selected for array-CGH studies in Institute of Medical Genetics (Tomsk, Russia). Eleven of these patients were 3–5 years old and showed developmental delay; the other 69 patients were older than 5 years of age and had ID defined as an IQ lower than 70. Balanced karyotype was confirmed after array-CGH study for 35 children. Twenty-two patients carried only benign CNVs, which previously were observed in healthy individuals according to information of Database of Genomic Variants (DGV) [15]. A total of 27 pathogenic or likely pathogenic CNVs were detected in the other 23 affected children. Among these CNVs, microdeletions associated with known syndromes were identified in seven patients, allowing for a definite diagnosis in 9 % of the patients in the Russian group. These diagnoses were Cri du Chat syndrome, 15q24 microdeletion syndrome (two cases), 16p11.2 microdeletion syndrome (two cases), 16p12.2 microdeletion syndrome, and 22q11.2 microdeletion syndrome. Information about clinical and genetic findings in this group of patients can be obtained from our previously published study [21]. Nineteen CNVs that had not previously been associated with any known syndrome were detected in 16 patients (20 %). Below, we will focus on some interesting findings.

Case #1. A 6 years old boy with mild mental retardation (IQ = 57), hyperdynamia, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and speech delay. Array-CGH revealed a 1.155 Mb microdeletion at 11p13 (Fig. 1a). Although the deleted region seems to correspond to the location indicated in Wilms

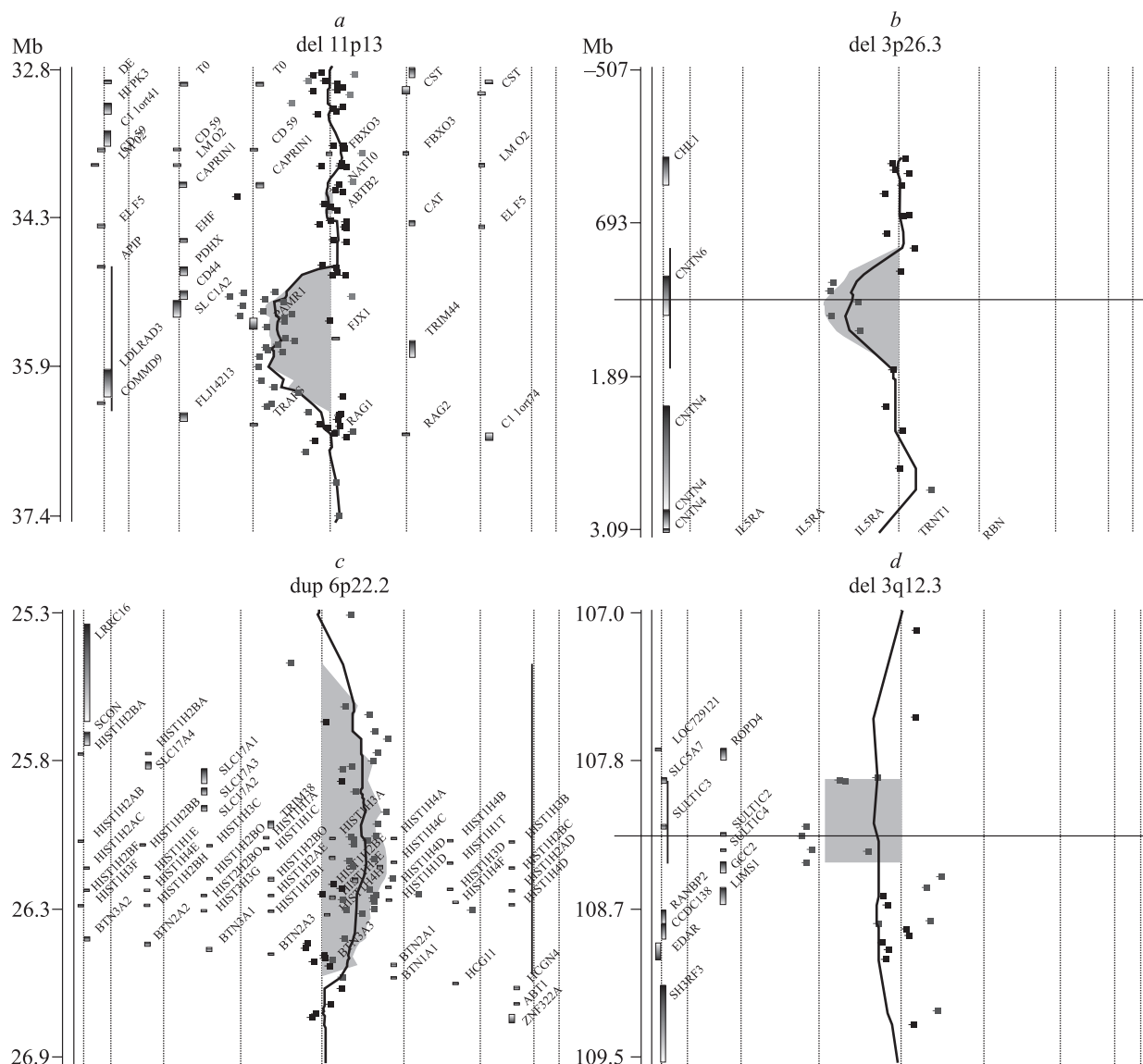


Fig. 1. Chromosomal microdeletions and microduplications detected by array-CGH in Russian patients with ID

tumor, aniridia, genitourinary anomalies and mental retardation (WAGR) 11p13 deletion syndrome (MIM 194072) [14], the precise location of the microdeletion in our patient does not overlap with the classical deletion given in DECIPHER database [13] (11:35180424-36335424 vs. 11:31806339-32457087). Thus, it is not surprising that the boy does not have the typical WAGR symptoms. However, the proband is still mentally retarded, and there are several genes within the region of the microdeletion that may be associated with ID. For example, the SLC1A2 protein is responsible for glutamate transport. The accumulation of extracellular glutamate causes a dysfunction in calcium homeostasis, increases production of NO, free radicals, and leads to activation of proteases. These factors can result in neuronal damage, leading to neurodegenerative dis-

ease, inflammation, or ischemia development [22]. The function of FJXI, the product of another gene in this region, remains unknown in humans; however, this gene product has been shown to regulate dendrite extension in rodents [2]. The product of a third gene, TRIM44, may play a role in neuronal differentiation and maturation [18]. The product of a fourth gene in this region, LDLRAD3, participates in the proteolysis of an amyloid precursor protein, leading to beta amyloid formation; this fiber form is the primary component of amyloid plaques found in the brain of Alzheimer's disease patients [29]. The 11p13 microdeletion observed in our patient was confirmed by real-time PCR.

Case #2. A 8 years old girl with mild mental retardation (IQ = 65), scrambled speech, ADHD and some clinical features: low-set ears, short philtrum,

wide-spaced nipples, shoulder pigmentation, and overweight. Array-CGH revealed a 112 kb microdeletion at 3q22.1. Among three genes located within affected region, *DNAJC13* and *ACAD11* are especially interesting. Variation in *DNAJC13* is involved in Tourette syndrome (MIM 137580) [14]. *ACAD11* belongs to a family of enzymes that participate in mitochondrial fatty acid beta-oxidation. High levels of expression of *ACAD11* have been observed in adult brains, and this protein participates in generating energy as well as likely having a role in the degradation of unique cellular lipids and catabolism of aromatic amino acids, vital compounds for neuron function [10].

Case #3. A 9 years old boy with moderate mental retardation (IQ = 47), delay of motor milestones and fine motor skills deficiency, dysarthria, ADHD, some dysmorphic features: dolichocephalic skull, mongoloid slant, divergent left strabism, protruding ears, hypoplastic antihelix and antiragus. Array-CGH identified a 766 kb microduplication at 3p26.3. The only gene located within this region is *CNTN6*, which encodes contactin 6. Significantly, contactin 6 is a neuronal membrane protein that functions as a cell adhesion molecule and may take part in the formation of axon connections in the developing nervous system. *CNTN6* and other members of this family have been identified as potentially pathogenic genes in neuro-developmental disorders. These genes have been suggested to participate in pathways important for correct brain development [34]. In contrast to case #3, a 369 kb microdeletion at 3p26.3 overlapping with *CNTN6* was identified in another patient (case #4, Fig. 1b). He was a 10 years old boy with mild mental retardation (IQ = 55). He had tower skull, frontal bossing, antimongoloid slant, epicanthus, wide nasal bridge, low-set ears, hypertrichosis, hair nevus, clinodactyly, dysarthria, ADHD. Magnetic resonance imaging (MRI) revealed lateral ventricles asymmetry as a result of outflow from left ventricles, and neurodystrophic foci due to hypoxia. It is interesting, that although the chromosomal aberrations in these cases were the reverse of one another, both patients had intellectual disability, dysarthria, and ADHD. The presence of microduplication and microdeletion of 3p26.3 in our patients was confirmed by real-time PCR.

Case #5. A 6 years old boy with mild mental retardation (IQ = 50), hydrocephaly, large protruding ears, wide-spaced nipples, abnormal hair growth, and hypertrichosis. A patient pronounces single syllables only, has an autistic signs and food fastidiousness. Array-CGH revealed a 716 kb microduplication at 6p22.2 (Fig. 1c). One of the genes within this region that has gained attention in neuroscience is *HFE*, which regulates ion homeostasis. Mutations in this

gene are commonly associated with hereditary hemochromatosis – an autosomal recessive disorder of iron metabolism (MIM 235200) [14]. It has been recently shown that the H67D polymorphism in *Hfe* in mice impacts brain iron homeostasis, creates an environment favorable for oxidative stress, and predisposes mice to neurodegenerative disorders [27]. The other gene of interest in this region is *SCGN*, which encodes secretogonin. *SCGN* is expressed in neurons in the embryonic nervous system and is confined to differentiated cells in the adult brain. Secretogonin may be implicated in the control of neuronal turnover and differentiation. This protein is also re-expressed in brain tumors. In addition, secretogonin may functions as a Ca²⁺ sensor regulating the exocytosis of neurotransmitters, neuropeptides, and hormones [1]. Microduplication of 6p22.2 in our patient was confirmed by real-time PCR.

Case #6. A 8 years old boy with mild mental retardation (IQ = 50), microcephaly, small ears, gothic palate, irregular teeth, abdominal obesity, hypogonadism, speech delay, undue fatigability, aggressiveness, auto-aggressiveness, and mood swings. Array-CGH identified a 1.95 Mb microduplication at 14q11.2. There are two genes attracting particular attention in this region: *SLC7A7* and *MMP14*. The *SLC7A7* protein transfers cationic and large neutral amino acids from the cell to the extracellular space. Mutations in the *SLC7A7* gene are found in patients with lysinuric protein intolerance (MIM 222700) [14], a multi-organ disease with a variety of clinical symptoms, including moderate intellectual disability [9]. Increased *MMP14* expression has been observed in different cancers, including brain tumors [18].

Case #7. A 12 years old boy with moderate mental retardation (IQ = 45), triangular face, protruding ears, delay in motor milestones, absent of speech (certain sounds only), seizures, aggressiveness, auto-aggressiveness, autistic signs, and ADHD. Array-CGH analysis revealed a 464 kb microdeletion at 2q12.3 (Fig. 1d). One gene in this region, *SLC5A7*, is an Na⁽⁺⁾- and Cl⁽⁻⁾-dependent high-affinity transporter that mediates the uptake of choline for acetylcholine synthesis. Acetylcholine is a neurotransmitter in the central and peripheral nervous system that regulates a variety of autonomic, cognitive, and motor functions. This gene was shown to be associated with ADHD [8].

After microarray studies, a cohort of 584 patients with normal array-CGH results was selected to undergo high-resolution CNVs analysis through Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-array. These studies were performed at the University of Bologna in Italy and at the University of Tartu in Estonia using «Genome-wide human SNP Array 6.0» (Affymetrix), which contains 950000 SNP, «HumanCNV370

BeadChip» (Illumina) with 5 kb resolution over the whole genome, and «HumanCytoSNP-12 BeadChip» (Illumina) with 300 kb resolution. Selection criteria were substantially the same as for the array-CGH analysis. SNP-arrays have the advantage of a higher resolution with respect to array-CGH, and allows the identification of stretches of homozygosity, that can suggest a region with uniparental disomy or of true homozygosity in the case of parental consanguinity, as well as the regions of loss of heterozygosity. On the other hand, due to its resolution, SNP-array analysis makes interpretation of results more complex because a high number of CNVs are identified, most of them being of benign origin. In order to exclude such neutral variations, identified CNVs were compared with those recurrently present in the Database of Genomic Variants [15] and in the databases of national general populations. The potential clinical significance of CNVs was evaluated using OMIM and DECIPHER databases and peer-reviewed literature searches in the PubMed database. As a result 228 new probably pathogenic CNVs were identified. The presence of genomic aberrations with potential clinical relevance was confirmed by quantitative PCR.

IDENTIFICATION OF NEW GENES RESPONSIBLE FOR THE DEVELOPMENT OF INTELLECTUAL DISABILITIES

One of the main objectives of the project was the identification of new genes involved in the pathogenesis of ID. The classical approach to the identification of genes is based on recognition of families with multiple affected family members, linkage analysis through the study of short tandem repeat polymorphisms, and sequencing analysis of candidate genes inside the regions showing positive linkage scores. Only a few families with sufficient size were collected by the CHERISH consortium.

Consanguineous marriages are infrequent in Italy and eastern European countries, but we identified a very interesting Italian family where 2 male siblings, born from first cousin parents (Fig. 2a), showed a peculiar and similar phenotype: early development was normal, but loss of ambulatory skills due to lower limb spasticity led them to be wheel-chair bound in the first decade of life. Motor problems were followed by progressive cognitive decline and both brothers showed severe mental delay after a few years. Brain MRI showed progressive leukoencephalopathy with cerebellar, brainstem and cervical cord atrophy, and mild hypointensity of the globi pallidi on T2 weight images. Electromyography / nerve conduction studies and muscle biopsy were normal. Neurometabolic investigations were negative, except for the presence of trace amounts of urinary sulfatides. They have a normal sister and brother.

On a first basis, X-linked Pelizaeus Merzbacher Disease (MIM 312080) [14] was excluded through mutation analysis of the *PLP1* gene. The asset of this family seemed excellent in order to perform linkage analysis. Blood was collected from both the affected and healthy sibs and from their parents. DNA was extracted from the blood samples and autozygosity mapping was performed by means of a 6090 SNPs Illumina Infinium-12 genome wide scan. Three regions, which were heterozygous in the parents, were inherited in homozygosity by the affected brothers but not by the healthy offspring: on chromosome 1 (7.4 Mb between SNPs rs1619856 and rs1342872), on chromosome 3 (14.1 Mb between SNPs rs1017967 and rs1039524) and on chromosome 16 (18.4 Mb between SNPs rs30882 and rs1037973). Evaluating the genes contained in the longest autozygous region on chromosome 16q22-23, the most striking candidate was Fatty Acid 2-Hydroxylase (*FA2H*), since homozygous mutations in *FA2H* were recently shown to be associated with leukodystrophy with spastic para-

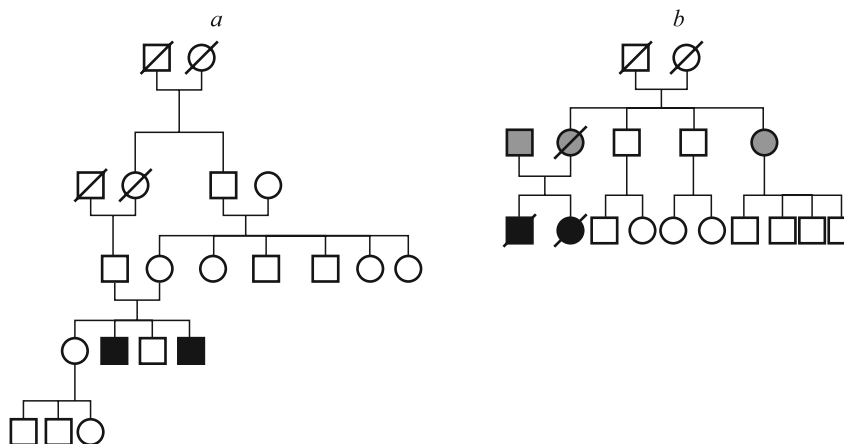


Fig. 2. Pedigrees of Italian families with mutation in *FA2H* (a) and deletion of 7q31.32 (b)

pareisis and dystonia, complicated by neurodegeneration with brain iron accumulation [7].

Sequencing of *FA2H* coding region led to the identification of a homozygous c.270+3A>T mutation in the affected individuals. Parents were heterozygous while the healthy brother and sister, as well as 150 ethnically matched control individuals, showed the reference wild type genotype. We then retrotranscribed and amplified the *FA2H* specific cDNA with PCR primers on exons 1 and 2. Compared to the wild type control, a longer cDNA fragment was amplified in one of the homozygous patients and in his heterozygous mother, resulting in a band of higher molecular weight in the agarose gel run. Sequencing of the cDNA demonstrated the insertion of a 97 base pairs intronic sequence with consequent frame shift and creation of a premature stop codon after 42 amino acids in exon 2. Overall, these findings indicate that we have identified the causative *FA2H* mutation in this family.

In another family a 250 kb deletion of 7q31.32 involving one gene, *CADPS2*, was identified by array-CGH (44K, Agilent Technologies) in patient with normal karyotype, affected by mild mental ID and generalized epilepsy with normal brain imaging. The same deletion was identified in his affected sister, who shows highly similar clinical features, but was absent in their father and aunt (Fig. 2b). It is thus likely to be maternally inherited: the mother died with breast cancer but was reported to show behavioural abnormalities. The deletion was characterized in detail by quantitative real-time PCR and maps between exon 4 and exon 28 of this large gene, resulting in a complete disruption of the gene product. Sequencing of *CADPS2* was performed in the proband, in the hypothesis of a recessive disorder, but no point mutations were present.

This gene encodes a member of the calcium-dependent activator of secretion (CAPS) protein family, which are calcium binding proteins that regulate the exocytosis of synaptic and dense-core vesicles in neurons and neuroendocrine cells. Several lines of evidence suggest that *CADPS2* is good candidate gene for ID and autism spectrum disorders (ASD), given that: 1) it is involved in the release of neurotrophins such as BDNF/NT3, as shown from studies on animal models (mice) where *Cadps2* was “knocked out”; these mice are also reported to show autistic traits [31]; 2) alternative spliced forms lacking important domains have been reported to be more frequent in individuals with autism or with lower IQ compared to controls, although data from different groups are controversial; 3) *CADPS2* maps to the AUTS1 locus, one of the few linkage intervals for autism susceptibility identified from many independent groups. Therefore, a mutation screening of

CADPS2 was performed in 120 ID/ASD sporadic patients, in order to identify other putative deleterious variants. All exon and exon-intron boundaries were analyzed by direct sequencing of the PCR products. Novel variants M630T and F645V in exon 13 and V1137M in exon 26 were identified. All variants were not found in 500 control chromosomes (250 Italian healthy individuals). But it is important that M630T and F645V mutations were identified once in the group of 46 patients with ASD, whereas V1137M was detected in one from 36 individuals from the additional cohort of Italian patients with ID.

The segregation of all variants was evaluated in the corresponding pedigrees and an excess of maternal transmission was identified. In particular, the change in exon 26 was inherited from the mother and was not found in an unaffected brother. Conversely, the mutation in exon 13 was of paternal origin. These data suggested possible parent-of-origin and/or imprinting effects of these coding changes. Considering that *CADPS2* maps to chromosome 7q31, where a cluster of imprinted genes has already been reported, the expression analysis of the different parental alleles of *CADPS2* was performed in controls and affected individuals of whom blood RNA was available, and in some samples from archive of different brain tissues regions. Monoallelic expression from maternal chromosome in the brain, but biallelic in lymphocytes was found.

Technological development that took place after the beginning of the project in 2009 gave the opportunity to analyze almost all the known exons of an individual in one single experiment at a reasonable cost. This technology, termed Whole-Exome Sequencing (WES), allowed the identification of disease-causing genes of various genetic disorders in the last years, but has also opened the possibility to speed up the molecular diagnosis of heterogeneous genetic disorder such as ID. The main issue with WES is the analysis of the hundreds of genetic variants identified in every single patient. This technology revolutionized the way to disease-causing gene identification, rapidly making the classical approach obsolete. The knowledge of linkage regions in a specific family (or of homozygosity stretches in consanguineous families) can nevertheless help the process of gene prioritization, given the extremely high number of variants identified with WES.

Affected individuals from families with ID were selected for WES in the CHERISH project. Only families with multiple ID affected members were selected: 3 families with an X-linked pattern of inheritance, 1 family with an autosomal dominant pattern, 6 families with autosomal recessive pattern and 2 families with an unclear pattern (2 affected brothers, compatible with either autosomal recessive and

X-linked inheritance). A total of 21 affected patients from 12 families were sequenced. The results obtained indicate, that there are about 18000–19000 single-nucleotide variants (SNV) and 300–500 insertions/deletions per each exome. The most of SNVs (>98 %) and insertions/deletions (>70 %) are presented in the database of normal variants – «dbSNP» [19]. Whereas a new, not previously reported SNVs and insertions/deletions affect at the average 260–270 and 105–110 genes in each patients, respectively. Analysis and validation of WES results are under implementation.

POTENTIAL IMPACT OF THE CHERISH PROJECT AND MAIN DISSEMINATION ACTIVITIES

Dissemination of the obtained results was one of the major goal of the CHERISH project. The project had an obvious potential impact for the scientific community, as well as for the participating families and for society. First of all the participation in the consortium provided the possibility of a professional growth for young scientists, PhD students and clinicians, who had the opportunity to travel to the laboratories of the involved partners to gain specific knowledge and expertise. The participating countries have strongly profited from the project in several ways. The first period of the project, that involved training and increasing the awareness of ID, allowed the participation of young scientists and clinicians in courses that addressed different aspects of ID diagnosis and management. This knowledge was then further disseminated in the local scientific and clinical communities, and among the general public. Each team could profit from newly established scientific and clinical contacts, which were realized through mutual visits among partner laboratories. The project also supported the participation of the partner teams in scientific conferences where they could present their findings, learn about the progress in the field, further discuss the methods and interpretation of the results, and find new collaborations. Young researchers and clinicians were preferentially supported to attend scientific meetings.

During the stage of sample collection and clinical characterization, many local professional collaborators were involved in each country, further increasing the outreach of the project and the public awareness of ID. This preliminary part of the project brought a clear benefit to some families who were identified to carry visible cytogenetic aberrations. These families were excluded from further studies, but nevertheless received a diagnosis explaining their child phenotype. The CHERISH project helped to introduce array-based analysis as the first-tier diagnostic test for

patients with ID (and multiple congenital anomalies) in participating countries, as suggested by internationally recognized authoritative sources in the field of cytogenetics, e.g. ISCA Consortium [20].

Between 10 and 20 % of patients in the different national cohorts received a specific diagnosis thanks to array analysis. Every single patient who receives such a diagnosis brings a potential benefit for his/her family, at least in terms of genetic counselling and evaluation of recurrence risks for family members. In other families new variants potentially causative for ID were identified: the immediate clinical relevance is limited in these families, but the findings are of scientific interest as they can point to novel syndromes or novel candidate genes for ID.

If array analysis was the best tool for diagnosis of idiopathic ID at the beginning of this project, research and diagnosis in medical genetics underwent a real revolution in most recent years with the advent of new technologies for DNA sequencing, allowing analysis of all the known genes of an individual in one single experiment (Whole Exome Sequencing). This approach has been the object of a specific amendment submitted during the last year of implementation of the project. We thus had the opportunity to introduce this new technology in Eastern European countries, contributing to its widespread use. The use of such advanced molecular diagnostics tools in the definition of genetic disorders will eventually open a new phase in the prevention of the manifestations of many monogenic as well as complex genetic disorders.

In order to raise awareness on ID in general and on the project's results specifically among the scientific community and the general public, the Consortium has developed a dissemination strategy based on the use of different channels: scientific publications, a Scientific Symposium, a CHERISH stand during the annual ESHG meeting, 3 newsletters, an international workshop, 3 targeted events for researchers, a «Meet the Experts» Symposium, the realization of a multilingual brochure for families and patients' associations, and Press Conference.

The last Newsletter, containing information concerning the Consortium dissemination activities, scientific publications, portal updates and project meetings, was sent on July 2012 to 44.000 e-mail contacts. All CHERISH Newsletters are freely available on the project website [12]. Educational brochures and informative leaflets were prepared in English, translated in the languages of participating countries and provided to a wide range of audiences including families, parent groups, health care professionals and the general public.

Finally, all the partners were involved in dissemination of the project objectives and results at Inter-

national meetings, such as the yearly conferences of the European Society of Human Genetics (ESGH), but also in the local organization of meetings with families and patients' support groups. Along this line, towards the end of the project a «Meet the Experts» Symposium addressed to patients, patients' families and associations was organized in Bologna. The CHERISH project was presented and patients and their representatives had a chance to discuss their personal experiences. During the ESHG Annual Conference in Amsterdam (the Netherlands) on May 28-31, 2011, the Cherish project had a stand in the international exhibition area, where copies of dissemination materials (handouts, leaflets, posters) were distributed to more than 500 participants. During the meeting the EGF staff also recorded some interviews with Consortium members. All the interviews are available on the project portal [12].

A series of one full day scientific sessions dedicated to the CHERISH Project were organized in Bologna within the frame of 3 residential courses (Basic and Advanced Course in Genetic Counseling in Practice, Course on Molecular and Statistical Genetics of Consanguinity, and the 25th Course in Medical Genetics) planned by the European Genetics Foundation. The Consortium had the opportunity to present the results of the project to a wide international audience and to underline the strength of the project and the importance of creating international networks for sharing genetic practices in a cross-cultural setting.

Dissemination activities reached their culmination on May 24th 2012, when University of Bologna (project coordinator) organized in collaboration with the City Hall of Bologna and the European Genetics Foundation, a Public Awareness of Genetics event with the presence of Nobel Laureate Professor Mario Capecchi. The event was introduced by the Rector of the University of Bologna, Prof. Ivano Dionigi and by the Vice-Mayor of Bologna Prof. Silvia Giannini. During this unique occasion, the CHERISH partners briefly presented their work and introduced the new powerful diagnostic tools that medical genetics offers for the diagnosis of ID, just before Professor Capecchi's lecture for the general public. CHERISH leaflets were distributed to 200 participants. The event has also been web-casted and a recorded version of the partners' presentation is available on the project website [12].

In conclusion, it should be noted, that participation in the CHERISH project has also a valuable significance for Institute of Medical Genetics. Two hundred and six Russian patients with ID were clinically examined according to international standard, and 80 of them received results of array-CGH studies. Known microdeletion/microduplication syndromes associated with ID were diagnosed in 7 patients.

For 16 patients new, previously not reported chromosomal microdeletions/microduplications were detected and candidate genes responsible for ID within affected chromosomal regions were delineated.

During the project implementation training courses for young scientists and clinicians were organized. As a result, new research and diagnostic technologies became available. For example, diagnostic of chromosomal aberrations by array-CGH is now performed at the Genetic Clinic of the Institute of Medical Genetics for patients with intellectual disability and developmental delay. This technology can be applied also for prenatal and preimplantation diagnosis of chromosomal diseases.

Participation in the CHERISH project allowed establish and improve scientific cooperation between partners, providing possibilities to continue research in the field of genetics of mental retardation. At present, these studies are supported partially by the grant of Federal Program of the Ministry of Education and Science of Russian Federation «Scientific and Educational personnel of innovative Russia» (№ 8727). Moreover, other studies within this Program in the areas of human reproduction (grants № 8276 and 8720), common diseases (grant № 8062) and cancer genetics (grants № 8595, 8602, and 8719) based on array-CGH technology have been performed in Institute of Medical Genetics with cooperation of Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases of SB RAMS (Kemerovo) and Institute of Oncology of SB RAMS (Tomsk).

REFERENCES

1. Alpár A., Attems J., Mulder J. *et al.* The renaissance of Ca²⁺-binding proteins in the nervous system: secretagoin takes center stage // *Cell Signal*. 2012. 24. 378–387.
2. Ashery-Padan R., Alvarez-Bolado G., Klamt B. *et al.* *Fjx1*, the murine homologue of the *Drosophila* four-jointed gene, codes for a putative secreted protein expressed in restricted domains of the developing and adult brain // *Mech. Dev.* 1999. 80. 213–217.
3. Bahl-Buisson N., Chelly J., des Portes V. Update on the genetics of X-linked mental retardation // *Rev. Neurol. (Paris)*. 2006. 162. 952–963.
4. Basel-Vanagaite L., Attia R., Yahav M. *et al.* The *CC2D1A*, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation // *J. Med. Genet.* 2006. 43. 203–210.
5. Caliskan M., Chong J.X., Uricchio L. *et al.* Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the *TECR* gene on chromosome 19p13 // *Hum. Mol. Genet.* 2011. 20. 1285–1289.

6. *de Ligt J., Willemsen M.H., van Bon B.W.M. et al.* Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability // *N. Engl. J. Med.* 2012. 367. 1921–1929.
7. *Edvardson S., Hama H., Shaag A. et al.* Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. 83. 643–648.
8. *English B.A., Hahn M.K., Gizer I.R. et al.* Choline transporter gene variation is associated with attention-deficit hyperactivity disorder // *J. Neurodev. Disord.* 2009. 1. 252–263.
9. *Font-Llitjos M., Rodriguez-Santiago B., Espino M. et al.* Novel *SLC7A7* large rearrangements in lysinuric protein intolerance patients involving the same AluY repeat // *Eur. J. Hum. Genet.* 2009. 17. 71–79.
10. *He M., Zhengtong P., Mohsen A. et al.* Identification and characterization of new long chain Acyl-CoA dehydrogenases // *Mol. Genet. Metab.* 2011. 102. 418–429.
11. *Higgins J.J., Hao J., Kosofsky B., Rajadhyaksha A.M.* Dysregulation of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel expression in nonsyndromal mental retardation due to a cereblon p.R419X mutation // *Neurogenetics.* 2008. 9. 219–223.
12. <http://cherishproject.eu> – an official web-site of the CHERISH Consortium.
13. <http://decipher.sanger.ac.uk> – Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources (DECIPHER).
14. <http://omim.org> – Online Mendelian Inheritance in Man (An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders).
15. <http://projects.tcag.ca/variation> – Database of Genomic Variants (DGV).
16. <http://www.cartagenia.com> – Cartagenia database.
17. <http://www.euromrx.com> – an official web-site of the EURO-MRX Consortium.
18. <http://www.genecards.org> – GeneCards Database.
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP> – Database of Short Genetic Variations (dbSNP).
20. <https://www.iscaconsortium.org> – an official web-site of the International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium (ISCA).
21. *Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Cheremnykh A.D. et al.* Clinical and genetic analysis of idiopathic intellectual disability based on array comparative genomic hybridization // *Korsakov J. Neurol. Psychiatry (Neuroscience and Behavioral Physiology).* 2013. 9. 70–74.
22. *Kim K., Lee S., Kegelman T.P. et al.* Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics // *J. Cell Physiol.* 2011. 226. 2484–2493.
23. *Mir A., Kaufman L., Noor A. et al.* Identification of mutations in *TRAPPC9*, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. 85. 905–915.
24. *Molinari F., Rio M., Meskenaitė V. et al.* Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation // *Science.* 2002. 298. 1779–1781.
25. *Motazacker M.M., Rost B.R., Hucho T. et al.* A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (*GRIK2*) is associated with autosomal recessive mental retardation // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. 81. 792–798.
26. *Najmabadi H., Hu H., Garshasbi M. et al.* Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders // *Nature.* 2011. 478. 57–63.
27. *Nandar W., Neely E.B., Unger E., Connor J.R.* A mutation in the *HFE* gene is associated with altered brain iron profiles and increased oxidative stress in mice // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. 1832. 729–741.
28. *Philippe O., Rio M., Carioux A. et al.* Combination of linkage mapping and microarray-expression analysis identifies NF-kappa-B signaling defect as a cause of autosomal-recessive mental retardation // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. 85. 903–908.
29. *Ranganathan S., Noyes N.C., Migliorini M. et al.* LRAD3, a novel low-density lipoprotein receptor family member that modulates amyloid precursor protein trafficking // *J. Neurosci.* 2011. 31. 10836–10846.
30. *Raymond F.L.* Monogenic causes of mental retardation // *Genetics of Mental Retardation* / Ed. S.J.L. Knight. Monogr. Hum. Genet. Basel: Karger, 2010. 18. 89–100.
31. *Sadakata T., Washida M., Iwayama Y. et al.* Autistic-like phenotypes in *Cadps2*-knockout mice and aberrant *CADPS2* splicing in autistic patients // *J. Clin. Invest.* 2007. 117. 931–943.
32. *van Bokhoven H.* Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities // *Annu Rev Genet.* 2011. 45. 81–104.
33. *Vissers L.E.L.M., Stankiewicz P.* Microdeletion and microduplication syndromes // *Genomic Structural Variants: Methods and Protocols* / Ed. L. Feuk L. Methods in Molecular Biology. Springer Science-Business Media, LLC, 2012. 838. 29–75.
34. *Zuko A., Bouyain S., van der Zwaag B., Burbach J.P.* Contactins: structural aspects in relation to developmental functions in brain disease // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2011. 84. 143–180.

Lebedev I.N. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of cytogenetics,
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Nazarenko L.P. – doctor of medical sciences, professor, vice-head, e-mail: ludmila.nazarenko@medgenetics.ru

Kashevarova A.A. – candidate of biological sciences, researcher of the laboratory of cytogenetics,
e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Skryabin N.A. – candidate of medical sciences, researcher of the laboratory of cytogenetics,
e-mail: skryabinn@mail.ru

Salyukova O.A. – candidate of medical sciences, researcher of the laboratory of hereditary pathology,
e-mail: olga.salukova@mail.ru

Chechetkina N.N. – postgraduate student, e-mail: valetе@mail.ru

Tolmacheva E.N. – candidate of biological sciences, researcher of the laboratory of cytogenetics,
e-mail: kate.tolmacheva@medgenetics.ru

Sazhenova E.A. – candidate of biological sciences, researcher of the laboratory of cytogenetics,
e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Vovk S.L. – head of the clinical and diagnostic laboratory of Genetic clinic, e-mail: svetlana.vovk@medgenetics.ru

Rudko A.A. – candidate of medical sciences, head of Genetic clinic, e-mail: aleksey.rudko@medgenetics.ru

Puzyrev V.P. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, head,
e-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru

Magini Pamela – PhD, Laboratory of medical genetics, Department of gynecology, obstetrics
and pediatrics sciences, e-mail: pamelа.magini@unibo.it

Graziano Claudio – MD, Laboratory of medical genetics, Department of gynecology, obstetrics
and pediatrics sciences, e-mail: claudio.graziano@unibo.it

Romeo Giovanni – professor of medical genetics, e-mail: romeo@eurogene.org

МЕТОДЫ ХИРУРГИЧЕСКОЙ КОНТРАЦЕПЦИИ ЖЕНЩИН С ПРИМЕНЕНИЕМ КЛЕММ

Галина Игоревна ЧЕРНЯВСКАЯ¹, Алишер Шавкатович МАХМУТХОДЖАЕВ²,
Игорь Яковлевич ЧЕРНЯВСКИЙ²

¹ ФГБУ НИИ акушерства, гинекологии и перинатологии СО РАМН
634063, г. Томск, ул. Лазо, 5

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

Проблема аборт, представляющих угрозу для здоровья и жизни женщин репродуктивного возраста, напрямую связана с разработкой и применением наиболее эффективных методов контрацепции, к числу которых относится хирургическая контрацепция. Хирургическая контрацепция широко распространена в странах Европы, где при высоком коэффициенте фертильности нежелательные беременности почти исключены. Из хирургических методов контрацепции наиболее простыми и надежными являются электрокоагуляция и клеммирование маточных труб. Стерилизация с помощью клемм менее травматична, но имеет некоторые недостатки, устранить которые позволит применение новых материалов и конструкций, обладающих биосовместимостью с тканями организма.

Ключевые слова: аборт, хирургическая контрацепция, стерилизация, клеммы.

В современных демографических условиях проблема аборт в Российской Федерации занимает особое место. Альтернативой абарту является не рождение нежеланного ребенка, а использование контрацепции для профилактики беременности. В современном мире каждой женщине должны быть законодательно предоставлены гарантии реализации ее основного репродуктивного права – права на свободный репродуктивный выбор и репродуктивную автономию. Число производимых аборт – показатель, по которому оценивается эффективность государственных усилий по охране репродуктивного здоровья и здоровья населения в целом [7].

Проблема нежелательного зачатия в наши дни принимает глобальный характер. В среднем только 59 % беременностей в мире запланированы заранее, остальные 41 % заканчиваются либо рождением нежеланного ребенка, либо выкидышами, но большинство, 46 млн ежегодно – артифициальными абартами. При этом половину прерываний беременности выполняют в далеко не безопасных условиях, что повышает риск материнской заболеваемости и смертности [13].

Тема аборт является одной из приоритетных в акушерско-гинекологической службе, теснейшим образом связанной с материнской смертностью, поскольку именно абарты составляют четверть ее причин [20, 22, 23]. В структуре причин материнской смертности доминирующее место занимают последствия аборт, на долю которых приходится от 25–27 до 50–67 % в разных регионах РФ. К этой категории относятся женщины старше 30 лет, наличие в анамнезе большого (три и более) числа аборт [23].

Научные исследования по регулированию рождаемости позволили установить тесную взаимосвязь между репродуктивным поведением женщины и состоянием ее здоровья. При этом если раньше репродуктивный выбор ограничивался только правом на абарт, то сегодня он включает право на контрацепцию, право на беременность и право на стерилизацию, которая может улучшить качество жизни [12].

Стерилизация женщин – высокоэффективный метод долговременной контрацепции, который заключается в создании искусственной непроходимости маточных труб при мини-лапаротомии,

Чернявская Г.И. – врач-ординатор, e-mail: chern1982@mail.ru

Махмутходжаев А.Ш. – д.м.н, зав. кафедрой акушерства и гинекологии ФПК и ППС, e-mail: alisher_tomsk@sibmail.com

Чернявский И.Я. – к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии ФПК и ППС, e-mail: chern1982@mail.ru

лапароскопии или гистероскопии [2, 4, 11, 17, 19, 21, 32, 42, 43]. Основными требованиями к методам стерилизации маточных труб являются простота, безопасность, эффективность, экономичность, добровольность [1, 28].

Добровольная женская стерилизация является наиболее распространенным в ряде стран мира методом контрацепции. По данным AVSC International, около 166 млн женщин в настоящее время предохраняются от нежелательной беременности, используя метод добровольной хирургической стерилизации [19]. Доступность этого метода растет в большинстве стран мира, но препятствующими его распространению факторами все еще остаются регулирующие юридические положения, высокая стоимость метода и недостаточная информированность населения. Доказано, что чем ниже информированность о возможности хирургической стерилизации, тем меньше женщин, которые могли бы ею воспользоваться [10, 16]. В развитых странах стерилизация наиболее популярна в США, где более 11 млн женщин выбрали стерилизацию маточных труб как метод контрацепции [37]. В странах Европы ее чаще используют в Нидерландах – 25 % женщин детородного возраста, не планирующих беременность, в Дании – 14 % [3, 9, 18]. В Великобритании ежегодно проводится 50 000 операций стерилизации маточных труб [49]. В странах Западной Европы (Нидерланды, Германия, Великобритания, Франция) при высоком коэффициенте фертильности нежелательные беременности почти исключены, эффективные методы обратимой контрацепции и хирургическая стерилизация одного из партнеров в зрелом возрасте старше 35 лет обеспечивают необходимую контрацептивную защиту [7].

В соответствии с Федеральным законом № 323 от 21.11.11 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (статья 57) медицинская стерилизация, как специальное вмешательство с целью лишения человека способности к воспроизводству или как метод контрацепции, может быть проведена по письменному заявлению женщины/мужчины не моложе 35 лет или имеющих не менее двух детей, а при наличии медицинских показаний и согласии женщины/мужчины – независимо от возраста и наличия детей [10]. Противопоказаний к операции хирургической стерилизации практически нет [1].

Определение наилучшего способа окклюзии маточных труб при стерилизации все еще остается трудной задачей. Наиболее важными факторами для успешности операции являются квалификация хирурга, характер хирургического доступа, время проведения операции и способ окклюзии маточных труб [6, 27, 29, 30, 39, 41].

Механические методы стерилизации в настоящее время являются наиболее простыми и надежными [6, 35, 36]. Разработанные способы имеют высокую эффективность, малые издержки, низкую частоту осложнений, короткий период восстановления после операции и низкие расходы медицинских средств и материалов, поэтому для планирования семьи являются экономически целесообразными [25].

Механическая стерилизация клеммами Фильше является более распространенным методом хирургической контрацепции в мире, конкурирующим с электрокоагуляцией [38]. Метод характеризуется безопасностью, эффективностью [10, 29, 48], достаточно низкой степенью неудач и простотой [28, 29, 44]. При использовании клипсы Фильше достигается небольшое по протяжению повреждение труб, что может иметь значение в случае необходимости проведения операций по восстановлению проходимости маточных труб [1, 26, 32, 40, 46, 50, 51].

Отдаленные осложнения при клеммировании труб клипсами Фильше менее значительны в сравнении с электрокоагуляцией. Частота наступления беременности составляет 0,5–1,2 % [24, 40], чаще неудачи отмечаются при послеродовой стерилизации [34, 44]. Описаны случаи миграции клеммы [31, 38]. Одним из главных технических условий при наложении клемм является строго перпендикулярное их расположение по отношению к маточным трубам [5].

Стерилизация маточных труб с использованием клеммы Хулка также довольно распространена в различных странах. Метод характеризуется простотой, эффективностью, достаточно большой возможностью восстановления проходимости маточных труб [26, 39]. В литературе описаны отдаленные осложнения после стерилизации клеммами Хулка. Наиболее частое из них – беременность, обнаруживаемая в 2,7–4,5 % случаев [45, 47]. Таким образом, выполнение хирургической стерилизации с применением клемм Фильше и Хулка может быть осуществлено лишь в специализированных гинекологических стационарах врачом достаточно высокой квалификации при наличии соответствующего вспомогательного оборудования для наложения клемм [8] и требует их строго перпендикулярного расположения на маточных трубах. Отсутствие опыта выполнения таких операций может приводить к техническим ошибкам и послеоперационным осложнениям (повреждение целостности трубы, внутрибрюшное кровотечение, соскальзывание клемм с последующей их миграцией, беременность).

Главными причинами возникновения послеоперационных осложнений являются несовер-

шенство конструкций существующих разновидностей клемм, сложность их строения (наличие замыкательной пружины, амортизирующей прокладки, шарнирного крепления). Эти факторы определяют также относительно большую массу клемм. Особое значение имеет тот факт, что при использовании клемм подобного рода не выполняется условие их биомеханической совместимости с тканями. Давление клемм является более жестким, чем обратная реакция тканей, что приводит к некрозу и обуславливает появление трубно-перитонеальных фистул. Помимо недостатков самих конструкций клемм, их наложение на маточные трубы невозможно при отсутствии специального вспомогательного инструментария (аппликатора).

Новым направлением в решении поставленных проблем является разработка устройств, изготовленных из сплава никелида титана, обладающего эффектом «памяти» формы [15]. Особые физические характеристики этого сплава позволяют создать устройства биосовместимые, конструктивно простые, имеющие минимальную массу, запрограммированные размеры, а также высокую степень надежности при их применении [14, 33].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян Л.В., Джабраилова С.Ш., Белоглазова С.Е. Хирургическая стерилизация женщин: основные методы // Эндоскопия в гинекологии. М., 1999. 176–180.
2. Бахтина В.В. Лапароскопическая стерилизация женщин и ее роль в планировании семьи // Актуальные вопросы профпатологии и внутренней медицины. Иркутск, 1994. 240–242.
3. Гаврилова Л.В. Репродуктивное поведение населения Российской Федерации в современных условиях // Планирование семьи. 1997. (4). 8–16.
4. Газазян М.Г., Хардилов А.Д., Кеня Л.Н. Добровольная хирургическая стерилизация после родов методом мини-лапаротомии: методические рекомендации. Курск, 2002. 10 с.
5. Джабраилова С.Ш. Лапароскопическая стерилизация женщин // Акушерство и гинекология. 1995. (5). 44–46.
6. Джабраилова С.Ш., Ткаченко Э.Р. Современные подходы к выбору метода стерилизации женщин // Проблемы хирургии в акушерстве и гинекологии: мат. докл. 1-го Съезда Рос. ассоциации акушеров-гинекологов. М., 1995. 164–165.
7. Ерофеева Л.В. Профилактика повторного аборта // Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. М., 2010. № 2. 3–9.
8. Калегин А.В., Курбанов Д.Д., Аракелянц А.Б. Сочетание лапароскопической стерилизации с искусственным абортom // Эндоскопия в диагностике, лечении и мониторинге женских болезней. М., 2000. 118–120.
9. Кеттинг Э. Контрацепция в Европе // Планирование семьи. 1994. (1). 8–12.
10. Кулаков В.И., Серов В.Н., Ваганов Н.Н. и др. Руководство по планированию семьи. М.: РУСФРАМАМЕД, 1997. 298 с.
11. Кулаков В.И., Адамян Л.В., Мынбаев О.А. Оперативная гинекология – хирургические энергии. М.: Медицина, Антидор, 2000. 860 с.
12. Мануилова И.А. Современные контрацептивные средства. М., 1993. 200 с.
13. Маклецова С.А., Рябинкина Т.С., Симоновская Х.Ю. Контрацепция и здоровье: звенья одной цепи // Итоги встречи российских врачей и представителей Европейского общества по контрацепции и репродуктивному здоровью (Москва, 20 марта 2012 г.). М.: Status Praesens, 2012. 20 с.
14. Материалы с памятью формы и новые технологии в медицине / Ред. проф. В.Э. Гюнтер. Томск: НПП «МИЦ», 2006. 316 с.
15. Медицинские материалы и имплантаты с памятью формы / Ред. проф. В.Э. Гюнтер. Томск: Изд-во ТГУ, 1998. 486 с.
16. Моторина Л.Л. Добровольная хирургическая стерилизация в послеродовом периоде как метод профилактики нежелательной беременности и сохранения здоровья женщин: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Иваново, 1999.
17. Новиков М.А., Заруба М.Ю., Ряховский А.Н., Краснолуцкий Н.А. Роль лапароскопии в лечении гинекологических больных // Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний. М.: Пантори, 2005. 36–37.
18. Ньютон Дж. Контрацепция в Европе: проблемы и перспективы // Планирование семьи. 1999. (1). 14–16.
19. Руководство по контрацепции / Ред. проф. В.Н. Прилепская. М.: МЕДпресс-информ, 2006. 400 с.
20. Фролова О.Г., Жирова И.А., Николаева Е.И., Волгина В.Ф. и др. Аборт (медико-социальные аспекты). М.: Триада-Х, 2003. 154 с.
21. Хабаров С.В. Роль добровольной хирургической стерилизации в реализации концепции репродуктивного здоровья // Вестн. мед. технологий. 1999. 6. (1). 91–92.
22. Шарапова Е.И. Репродуктивное здоровье женщин России: состояние, тенденции и система мер по его улучшению: автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1998.
23. Юсупова А.Н. Аборты в России. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 206 с.
24. Birdsall M.A., Pattison N.S. Female sterilization: National Women's Hospital 1988-9 // NZ. Med. J. 1994. 167. (99). 473–475.

25. Brenner W.E. Evaluation of contemporary Female sterilization methods // J. Reprod. Med. 1981. 26. (9). 439–453.
26. Calvert J.P. Reserval of female sterilization // Br. J. Hosp. Med. 1995. 53. (6). 267.
27. Campos-Gonzales R., Mercado-Montoya G. Bilateral tubal occlusion by postpartum minilaparotomy under local anesthesia and sedation // Gynaecol. Obstet. Mex. 1993. Oct. 61. 295–298.
28. Cetin M.T., Kadayifci O. Laparoscopic microsurgical tubal re-anastomosis: the two-stitch technique // Gynecol. Surg. 2008. 5. (4). 293–297.
29. Chi I.C., Gates D., Bunce S. Timing of postpartum tubal sterilization using to Filshie clips: An analysis of data from two developing country centers // Contraception. 1991. 43. (1). 33–34.
30. Contraceptive Technology / Russian International Edition, Copyright c 1994 by Briging The Gap Communications Inc. P. 219–250.
31. Chukwujama A.E., Khalifa L., Mensah P.K. Post-ablation tubal sterilization syndrome following microwave endometrial ablation // Gynecol. Surg. 2007. 4. (4). 141–143.
32. Deffieux X., Surroca M.M., Faivre E. et al. Tubal anastomosis after tubal sterilization: a review // Ach. Gynecol. Obstet. 2011. 283. (5). 1149–1158.
33. Delay law and new class of materials and implants in medicine / V.E. Gunter. Northampton: MA, 2000. P. 430
34. De-Villiers V.P. Postpartum sterilization with the Filshie titanium siliconrubber clips and subsequent pregnancy / S. Afr. Med. J. 1987. 71. (8). 498–499.
35. El-Sahwi S., Kamel M., Abd-Rabow S. Changes in the circulating levels of hemoglobin, hematocrit, serum iron and total iron binding capacity after four methods of surgical tubal sterilization // Int. J. Gynaecol. Obstet. 1990. 33. (1). 599–604.
36. Foulot H., Lecuru F. Other indication: tubal sterilization, medically assisted procreation, salpingitis, fobromas // Rev. Prat. 1991. 41. (25). 2567–2569.
37. Ignacio E.A., Khati N.J., Lipman J.C., Vasudevan P. Fallopian tube occlusion // Women's Health in international Radiology. 2012. Part 2. P. 83–104.
38. Klumper F., Peters A.A. Migrating clips: a complication following sterilization // Ned. Tijdschr. Geneesk. 1991. 135. (6). 233–235.
39. Lee S.H., Jones J.S. Postpartum tubal sterilization. A comparative study of the Hulka clip and modified Pomeroy technique // J. Reprod. Med. 1992. 37. (8). 671–677.
40. Liskin L., Rinehart W., Blackburn R. Minilaparotomy and laparoscopy: safe, effective and widely used // Popul. Rep. 1985. 9. 125–167.
41. Mahesh R.A., Gaikwad P.R., Makhar A.S. Prospective study of open band ligation for tubal sterilization // J. Obstet. Gynecol. India. 2010. 60. (6). 516–520.
42. March Ch.M. Female tubal sterilization: traditional and research methods // Current. Clinical Practice. The Handbook of Contraception. 2006. 205–233.
43. March C.M. Tubal sterilization in contraception. Blackwell Publishing Ltd., 2011.
44. Oligbo N., Revicky V., Udeh R. Pomeroy technique or Filshie clips for postpartum sterilization? Retrospective study on comparison between Pomeroy procedure and Filshie clips for a tubal occlusion at the time of Caesarean section // Ach. Gynecol. Obstet. 2010. 281. (6). 1073–1075.
45. Paterson P. Laparoscopic sterilization with Filshie clip under local anaesthesia // Med. J. Australia. 1982. 2. 476–477.
46. Spivak M.M., Librach C.I., Rosenthal O.M. Microsurgical reversal of sterilization: a six-year study // Am. J. Obstet. Gynecol. 1986. 154. (2). 355–361.
47. Stovall T.G., Ling F.W., Henry G.M. Method failures of laparoscopic tubal sterilization in a residency training program. A comparison of the tubal ring and spring-loaded clip // J. Reprod. Med. 1991. 36. (4). 283–286.
48. Van J.S., Hsu J., Vin C.S. Comparative study of Filshie clip and Pomeroy method for postpartum sterilization // Int. J. Gynaecol. Obstet. 1990. 33. (3). 263–267.
49. Varma R., Gupta J.K. Failed sterilization: evidence-based review and medico-legal ramifications // Int. J. Obstet. Gynecol. 2004. 111. 1322–1332.
50. Vercruyse P., Boeckx W., Brosens J. Microsurgical reversal of female mechanical sterilization techniques // Contraception. 1988. 38. (1). 99–107.
51. Zhang Y.J., Fan H.M., Huang X.M. Microsurgical recanalization of fallopian tubes after tubosterilization and its related factors // Chin. Med. J. Engl. 1993. 106. (6). 433–436.

METHODS OF SURGICAL WOMEN CONTRACEPTION WITH CLAMPS

**Galina Igorevna CHERNYAVSKAYA¹, Alisher Shavkatovich MAKHMUTKHODZHAEV²,
Igor Yakovlevich CHERNYAVSKI²**

¹ *Institute of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of SB RAMS
634063, Tomsk, Lazo str., 5*

² *Siberian State Medical University of Minzdrav of Russia
634050, Tomsk, Moskovskiy trakt str., 2*

The problem of abortion representing threat of health and life of women of childbearing age is directly connected with development and usage of the most effective contraceptive methods, such as surgical contraception. Surgical contraception is widespread in Europe, where undesirable pregnancies have been almost prevented in spite of the high coefficient of fertility. Electrocoagulation and clamping of uterine tubes are the simplest and more reliable among surgical contraceptive methods. Sterilization with clamps is less traumatic, but it has some shortcomings, which could be eliminated by means of new materials and construction usage with tissues biochemical compatibility.

Key words: abortion, surgical contraception, sterilization, clamps.

Chernyavskaya G.I. – resident doctor, e-mail: chern1982@mail.ru

Mahmutkhodzhaev A.Sh. – doctor of medical sciences, professor of the chair of obstetrics and gynecology of postgraduate faculty, e-mail: alisher_tomsk@sibmail.com

Chernyavskii I.Ya. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair of obstetrics and gynecology of postgraduate faculty, e-mail: chern1982@mail.ru

КОМПЛЕКСНОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ЖЕНЩИН С ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ДИСПЛАЗИЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ФОНЕ ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМИИ

Ольга Сергеевна ТОНКИХ¹, Лариса Степановна СОТНИКОВА²,
Ольга Михайловна ГЕРГЕТ³, Елена Викторовна ЭЛЬ-АКАД²,
Юлия Владимировна ОККЕЛЬ², Оксана Степановна ДРАНИЧНИКОВА²

¹ ООО Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем
634049, г. Томск, ул. Рабочая, 21

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

³ Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

У пациенток с различными формами доброкачественной диффузной дисплазии молочных желез (ДДМЖ) проведен сравнительный анализ уровня пролактина с использованием принципов доказательной медицины при проведении комплексной и сравнительной оценки с данными магнитно-резонансной томографии гипофиза. Установлено, что несмотря на статистически значимое относительно контрольных значений повышение содержания пролактина в сыворотке крови женщин с ДДМЖ с преобладанием железистого, кистозного фиброзного компонента, а также со смешанной формой ДДМЖ, у них отсутствуют убедительные признаки органических патологических изменений гипофиза. Высказывается предположение, что обнаруженная гиперпролактинемия может быть следствием как функциональных нарушений аденогипофиза, так и иметь «внегипофизарное» происхождение.

Ключевые слова: пролактин, гипофиз, доброкачественная диффузная дисплазия молочных желез, доказательная медицина.

Нейроэндокринным нарушениям принадлежит особое место среди причин развития доброкачественной диффузной дисплазии молочной железы (ДДМЖ). Среди всех гормонов, влияющих на состояние и функциональные характеристики молочной железы, ведущие позиции занимает пролактин. По данным литературы, он обладает видовой специфичностью и оказывает многообразное действие на молочную железу [1, 3]. Гормон способен повышать содержание рецепторов эстрадиола в ткани молочной железы, изменять синтез эстрогенов в яичниках и активировать пролиферативные процессы в молочной железе [1, 3, 5]. Повышенное содержание пролактина в сыворотке крови является маркером центральных гипоталамо-гипофизарных нарушений

и может быть следствием наличия объемного образования в аденогипофизе. В последние годы отдельные исследования показали, что гормон может быть также произведен некоторыми тканями вне мозга, однако крайне мало известно о функциях дополнительного, «внегипофизарного» пролактина и как его производство отрегулировано в этих тканях (в том числе в молочной железе) [6]. В настоящее время «золотым» стандартом лучевой диагностики наличия патологических изменений гипофиза является магнитно-резонансная томография (МРТ) гипофиза с динамическим контрастным усилением [2].

Цель работы – проведение комплексного обследования женщин с доброкачественной диффузной дисплазией молочных желез на фоне

Тонких О.С. – к.м.н., врач-рентгенолог, e-mail: ostonkih@mail.ru

Сотникова Л.С. – д.м.н., проф. кафедры акушерства и гинекологии, факультет повышения квалификации и постдипломной переподготовки специалистов, e-mail: sotnikova-larisa@mail.ru

Гергет О.М. – к.т.н., доцент кафедры прикладной математики

Эль-Акад Е.В. – акушер-гинеколог

Оккель Ю.В. – к.м.н., акушер-гинеколог

Драничникова О.С. – к.м.н., врач-невролог

гиперпролактинемии с оценкой состояния гипофиза с использованием принципов доказательной медицины.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В рамках межведомственной научно-практической программы «Здоровье женщины», совместного проекта ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, ФГБУ НИИ фармакологии СО РАМН, НИИ психического здоровья ФГБУ СО РАМН и Департамента здравоохранения администрации Томской области, а также гранта Президента РФ № МК-3743.2008.7 обследовано 266 женщин репродуктивного возраста. Основную группу составили 223 пациентки с верифицированным согласно МКБ-10 диагнозом: N60 доброкачественная дисплазия молочной железы (включена: фиброзно-кистозная мастопатия). Контрольную группу составили 43 практически здоровые женщины, сопоставимые с пациентками основной группы по возрасту, без соматической и гинекологической патологии в стадии обострения. Наиболее общепринятой в настоящее время является клиничко-рентгенологическая классификация Н.И. Рожковой [5], позволяющая выделить диффузные и узловые формы ДДМЖ, которые диагностируются при ультразвуковом сканировании. Полученные данные показателей ультразвукового исследования позволили разделить пациенток с ДДМЖ на три группы: с преобладанием железистого компонента ($n = 93$), с преобладанием кистозного компонента ($n = 69$) и с преобладанием фиброзного компонента ($n = 33$); отдельную подгруппу составили 28 пациенток со смешанной формой ДДМЖ. Анализ клинического материала показал, что средний возраст больных составил $30,4 \pm 0,3$ года. Пациентки с узловыми формами были исключены из данного исследования.

Ультразвуковое исследование проводилось на аппарате «Sonix» (Ultrasonix, США) с использованием линейных датчиков от 10 до 14 МГц с применением цветового и энергетического доплеровского картирования.

MPT исследование проводилось на аппарате Siemens Magnetom (Siemens, Германия), 1 Тл, толщина срезов 1–2 мм. Контрастное усиление проводилось препаратом «Магневист» (Bayer Schering Pharma AG, Германия), болюсно.

Всем пациенткам основной и контрольной групп в раннюю фолликулиновую фазу определяли базальный уровень циркулирующего в сыворотке крови пролактина иммуноферментным методом на автоматическом анализаторе Elecsys

(США) с использованием стандартного набора фирмы Hoffman La Rosh (Франция).

В данной работе проводился анализ вариационных рядов методами описательной статистики с вычислением медианы (Me) и верхнего (Q_1) и нижнего квартилей (Q_3), результаты представлены как Me [Q_1 ; Q_3]. Качественные признаки оценивались путем вычисления абсолютных и относительных частот. Анализ различий по количественным признакам выполнялся методами множественного сравнения независимых групп (ANOVA Краскела–Уоллиса) и методами сравнения двух независимых групп (U-тест Манна–Уитни). Для изучения связей между признаками применялся корреляционный анализ Кенделла. Разницу значений принимали статистически значимой при $p < 0,05$.

Анализ полученных результатов показал, что ошибка риска составляет от 0,3–0,7 при 95 % доверительном интервале.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе полученных данных о концентрации пролактина у здоровых женщин контрольной группы нашего исследования выявлено, что данный показатель соответствовал норме и составлял 649 [539;759] мЕд/л. При проведении корреляционного анализа не установлено статистически значимого влияния уровня пролактина на толщину фиброглангулярного слоя у практически здоровых женщин контрольной группы ($r = 0,36$; $p = 0,25$).

У всех пациенток с ДДМЖ зафиксировано статистически значимое повышение уровня гормона в сыворотке крови в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$): у женщин с железистой формой ДДМЖ он составил 719 [540;950] мЕд/л, при кистозной форме – 753 [450;980] мЕд/л, при фиброзной – 725 [320;950] мЕд/л и у пациенток со смешанной формой – 730 [540;840] мЕд/л. Межгрупповых различий у больных с ДДМЖ не обнаружено ($p > 0,05$). Однако необходимо отметить, что наибольшие абсолютные значения концентрации пролактина в сыворотке крови выявлены у пациенток с ДДМЖ с преобладанием кистозного компонента. При этом установлена выраженная положительная корреляционная взаимосвязь между повышением содержания пролактина и толщиной фиброглангулярного слоя молочных желез ($12,4 [8,1;14,5]$ мм) у женщин с ДДМЖ с преобладанием кистозного компонента ($p = 0,018$; $r = 0,72$). При проведении корреляционного анализа не выявлено статистически значимой зависимости между уровнем пролактина и толщиной фиброглангулярного слоя у

пациенток с железистой (20,0 [812,2;27,2] мм; $r = 0,012$; $p = 0,12$), фиброзной (13,9 [8,3;19,5] мм, $r = 0,08$; $p = 0,93$) и смешанной (15,1 [9,5;20,7] мм; $r = 0,01$; $p = 0,60$) формами ДДМЖ.

Полученные данные продиктовали необходимость проведения у пациенток с высоким содержанием пролактина в сыворотке крови (более 800 мЕд/л в первую фазу менструального цикла) МРТ гипофиза с динамическим контрастным усилением с целью выявления возможных структурных морфологических изменений аденогипофиза. Исследование было проведено 32 женщинам, большую часть которых (37,5 %, $n = 12$) составили пациентки с кистозной формой ДДМЖ, 28,2 % ($n = 9$) – женщины с ДДМЖ с преобладанием железистого компонента, 21,8 % ($n = 7$) – обследованные со смешанной формой ДДМЖ; 12,5 % ($n = 4$) – больные ДДМЖ с преобладанием фиброзного компонента.

По результатам МРТ исследования лишь у одной пациентки с железистой формой ДДМЖ была выявлена микроаденома аденогипофиза (3,1 %). При этом необходимо отметить, что уровень пролактина в первую фазу цикла у нее составлял 1447 мЕд/л. У остальных женщин форма и структура гипофиза, а также характер контрастного усиления, графики выведения контрастного вещества соответствовали нормальным значениям. Средние размеры гипофиза в группе обследованных составили: сагиттальный – $11,2 \pm 1,9$ мм, вертикальный – $5,4 \pm 2,1$ мм, фронтальный – $10,4 \pm 1,3$ мм; расстояние от верхнего контура гипофиза до хиазмы – $5,1 \pm 2,8$ мм, межвисочное расстояние – $34 \pm 1,6$ мм, что соответствует нормальным значениям в популяции.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что выявленная нами в ходе обследования женщин с ДДМЖ гиперпролактинемия может как быть следствием функциональных нарушений в процессе синтеза пролактина аденогипофизом, так и иметь «внегипофизарное» происхождение. Этот факт согласуется с рядом новейших исследований в области генетики рака молочной железы [6], подтвердивших на молекулярно-генетическом уровне способность клеток самой молочной железы к синтезу пролактина, опосредованному геном *PI3K-Akt*, который в дальнейшем оказывает прямое влияние на развитие рака молочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование принципов доказательной медицины при проведении комплексного обследования на фоне гиперпролактинемии позволило нам получить данные об отсутствии убедительных признаков органических патологических изменений гипофиза в группе женщин с различными формами доброкачественной диффузной дисплазии молочной железы. При этом необходимо отметить наличие у этих пациенток гиперпролактинемии в сравнении с группой контроля. Результаты исследования позволяют высказать предположение о том, что гиперпролактинемия, выявленная у женщин с доброкачественной диффузной дисплазией молочных желез, может быть как следствием функциональных нарушений аденогипофиза, так и иметь «внегипофизарное» происхождение. Этот факт, в свою очередь, требует более подробного, комплексного подхода к диагностике данного состояния и дальнейшего изучения с целью назначения своевременной патогенетической терапии и проведения профилактических мероприятий, направленных на предупреждение возможного формирования рака молочной железы у данной группы пациенток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е.Н., Хамошина М.Б., Руднева О.Д. Пролактин и молочные железы: норма и патология // Гинекология. 2012. (1). 12–16.
2. Дзеранова Л.К. Синдром гиперпролактинемии у женщин и мужчин: клиника, диагностика, лечение: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2007.
3. Молочные железы и гинекологические болезни / Ред. В.Е. Радзинский. М.: Медиабюро Статус презенс, 2010.
4. Рожкова Н.И. Рентгенодиагностика заболеваний молочной железы / Ред. А.С. Павлов. М.: Медицина, 1993. 222 с.
5. Тагиева Т.Т. Фиброзно-кистозная мастопатия // Гинекология. 2005. 7. (3). 141–144.
6. Chen C.-C., Stairs D.B., Boxer R.B. et al. Auto-crine prolactin induced by the Pten-Akt pathway is required for lactation initiation and provides a direct link between the Akt and Stat5 pathways // Genes Dev. 2012. 26. (19). 2154–2168.

COMPLEX INVESTIGATION OF WOMEN WITH BENIGN MAMMARY DYSPLASIA AGAINST THE BACKGROUND OF HYPERPROLACTINEMIA

Olga Sergeevna TONKIKH¹, Larisa Stepanovna SOTNIKOVA²,
Olga Mikhailovna GERGET³, Elena Viktorovna EL AKAD²,
Yulia Vladimirovna OKKEL², Oksana Stepanovna DRANICHNIKOVA²

¹ LLC Diagnostic and Treatment Center of the International Institute of Biological Systems
634049, Tomsk, Rabochaya str., 21

² Siberian State Medical University of Minzdrav of Russia
634050, Tomsk, Moscovski Trakt, 2

³ National Research Tomsk Polytechnic University
634050, Tomsk, Lenin str., 30

The comparative analysis of prolactin levels in patients with various forms of diffuse benign mammary dysplasia (DBMD) has been carried out using the principles of evidence-based medicine at the complex and comparative assessment with the magnetic resonance imaging data of pituitary gland. It has been revealed that in spite of statistically significant increase in prolactin level in serum of women with DBMD as well as with mixed form of DBMD in comparison with control value with predominance of adenous, fibrocystic component there were absence of persuasive signs of pituitary gland organic pathological changes. It has been proposed that the revealed hyperprolactinemia can be caused by both adenohipophysis functional disorders and be beyond pituitary origin.

Key words: prolactin, pituitary gland, diffuse benign mammary dysplasia, evidence-based medicine.

Tonkikh O.S. – candidate of medical sciences, radiologist, e-mail: ostonkih@mail.ru

Sotnikova L.S. – doctor of medical sciences, professor of the chair for obstetrics and gynecology of the faculty for training and re-training of specialists, e-mail: sotnikova-larisa@mail.ru

Gerget O.M. – candidate of technical sciences, associate professor of the chair for applied mathematics

El Akad E.V. – obstetrician-gynecologist

Okkel Yu.V. – candidate of medical sciences, obstetrician-gynecologist

Dranichnikova O.S. – candidate of medical sciences, neurologist

ГИПЕРАНДРОГЕНИЯ У БЕРЕМЕННЫХ: ЭТИОПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ ИСХОДЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Ольга Геннадьевна МАЛЫШЕВА, Любовь Аглямона АГАРКОВА,
Ирина Юрьевна БУХАРИНА

ФГБУ НИИ акушерства, гинекологии и перинатологии СО РАМН
634063, г. Томск, ул. Лазо, 5

В статье представлены современные литературные данные об этиологии и патогенезе, методах диагностики гиперандрогении у беременных. На сегодняшний день остается спорным вопрос о необходимости и методах коррекции гиперандрогении из-за возможного неблагоприятного влияния глюкокортикоидов на плод. Авторы описывают разные точки зрения на эту проблему, приводят новые методы лечения. Так как гиперандрогения относится к факторам риска развития осложнений беременности, приводятся последние данные литературы о перинатальных исходах у таких пациенток.

Ключевые слова: гиперандрогения, плацентарная недостаточность, невынашивание беременности, глюкокортикоиды.

Хорошо известно, что важнейшим фактором, который непосредственно влияет на течение беременности и исход родов, является гормональный дисбаланс. Среди всех эндокринных заболеваний, с которыми сталкиваются акушеры-гинекологи в своей практике, гиперандрогения по частоте встречаемости стоит на втором месте после заболеваний щитовидной железы [5] – возможно, вследствие повышения осведомленности практикующих специалистов в области эндокринологической гинекологии и улучшения качества лабораторной диагностики, но это не снимает остроты проблемы. Ни у кого уже не вызывает сомнений тот факт, что беременность на фоне гиперандрогении является беременностью высокого риска и сопровождается многочисленными осложнениями.

Синдром гиперандрогении (ГА) представляет собой достаточно обширную группу эндокринных заболеваний, которые возникают в силу весьма разнообразных патогенетических механизмов, но объединяются по принципу сходной клинической симптоматики вследствие избыточного количества и/или качества (активности) мужских половых гормонов [13, 15, 37]. Избыток андрогенов вызывает гиперандрогенное состояние, влияние которого на женский организм заключается в вирилизирующем и анаболическом действии

мужских половых гормонов и сопровождается нарушением фолликулогенеза и овуляции, а также репродуктивной функции [13, 28, 32].

Андрогены представляют собой стероидные соединения, содержащие 19 углеродных атомов (С-стероиды). К ним относятся дегидроэпиандростерон (ДГЭА) и его сульфат (ДГЭАС), андростендион, $\Delta 4$ -андростендион, $\Delta 5$ -андростендиол, тестостерон и 5α -дигидротестостерон [3, 15, 42]. Основными стероидпродуцирующими железами в организме женщины являются надпочечники и яичники, причем гормонообразование происходит по одинаковой схеме в обоих типах желез по причине общности их эмбрионального развития. Кроме того, андрогены у женщины образуются в результате периферического метаболизма стероидов в печени, селезенке, строме висцеральной и подкожной жировой клетчатки, мышцах и волосяных фолликулах. Надпочечники – главная структура, синтезирующая ДГЭА (75 %) и его менее активный метаболит ДГЭАС (85 %). ДГЭАС подвергается постоянному гидролизу, тем самым поддерживая постоянный уровень ДГЭА в плазме крови. Имеется мнение, что на долю надпочечниковых стероидов в общей концентрации андрогенов в плазме приходится почти 95 % ДГЭАС, 90 % ДГЭА, около 30 % андростендиона и только 5 % тестостерона [7, 22, 42, 45, 48].

Малышева О.Г. – к.м.н., научный сотрудник, e-mail: ogm.201@yandex.ru

Агаркова Л.А. – д.м.н., проф., директор, e-mail: perinat@tomsk.net

Бухарина И.Ю. – к.м.н., старший научный сотрудник, ученый секретарь, e-mail: bukhariirina@yandex.ru

К числу выдающихся достижений молекулярной биологии и экспериментальной эндокринологии в последние десятилетия относится выявление специфических рецепторов в органах-мишенях. Было показано, что цитозольные рецепторы андрогенов, которые представляют собой белки определенной структуры, существуют в ряде органов (мышечная и костная ткань, кожа, сальные железы, гипофиз, гипоталамус и др.) и подвергаются воздействию множества циркулирующих метаболитов андрогенов, поступающих в цитоплазму путем пассивной диффузии [15, 30, 45]. Свободные андрогены проникают через клеточную мембрану, превращаясь во внутриклеточные метаболиты с высокой биологической активностью.

В последние годы исследователями уделяется большое внимание ферменту 5 α -редуктазы, повышенная активность которого, полагают, и определяет андрогенный эффект в тканях-мишенях [12, 37, 42, 57]. Так, под влиянием фермента 5 α -редуктазы тестостерон превращается в клетке в дегидротестостерон, андрогенная активность которого в 2 раза выше, чем тестостерона. В связи с этим от содержания 5 α -редуктазы зависят уровень самого активного андрогена дигидротестостерона и степень выраженности андрогенизации. Именно дигидротестостерон с наибольшим сродством связывается со специфическими цитоплазматическими рецепторными белками, в результате чего образуется андроген-рецепторный комплекс [28, 42].

Нередко отсутствие соответствия между клиническими проявлениями и степенью секреции андрогенов может быть объяснено изменением баланса между фракциями, а также различной чувствительностью рецепторов в органах-мишенях и различным количеством этих рецепторов [11, 28, 29, 48].

Учитывая многообразие факторов, обуславливающих гиперандрогенные проявления, для облегчения их трактовки авторами предлагаются разные классификации ГА. Единого мнения относительно классификации гиперандрогенных состояний до настоящего момента нет. В зависимости от уровня поражения некоторые авторы выделяют ГА надпочечникового, яичникового, центрального генеза и конституциональную ГА [37, 40, 42, 59]. Существует также распределение ГА на истинную, с повышением содержания андрогенов в биохимических жидкостях (яичникового и надпочечникового генеза) и другие формы, связанные с различными факторами, влияющими на уровень андрогенов в организме (транспортная, рецепторная, ятрогенная ГА и т. д.) [13, 45]. Большинство исследователей придерживаются

классификации, которая подразделяет ГА на формы: неопухолевые (функциональные), опухолевые, транспортные, рецепторные [12, 13, 19, 41].

Клинические симптомы синдрома ГА немногочисленны (всего около десяти признаков), но в зависимости от тяжести процесса общий облик больных может существенно различаться. Необходимо помнить, что выраженность симптомов маскулинизации далеко не всегда отражает степень ГА, так как биологический эффект действия гормона зависит не только от его концентрации, но и от скорости превращения прогормонов в андрогены, а также от количества андрогенных рецепторов в клетках-мишенях [15, 29, 31, 41, 59].

В клинической практике значительно чаще встречаются больные с «мягкой», «латентной» формой ГА (формой «позднего начала»), симптомы которой проявляются после менархе в связи с активацией системы «гипоталамус – гипофиз – яичники» и надпочечников. Наступление беременности при стертых формах заболевания – не такой уж редкий факт, свидетельством этому является большой удельный вес ГА в структуре причин привычного невынашивания [1, 21, 32].

Нерезко выраженный дефицит ферментных систем при ГА компенсируется или может оставаться скрытым до тех пор, пока какой-либо фактор не проявит его. Такими факторами могут быть периоды выраженной гормональной перестройки организма (пубертатный период, беременность, роды и др.) [3, 10, 22, 27, 32]. Так, во время гестации проявляется скрытая неполноценность ферментных систем стероидогенеза, что способствует повышению уровня андрогенов и развитию клиники ГА.

Что касается лабораторной диагностики, истинную причину гиперандрогении установить крайне сложно, о чем также свидетельствуют результаты многочисленных исследований. Так, R. Barbieri [42] сообщает, что у 3 % обследованных пациенток с гиперандрогенией была выявлена недостаточность 21-гидроксилазы надпочечников, у 4 % – опухоли яичников или надпочечников, синдром Иценко-Кушинга или гиперпролактинемия. Более чем у 90 % пациенток причину гиперандрогении установить не удалось. Предпринимаются попытки найти диагностические критерии, позволяющие определить основной источник повышенного уровня андрогенов. Однако аналогичный спектр синтезируемых яичниками и надпочечниками гормонов затрудняет определение источника гиперандрогении только по базальному уровню этих гормонов в плазме крови [7, 10, 13, 15]. Так, несмотря на то, что синтез ДГЭАС происходит в основном в надпочечниках, у большинства женщин со стертой формой врож-

денной гиперплазии коры надпочечников содержание этого гормона не изменено. Напротив, у 50–60 % женщин с синдромом поликистозных яичников при яичниковой форме гиперандрогении выявляются высокие концентрации ДГЭАС [3, 8, 19, 48].

В единичных сообщениях встречается информация о том, что возможно проведение селективной катетеризации яичниковых и надпочечниковых вен с определением содержания гормонов в образцах крови, непосредственно оттекающей от органов [59]. Дифференциальным критерием овариальной или надпочечниковой гиперандрогении является градиент концентрации указанных гормонов (в крови, оттекающей от органа, в нижней полой вене, в кубитальной вене). Несмотря на высокую информативность данного метода, его использование в клинической практике ограничено ввиду технической сложности и инвазивности. Кроме того, учитывая пульсирующий характер секреции гормонов как надпочечников, так и яичников, вопрос о достоверности этого метода остается дискуссионным [45].

Для диагностики врожденной дисфункции коры надпочечников (ВДКН) в настоящее время стали широко использоваться методы молекулярной генетики, позволяющие выявить диагностически значимые мутации гена *CYP21P*, приводящие к дефициту фермента 21-гидроксилазы [12, 13, 37, 45, 39, 40].

Результаты исследований свидетельствуют о том, что андрогены выделяются с мочой в виде метаболитов, объединенных в группу 17-кетостероидов (17-КС). Однако по уровню этих метаболитов можно лишь косвенно судить о степени выраженности гиперандрогении, но не об ее источнике. Уровень экскреции с мочой 17-КС при гиперандрогении колеблется в широких пределах и малоинформативен. Определение содержания фракций 17-КС (ДГА, 11-окисленных стероидов, андростерона, этиохоланолона) также не обеспечивает выявления локализации источника гиперандрогении [5, 8, 13, 45, 59]. По мнению некоторых авторов, проводить исследование уровня 17-КС мочи для уточнения источника гиперандрогении на сегодняшний день вообще не является обязательным [8, 19].

Лишь в очень малых количествах (менее 6 мкг/сут) тестостерон попадает в мочу [48]. Из этого следует, что нормальный уровень 17-КС, свидетельствующий об отсутствии усиления андрогенсекретирующей функции надпочечников, отнюдь не исключает наличия яичниковой гиперандрогении, для которой характерно возрастание содержания тестостерона в крови. Поэтому для уточнения источника гиперандрогении (для

подтверждения или исключения ее яичникового компонента), по мнению большинства исследователей, обязательно определение концентрации тестостерона в сыворотке крови [5, 8, 11, 17, 45]. Для аналогичного подтверждения или исключения надпочечникового компонента гиперандрогении в научной литературе имеется обоснованная позиция авторов, ограничивающих гормональные исследования определением только уровня ДГЭАС, т.е. без параллельного определения еще и содержания 17- α -гидроксипрогестерона (17-ОН-ПГ). Это объясняется тем, что последний, будучи прогестином, является косвенным маркером надпочечниковой гиперандрогении, ассоциируемой в основном лишь с ВДКН. В отличие от этого ДГЭАС, относящийся по структуре и биологическим функциям к андрогенам, при увеличении его уровня в крови прямо подтверждает усиление андрогенпродуцирующей функции надпочечников, причем при любых причинах (т.е. не только при ВДКН), обуславливающих надпочечниковую гиперандрогению, например, при гиперпролактинемии [5, 36, 47].

Перечисленное позволяет заключить, что ДГЭАС, как маркер надпочечниковой гиперандрогении, обладает большей специфичностью по сравнению с 17- α -гидроксипрогестероном.

Таким образом, если суммировать имеющиеся в литературе данные, то можно сформулировать основные этапы диагностики гиперандрогении, которую желательно проводить еще до наступления беременности: помимо клинико-анамнестического обследования с подсчетом гирсутного числа и оценки характера менограмм, эхографии органов малого таза и надпочечников, необходимо проведение лабораторного обследования, включающего определение содержания свободного и общего тестостерона, дегидротестостерона, тестостерон-эстрадиолсвязывающего глобулина, ДГА и ДГЭАС, 17- α -гидроксипрогестерона и кортизола, а также уровня лютеинизирующего гормона, фолликулостимулирующего гормона, пролактина, что позволяет уточнить генез гиперандрогении у ряда больных [5, 8, 11, 20, 28, 31, 45].

Что касается функциональных проб, то их использование при беременности ограничено [10, 27, 40, 45].

Беременные с гиперандрогенией относятся к группе риска по развитию осложнений гестационного процесса. Обращает на себя внимание то, что 90 % пациенток с гиперандрогенией имеют какую-либо экстрагенитальную патологию (заболевания желудочно-кишечного тракта, патологию верхних дыхательных путей, заболевания мочевыделительной системы, вегетососудистую дистонию). У беременных с гиперандрогенией

достоверно чаще, чем у здоровых женщин, отмечаются стрессовые ситуации в семье и на работе, более высокий инфекционный индекс, увеличена частота оперативных вмешательств и травм [1, 4, 5, 13, 18, 32]. Так, В.М. Сидельникова [32] отмечает, что у каждой второй пациентки со смешанной формой гиперандрогении в жизни отмечены стрессовые ситуации, травмы, высокий инфекционный индекс. В.В. Васильева, изучавшая спектральные характеристики мозга у беременных с синдромом гиперандрогении, также указывает на имеющиеся изменения на электроэнцефалограммах и краниограммах у таких пациенток [6].

Многие авторы отводят средовым факторам (различные заболевания, инфекции, травмы, психосоциальный стресс) значительную роль в генезе нарушений гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-яичниковых взаимоотношений на различных этапах развития женского организма [4, 6, 12, 18, 23, 24].

В последние годы появились исследования, посвященные изучению различных аспектов гиперандрогении у беременных. Так, авторами исследовалось состояние порфиринового обмена при ГА, имеются работы, посвященные особенностям психосоциального статуса беременных с ГА и репродуктивными потерями в анамнезе [9, 24].

При выявлении гиперандрогении любого генеза как во время, так и до планируемой беременности перед практическим врачом встает вопрос о необходимости коррекции этого состояния и тактике ведения беременности. Вопросы лечения данной патологии являются спорными в современном акушерстве. С одной стороны, негативное влияние ГА на течение беременности и исход родов не вызывает сомнений [1, 4, 16, 21, 27, 32, 39, 46, 60]. Имеются данные о морфологических изменениях плаценты при данной патологии [2, 14]. Зарубежные авторы указывают на уменьшение веса плаценты и новорожденных при ГА, а также на неблагоприятное влияние на потомство женского пола [61]. С другой стороны, в литературе периодически появляются сообщения о неблагоприятном воздействии применяемых глюкокортикоидов на плод, которое выражается в угнетении функции надпочечников у плода, влиянии на артериальное давление и обмен веществ [38, 54, 55].

Основным методом коррекции гиперандрогении при беременности служит применение глюкокортикоидных гормонов (дексаметазон, метипред). При недостаточности 21-гидроксилазы, связанной с дефицитом продукции кортизола, это заместительное лечение. При других формах надпочечниковой гиперандрогении применение

кортикостероидов направлено на торможение кортикотропной функции гипофиза и является корригирующим [1, 4, 13, 16, 32]. Дексаметазон относится к длительно действующим синтетическим глюкокортикоидам. Этот препарат угнетает адренкортикотропную функцию гипофиза, не повышает артериальное давление и не вызывает образование отеков [4, 32]. Если в работах десятилетней давности и более авторами настоятельно рекомендовалось длительное применение дексаметазона на протяжении практически всей беременности [4, 16, 32], то в настоящее время приняты крайне ограниченные показания для применения глюкокортикоидов у беременных. Главным образом, это резко повышенный уровень андрогенов, увеличивающий риск вирилизации плода, а также наследственный дефект ферментов, отвечающих за синтез кортизола в надпочечниках.

В последние годы в литературе появились рекомендации по применению инсулинсенситайзеров во время беременности, особенно у больных с яичниковой формой гиперандрогении (синдром поликистозных яичников, СПКЯ) [40, 44, 51]. В ряде исследований (несколько клинических случаев, когортные исследования, одно рандомизированное контролируемое исследование с общим числом пациенток с СПКЯ более 500), где метформин назначался в первом триместре беременности (в дозе 0,5–2,55 г/сут) или на протяжении всей беременности (1–2,55 г/сут), применение этого препарата не привело к увеличению числа врожденных аномалий плода и неблагоприятных перинатальных исходов. Однако для подтверждения этих данных необходимы результаты рандомизированных контролируемых исследований. Предполагается, что инсулинсенситайзеры снижают уровень метаболических осложнений (ожирение, гипертензия), а также частоту преждевременных родов и выкидышей в раннем сроке [44, 51]. Необходимо также учитывать тот факт, что частота инсулинорезистентности (ИР) в 2–5 раз выше, чем частота СПКЯ, т.е. у женщин может наблюдаться ИР без СПКЯ или СПКЯ без ИР. В этом случае очень важен дифференцированный подход к назначению терапии.

Если суммировать имеющиеся в современной литературе данные, то можно выделить ряд следующих наиболее распространенных осложнений беременности на фоне гиперандрогении: невынашивание беременности, неразвивающаяся беременность, истмико-цервикальная недостаточность, плацентарная недостаточность, приводящая к хронической внутриутробной гипоксии плода, задержке внутриутробного развития вплоть до его антенатальной гибели [1, 4, 5, 14, 21].

Угроза преждевременных родов стоит на первом месте среди осложнений беременности у женщин с гиперандрогенией, причем у 2/3 женщин признаки угрозы прерывания выявляются в I триместре беременности [1, 4, 27, 32]. В этот период частота данного осложнения четко коррелирует с уровнем секреции андрогенов [21].

Второе место среди осложнений гестации у женщин с гиперандрогенией занимает плацентарная недостаточность, которая развивается со II триместра беременности и сопровождается нарушениями гемодинамики в системе мать–плацента–плод [1, 2, 14, 21].

Сложившееся в результате предшествующей гиперандрогении недоразвитие внутренних половых органов определяет, по мнению ряда авторов, развитие истмико-цервикальной недостаточности [32].

В последние годы появились сообщения о взаимосвязи между концентрацией тестостерона в сыворотке крови и развитием преэклампсии у беременных [52]. Результаты исследований свидетельствуют о том, что повышенный уровень свободного тестостерона может считаться важным фактором риска для преэклампсии и может быть вовлечен в ее патогенез.

У пациенток с СПКЯ (особенно с длительным анамнезом) велик риск развития гестационного сахарного диабета во время беременности [51, 56]. Кроме того, в экспериментах на животных показано, что самки, рожденные от матерей с гиперандрогенией, имеют более низкий вес при рождении и высокую инсулинорезистентность, которая стартует в раннем возрасте [58, 60], в то время как у самцов были снижены содержание тестостерона и секреция лютеинизирующего гормона (тест с гонадотропным релизинг-гормоном). Авторы считают, что во время беременности необходимо корректировать повышенный уровень андрогенов матери, чтобы снизить риск развития у потомства репродуктивных и метаболических нарушений во взрослом возрасте [60].

Большинство женщин с дефицитом 21-гидроксилазы с неклассической гиперплазией коры надпочечников являются носителями по меньшей мере одной аллели, на которые влияют мутации гена *CYP21*. Такие пациентки имеют высокий риск рождения ребенка с классической надпочечниковой гиперплазией, около 15 % детей от таких матерей имеют неклассическую форму гиперплазии коры надпочечников [58].

Ж.А. Виггу и соавт. установили, что уровень свободного тестостерона в пуповинной крови у девочек, рожденных от матерей с гиперандрогенией (СПКЯ), значительно выше, чем у девочек, рожденных от здоровых матерей, и приближается к таковому у новорожденных мальчиков [46].

В 2009 г. начато проспективное когортное исследование по установлению взаимосвязи между внутриутробным влиянием повышенного уровня андрогенов матери на последующее развитие синдрома поликистозных яичников у потомства [53]. Изучено состояние здоровья 14–17-летних девушек, взаимосвязи не обнаружено, исследование продолжается в настоящее время.

Что касается вирилизации плода женского пола, то она наиболее часто встречается у беременных с врожденной гиперплазией коры надпочечников, другие причины менее значимы. Наиболее негативное влияние на плод оказывает повышенный уровень андрогенов матери в первом триместре. Умеренный гиперандрогенизм матери во втором и третьем триместрах не обязательно приводит к вирилизации плода [38, 56].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахманова Р.А. Гиперандрогения – фактор риска развития акушерской и перинатальной патологии // III Региональный научный форум «Мать и дитя». М., 2009. 5 с.
2. Агаркова Л.А., Логвинов С.В., Диш О.Г. и др. Морфологические особенности плаценты при гиперандрогении // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2006. (3). 16–19.
3. Бабичев В.Н. Нейроэндокринология репродуктивной системы // Пробл. эндокринологии. 1998. (1). 3–12.
4. Бархатова Т.П., Ляшко Е.С., Фанченко Н.В. Надпочечниковая гиперандрогения как причинный фактор высокого риска невынашивания беременности и перинатальной патологии // Невынашивание беременности. М., 1984. 79–89.
5. Боткина Т.В. Комплексная оценка состояния репродуктивной системы у женщин с гиперандрогенией : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2001.
6. Васильева В.В. Спектральные характеристики биоэлектрической активности мозга у беременных с синдромом гиперандрогении в анамнезе // Валеология. 2010. (3). 14–18.
7. Вихляева Е.М. Руководство по эндокринной гинекологии. М., 2002. 360–395.
8. Волкова Н.И., Димитриади Т.А. Диагностика синдрома гиперандрогении в реальной практике (ретроспективный анализ) // Фарматека. 2009. 17. 48–51.
9. Габитова Н.А., Агаркова Л.А., Удот В.В. Метаболизм порфириновых фракций у беременных с плацентарной недостаточностью при гиперандрогении // Сиб. мед. журн. 2010. 25. (4). 48–51.
10. Глазкова О.И. Оптимизация диагностики и лечения бесплодия у женщин с хронической ановуляцией и гиперандрогенией : автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1999.

11. Гродницкая Е.Э., Курцер М.А. Гирсутизм: патогенез, клиника, диагностика, лечение // Акушерство и гинекология. 2012. 4. (1). 87–91.
12. Дедов И.И. Синдром гиперандрогении у женщин. Патогенез, клинические формы, дифференциальная диагностика и лечение: методическое пособие для врачей. М., 2003. 42 с.
13. Дурян Э.Р., Байрабина Г.В. Патогенез, дифференциальная диагностика и принципы лечения гиперандрогении // Акушерство и гинекология. 2002. (4). 62–64.
14. Диш О.Г. Клинико-морфологические аспекты формирования плацентарной недостаточности при смешанных формах гиперандрогении: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2007.
15. Йен С.С.К. Физиология андрогенов у женщин // Репродуктивная эндокринология. 1998. (1). 617–684.
16. Качалина Т.С. Гиперандрогения и невынашивание беременности // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2004. (3). 61–64.
17. Козловене Д., Казанавичюс Г., Круминис В. Концентрация тестостерона, дегидроэпиандростерона сульфата и индексы свободных андрогенов крови у женщин с гирсутизмом // Пробл. эндокринологии. 2008. 54. (2). 42–46.
18. Комаров Е.К. Репродуктивная функция у женщин с периферической гиперандрогенией // Журн. акушерства и женских болезней. 2009. 58. (4). 57–62.
19. Краснопольская К.В., Калугина А.С. Диагностика и терапия гиперандрогенных состояний в программах ЭКО (обзор литературы) // Пробл. репродукции. 2004. (5). 25–29.
20. Липсетт М.Б. Стероидные гормоны // Репродуктивная эндокринология. 1998. (1). 193–211.
21. Ляшко Е.С., Сонич М.Г., Тимофеев С.А. Влияние гиперандрогении на репродуктивную функцию женщины // Мед. помощь. 2000. (4). 22–25.
22. Магулария Т.Т. Характеристика гормональной функции яичников и надпочечников у женщин с гирсутизмом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1993.
23. Манухина Е.И., Геворкян Е.М., Кузнецова Е.М. Современный взгляд на нарушения репродуктивной функции у пациенток с гиперандрогенией // Пробл. репродукции. 2011. 17. (2). 12–17.
24. Нелидова Н.Э., Габитова Н.А., Агаркова Л.А. Психологическое состояние беременной женщины при гиперандрогении в первом триместре беременности // Клинико-биологические проблемы охраны психического здоровья матери и ребенка: тез. докл. Томск, 2009. 99.
25. Першина Е.В. Восстановление репродуктивной функции у больных с сочетанной формой гиперандрогении // Врач. 2010. (7). 46–50.
26. Рагимова Э.З. Принципы терапии клинических проявлений у больных с гиперандрогенией // Рос. вестн. акушера-гинеколога, 2007. (6). 16–19.
27. Раисова А.Т. Невынашивание беременности у женщин с гиперандрогенией: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1990.
28. Роговская С.И. Андрогены и антиандрогены // Гинеколог. 2004. (10). 13–21.
29. Розен В.Б. Рецепторы и стероидные гормоны. М., 1981. 312 с.
30. Саидова Р.А., Гусейнова З.С., Олимпиева С.П. Информативность гормональных показателей ранних сроков беременности для диагностики неразвивающейся беременности у пациенток с гиперандрогенией // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2011. 11. (4). 4–8.
31. Серов В.Н., Прилепская В.Н., Овсянникова Т.В. Гинекологическая эндокринология. М., 2006. 488 с.
32. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. М., 2002. 304 с.
33. Сидельникова В.М. Глюкокортикоиды в акушерской практике – за и против // Акушерство и гинекология. 2010. (1). 3–5.
34. Суплотова Л.А. Применение глюкокортикоидных препаратов в терапии андроген-зависимых осложнений беременных // Пробл. репродукции. 2007. 13. (1). 92–95.
35. Чагай Н.Б. Сложности дифференциальной диагностики и терапии неклассической формы врожденной дисфункции коры надпочечников у пациенток репродуктивного возраста // Пробл. репродукции. 2009. 15. (3). 93–98.
36. Чернуха Г.Е. Гиперандрогения и принципы их терапии у женщин репродуктивного возраста // Медицина. Качество жизни. 2004. (2). 17–20.
37. Шилин Д.Е. Синдром гиперандрогении – современные подходы к диагностике и новые технологии // Лечащий врач. 2003. (10). 36–39.
38. Шустикова Е.Ф. Осложнения глюкокортикоидной терапии при беременности // Вопр. гинекол. акушерства перинатол. 2011. 10. (1). 40–42.
39. Amalfi S., Velez L.M., Heber M.F. et al. Prenatal hyperandrogenization induces metabolic and endocrine alterations which depends on the level of testosterone exposure // PloS One. 2012. 7. (5). e37658.
40. American Association of Clinical Endocrinologists. Medical Guidelines for the clinical practice for the diagnosis and treatment of hyperandrogenic disorders // Endocr. Pract. 2001. 7. 121–134.
41. Androgen excess disorders in women: polycystic ovary syndrome and other disorders / Eds. R. Azziz, J.E. Nestler, D. Dewailly. 2-nd edition. Totowa: Humana Press, 2006. 466 p.
42. Barbieri R.L. Hyperandrogenic disorders // Clin. Obstet. Gynecol. 1990. 33. (3). 640–654.
43. Blanche H., Vexiau P., Clauin S. et al. Exhaustive screening of the 21-hydroxylase gene in a population of hyperandrogenic women // Hum. Genet. 1997. 101. (1). 56–60.
44. Bolton S., Cleary B., Walsh J. et al. Continuation of metformin in the first trimester of women with

polycystic ovarian syndrome is not associated with increased perinatal morbidity // *Eur. J. Pediatr.* 2009. 168. 203–206.

45. Breckwoldt M. Diagnosis and therapy of androgenization. Berlin: Diesbach Verlag, 1992. 253–267.

46. Burry J.A., Kay A.R., Navaratnarajak R. et al. Umbilical vein testosterone in female infants born to mothers with polycystic ovary syndrome is elevated to male levels // *Obstet. Gynecol.* 2010. 30. (3). 444–446.

47. Carmina E., Lobo R.A. Adrenal hyperandrogenism in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome // *J. Endocrinol. Invest.* 1998. 21. (9). 580–588.

48. Chapman J.M., Wittert R.G., Norman R.J. Plasma androgen levels // *Clin. Endocrinol.* 1997. 46. (2). 175–181.

49. De Vana G.W., Czekala H.L., Judd H.L. Hyperandrogenia in syndrome polycystic ovarian // *Am. J. Obstet.* 1998. 35. 20–25.

50. Gonzales F. Adrenal involvement in polycystic ovary syndrome // *Semin. Reprod. Endocrinol.* 1997. 15. 137–157.

51. Ghazeeri G.S., Nassar A.H., Younes Z., Awward J.T. Pregnancy outcomes and the effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome: an overview // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2012. 96. (6). 658–678.

52. Ghorashi V., Sheikhaten M. The relationship between serum concentration of free testosterone and pre-eclampsia // *Endocrinol. Pol.* 2008. 59. (5). 390–392.

53. Hickey M., Sloboda D.M., Atkison N.C. et al. The relationship between maternal and umbilical cord androgen levels and polycystic ovary syndrome in

adolescence // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009. 94. (10). 3714–3720.

54. Kurtoglu S., Sarici D., Akin M.A. et al. Fetal adrenal suppression due to maternal corticosteroid use: case report // *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 2011. 3. (3). 160–162.

55. Lee J.Y., Park S.J., Kim S.H., Kim M.N. Prenatal administration of dexamethasone during early pregnancy negatively affects placental development and function in mice // *J. Anim. Sci.* 2012. 90. (13). 4846–4856.

56. Lo J.C., Grumbach M.M. Pregnancy outcomes in women with congenital virilizing adrenal hyperplasia // *Endocr. Metab. Clin.* 2001. 30(1). P. 207–29.

57. McKenna T.J., Cunningham S.K. The pathogenesis of adrenal and extra adrenal hyperandrogenism // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1993. 45. (1–3). 117–121.

58. Moran C., Azziz R., Weintrob N. et al. Reproductive outcome of women with 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia // *J. Clin. Endocr. Metab.* 2006. 91. (9). 3451–3456.

59. Rabe T., Grunwald B., Runnebaum K. Hyperandrogenism in women // *Gynec. Endocr.* 2001. 7. 517–579.

60. Recabarren S.E., Sir-Petermann T., Maliqueo M. et al. Prenatal exposure to androgens as a factor of fetal programming // *Rev. Med. Chil.* 2006. 134. (1). 101–108.

61. Sun M., Maliqueo M., Benrick A. et al. Maternal androgen excess reduce placental and fetal weights, increase placental steroidogenesis and leads to long-term health effects in their female offspring // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. 303. E1373–E1385.

HYPERANDROGENISM IN PREGNANT WOMEN: ETHIOPATHOGENESIS, DIAGNOSIS, TREATMENT, PERINATAL OUTCOMES (REVIEW)

Olga Gennad'evna MALYSHEVA, Lyubov' Aglyamovna AGARKOVA,
Irina Yur'evna BUKHARINA

Institute for Obstetrics, Gynaecology and Perinatology of SB RAMS
634063, Tomsk, Lazo str., 5

The review represents the modern data on etiology, pathogenesis and diagnostics of pregnant hyperandrogenism. Nowadays there is not common opinion about necessity and the methods of treatment because of negative influence of glucocorticoids on fetus. Different points of view are shown; new methods of metformin treatment are given. As the hyperandrogenism is considered to be the risk factor for pregnancy complications, the latest data on pregnancy outcomes are represented.

Key words: hyperandrogenism, habitual miscarriage of pregnancy, placental insufficiency, glucocorticoids.

Malysheva O.G. – candidate of medical sciences, researcher; e-mail: ogm.201@yandex.ru

Agarkova L.A. – doctor of medical sciences, professor, director; e-mail: perinat@tomsk.net

Bukharina I.Yu. – candidate of medical sciences, senior researcher, scientific secretary; e-mail: ogm.201@yandex.ru

БАКТЕРИАЛЬНО-ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ И ПРОЦЕССЫ ГЕМОКОАГУЛЯЦИИ У БЕРЕМЕННЫХ С МЕЗЕНХИМАЛЬНОЙ ДИСПЛАЗИЕЙ

Евгения Геннадьевна КУДИНОВА¹, Андрей Павлович МОМОТ¹,
Ирина Алексеевна ТАРАНЕНКО¹, Илья Анатольевич КАРБЫШЕВ²

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

² КГБУЗ Диагностический центр Алтайского края
656038, г. Барнаул, пр. Комсомольский, 75а

В статье представлены результаты изучения взаимосвязи бактериально-вирусных инфекций репродуктивного тракта с особенностями процессов гемокоагуляции у беременных с недифференцированными формами мезенхимальной дисплазии. На основании результатов исследования выдвигается гипотеза, согласно которой недостаточная иммунная защита при нарушении коллагенообразования в репродуктивных органах приводит к более высокой частоте бактериально-вирусного инфицирования генитального тракта беременных и опосредованно усугубляет гемокоагуляционные сдвиги во время вынашивания беременности у таких пациенток.

Ключевые слова: мезенхимальная дисплазия, беременные женщины, тромбофилия, бактериально-вирусная инфекция.

Распространение патогенных возбудителей в генитальном тракте у пациенток во время беременности зависит не только от выраженности иммунного ответа, характеризующегося увеличением экспрессии провоспалительных цитокинов и интенсивности фагоцитарных реакций. В результате повреждения клеток и структурирования цитоплазмы [4, 8], приводящих к высвобождению большого количества фактора Виллебранда, тканевого фактора на проникновение микроорганизмов в репродуктивные органы, происходит усиление агрегации тромбоцитов, уменьшение эластичности эритроцитов и ускорение свертывания крови, а также угнетение системы фибринолиза. Таким образом, реализуется защитный механизм нарушения микроциркуляции при проникновении бактериально-вирусных возбудителей. Большое количество тканевого фактора поступает из эндотелия при возникновении тромбогенности сосудистой стенки. У пациенток с мезенхимальной дисплазией (МД) нередко дефекты волокнистых структур и основного вещества соединительной ткани в репродуктивных органах сочетаются с ангиопатиями и врожденными из-

менениями в системе гемостаза, характеризующимися не только геморрагическими проявлениями, но и тромботическими сдвигами [9, 10], что может проявиться плацентарными нарушениями и гипоксией плода. Лечение бактериально-вирусных инфекций (БВИ) даже с учетом возбудителя не эффективно без исследования системы гемостаза, в связи с чем актуально рассмотрение данного вопроса [12].

Целью исследования явилось изучение частоты бактериально-вирусных инфекций генитального тракта у беременных с недифференцированными формами мезенхимальной дисплазии и сопряженных с ними гемокоагуляционных сдвигов в системе гемостаза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 780 беременных. В зависимости от особенностей формирования менструальной функции в пубертатном периоде и наличия недифференцированных форм МД пациентки были разделены на 4 группы. В 1-ю группу были включены 345 пациен-

Кудина Е.Г. – к.м.н., докторант кафедры гематологии и трансфузиологии ФПК и ППС, e-mail: kudinaite@mail.ru

Момот А.П. – д.м.н., проф., директор Алтайского филиала ГНЦ, e-mail: xuzan@yandex.ru

Тараненко И.А. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: tarania@mail.ru

Карбышев И.А. – зав. отделом лабораторной диагностики, e-mail: karbyshev@dcak.ru

ток с недифференцированными формами МД и нарушениями менструального цикла (НМЦ) в пубертатном периоде, во 2-ю – 180 пациенток с недифференцированными формами МД и с физиологическим ритмом менструаций в анамнезе, в 3-ю – 260 пациенток без недифференцированных форм МД и с физиологическим ритмом менструаций в анамнезе, в 4-ю – 95 пациенток без признаков МД и с НМЦ в пубертатном периоде. Критерии исключения: женщины с аномалиями развития репродуктивных органов, пациентки с синдромом поликистозных яичников и хромосомными нарушениями. Рандомизация групп осуществлялась по возрасту. Беременные обследовались и консультировались в Алтайском филиале Гематологического научного центра на базе КГБУЗ Алтайская краевая клиническая больница г. Барнаула.

Лабораторная верификация бактериально-вирусного носительства у пациенток проводилась с помощью микроскопии мазков по Грамму, бактериального посева из цервикального канала. Кроме того, выявление инфекционных возбудителей генитального тракта – вируса простого герпеса 1-го и 2-го типа, цитомегаловируса, хламидий, микоплазм и уреаплазм, осуществлялось методом полимеразной цепной реакции в лаборатории иммунологических и биохимических исследований КГБУЗ Диагностический центр Алтайского края.

Определение мутаций и полиморфизмов генов, предрасполагающих к тромбозу, выполнялось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на оборудовании ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия). В их числе определялось носительство мутаций F5 Лейден (1691G>A), FII (20210G>A), полиморфизмов гена *MTNFR* (C677>T) и гена ингибитора активатора плазминогена *PAI 1* (5G>4G).

Определение маркеров тромбинемии проводилось по уровню растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) в тесте с орто-фенантролином [9].

Научно-исследовательский проект был утвержден 30.11.2009 (протокол № 10) и соответствовал этическим стандартам локального биоэтического комитета при ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России. Проведение научно-исследовательской работы разработано в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 266. Все лица, участвующие в исследовании,

подписали информированное согласие на участие в исследовании.

При проведении *статистической обработки* полученных данных использовался дисперсионный анализ для проверки статистических гипотез. Применялся парный двухвыборочный *t*-тест для средних. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (*Me*), выявлялись средние значения признака (*M*), среднее квадратичное отклонение (*SD*), достоверность различий определялась с помощью *t*-критерия Стьюдента, корреляционный анализ проводился по методу Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст женщин 1-й, 2-й, 3-й и 4-й групп составил соответственно $22,93 \pm 3,86$, $22,54 \pm 3,52$, $22,17 \pm 3,66$ и $22,78 \pm 3,44$ года, статистически значимых различий не обнаружено. Количество первобеременных и повторобеременных было идентичным. Среднее значение выраженности недифференцированных признаков МД по шкале Е.В. Уваровой и соавторов [11] у пациенток 1-й и 2-й групп ($8,84 \pm 2,78$ и $8,12 \pm 2,88$ балла соответственно) расценивалось как легкая степень проявлений дисплазии соединительной ткани (до 9 баллов).

Пациентки 1-й и 2-й групп имели соматические вегетативные дисфункции (38,6 %), заболевания опорно-двигательного аппарата в виде деформаций позвоночника и торако-диафрагмального синдрома (36,4 %), нарушения органов зрения (36,4 %), являющиеся признаками диспластического фенотипа [5]. У женщин с МД и НМЦ уже при первой беременности наблюдались статистически значимые различия в частоте венозной недостаточности нижних конечностей, варикозного расширения вен малого таза, наружных половых органов и геморроя в сравнении с пациентками 2-й группы (13,6 и 6,3 % соответственно). Оказалось, что у пациенток с недифференцированными формами МД встречалось более частое ($p < 0,001$) носительство аллельных полиморфизмов протромботической направленности (91,0 % в 1-й и 97,4 % во 2-й группе) по сравнению с этим же показателем в других группах – соответственно 74,2 % в 3-й и 87,5 % в 4-й группе. У 13,3 % пациенток 1-й группы наблюдалось осложненное течение беременности в виде наклонности к тромбозам (преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, замершая беременность, угроза выкидыша с формированием субхорионической гематомы).

Учитывая, что гинекологические заболевания усугубляют формирование репродуктивного

здоровья, мы определили частоту распространенности воспалительных заболеваний нижних отделов генитального тракта и органов малого таза до беременности в группах сравнения. Воспалительные заболевания нижнего отдела генитального тракта в 1-й, 2-й, 3-й и 4-й группах (37,1, 23,4, 9,5 и 1,7 % соответственно) и органов малого таза (15,9, 9,6, 4,0 и 1,7 % соответственно) более чем в три раза преобладали в группе беременных, имеющих недифференцированные формы мезенхимальной дисплазии. Наибольшая несостоятельность репродуктивного здоровья ($p < 0,001$) была выявлена у пациенток 1-й группы.

Беременность у женщин с мезенхимальной дисплазией протекала на фоне нарушений со стороны амниотической жидкости и плодных оболочек (многоводие и маловодие) более чем в полтора раза чаще (6,4 и 5,8 % соответственно) в сравнении с пациентками без МД (3,9 и 2,9 %), что соотнобразуется с данными авторов, изучающих данный вопрос [6]. При морфологическом исследовании последов обнаружено, что у женщин с МД 1-й и 2-й групп серозный хориодецидуит, серозный мембранит, мекониефаги как признаки инфицирования плаценты и оболочек вирусами и бактериями встречались соответственно более чем в пять раз чаще ($p < 0,001$), чем у пациенток 3-й группы (30,5, 32,2 и 5,7 % соответственно). Эти изменения усугубили имеющуюся у бере-

менных с мезенхимальной дисплазией плацентарную недостаточность и привели к более выраженному антенатальному страданию их плодов.

Одним из факторов повреждения эндотелия в настоящее время считаются инфекционные агенты в виде вирусов простого герпеса 1 и 2 типа, цитомегаловирусов, урогенитальных хламидий [7].

Персистирующая бактериально-вирусная инфекция наблюдалась у каждой второй пациентки с недифференцированными формами МД, тогда как у беременных без МД лишь у каждой четвертой выявлена БВИ. При этом у пациенток 1-й и 2-й групп наиболее часто встречались уреоплазмы и микоплазмы, гарднереллы и дрожжевые грибы рода *Candida*. Бактериальные возбудители в генитальном тракте в 2,5 раза чаще выявлялись у женщин с МД и НМЦ, чем у пациенток 3-й группы. У каждой пятой беременной с МД и НМЦ в анамнезе отмечалось вирусоносительство, причем в 1-й группе беременные в 2,5 раза чаще являлись носителями цитомегаловируса, вируса простого герпеса и вируса папилломы человека (см. таблицу), чем пациентки, не имеющие признаков МД.

Более половины пациенток 1-й и 2-й групп на фоне отягощенного акушерского анамнеза и разнонаправленных соматических заболеваний имели фетоплацентарную компенсированную не-

Таблица

Частота бактериально-вирусных инфекций генитального тракта у беременных в зависимости от наличия недифференцированных форм мезенхимальной дисплазии, %

Бактериально-вирусные инфекции генитального тракта	1-я группа (n = 290)	2-я группа (n = 160)	3-я группа (n = 245)	4-я группа (n = 90)	Уровень достоверности различий p
<i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Mycoplasma hominis</i>	20,7	18,8	7,3	15,5	$p_{1-3} < 0,00001$ $p_{2-3} < 0,0005$ $p_{3-4} < 0,02$
<i>Candida albicans</i>	9,3	11,3	3,6	8,8	$p_{1-3} < 0,008$ $p_{2-3} < 0,002$ $p_{3-4} < 0,05$
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1,6	3,5	1,2	0	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2,4	1,7	1,2	0	
Бактериальный вагиноз	13,7	17,5	6,9	6,6	$p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,001$
<i>Cytomegalovirus hominis</i>	6,1	4,4	3,7	3,3	
Вирус простого герпеса	1,7	1,7	0,4	1,1	
Вирус папилломы человека	5,3	1,3	1,2	2,2	$p_{1-2} < 0,003$ $p_{1-3} < 0,009$
Всего пациенток с БВИ генитального тракта	60,2	60,2	25,5	37,5	$p_{1-3} < 0,00001$ $p_{2-3} < 0,00001$ $p_{1-4} < 0,0002$ $p_{3-4} < 0,03$

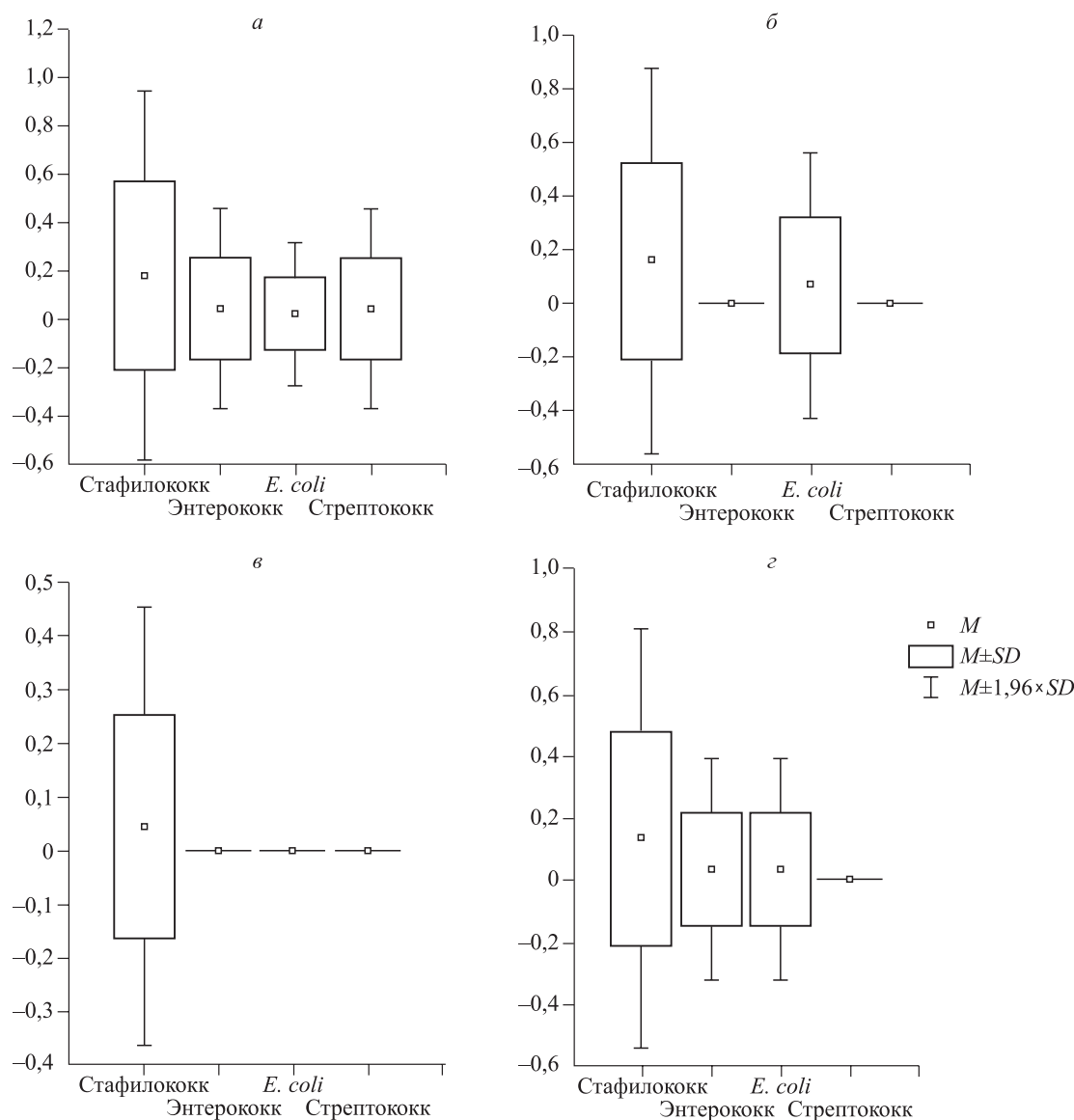


Рис. 1. Диаграмма размаха частоты выделения микроорганизмов при беременности у пациенток 1-й группы (n = 45) с МД и НМЦ в анамнезе (а), 2-й группы (n = 45) с МД и физиологическим ритмом менструаций в анамнезе (б), 3-й группы (n = 45) без МД и с физиологическим ритмом менструаций в анамнезе (в), 4-й группы (n = 30) без МД и с НМЦ в анамнезе (г)

достаточность (55,9 и 42,6 % соответственно) – существенно больше ($p < 0,0001$) по сравнению с пациентками 3-й и 4-й групп (15,5 и 28,3 % соответственно). У каждой пятой женщины с признаками МД и НМЦ наблюдались суб- или декомпенсированные формы плацентарной недостаточности, нарушение кровообращения в маточно-плацентарном русле и рождение маловесных для срока беременности детей с признаками гипоксии (показатели в 1–4-й группах соответственно 18,0, 6,1, 3,0 и 0 %). Установлено, что у 1,6 % женщин 1-й группы беременность завершилась родами с перинатальными потерями (антенатальная гибель плода 0,8 %; неонатальные

потери 0,8 %), в других же группах беременность протекала без перинатальных потерь.

В ходе проведенного исследования результатов бактериальных посевов из цервикального канала установлено (рис. 1, а), что возбудителями инфекции в большинстве случаев у беременных с МД явились микроорганизмы семейства *Staphylococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* ($p < 0,001$). Персистенция возбудителей в генитальном тракте у беременных с МД способствовала формированию у них воспалительного ответа и запуску каскада гемокоагуляционных реакций, в результате чего наблюдалось увеличение коа-

гуляционного потенциала (рис. 2). У пациенток без признаков мезенхимальной дисплазии отмечалось более низкая частота инфицирования *Staphylococcus* spp., а в 3-й группе *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* вообще не были выявлены (см. рис. 1, в, г).

Признаки сосудистой системной воспалительной реакции эндотелия, сопряженной с активацией системы гемостаза и повышенным риском тромбообразования [3], проявились в повышении содержания фибриногена ($p < 0,03$) у пациенток с мезенхимальной дисплазией. При исследовании некоторых показателей (концентрация фибриногена, количество лейкоцитов, СОЭ) выявлена средняя степень зависимость между концентрацией фибриногена и численностью лейкоцитов во втором и третьем триместрах у пациенток с мезенхимальной дисплазией ($r = 0,625$ и $r = 0,516$ соответственно; $p < 0,05$). У беременных, не имеющих признаков мезенхимальной дисплазии, корреляционная взаимосвязь между данными показателями оказалась слабой ($r = 0,316$ и $r = 0,180$, соответственно; $p > 0,05$).

При оценке сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у женщин с мезенхимальной дисплазией с ранних сроков беременности обнаружено, что наиболее часто выявлялся анизоцитоз тромбоцитов и эритроцитов, что свидетельствовало об увеличении количества молодых форм клеточных элементов и ускорении тромбоцитопоэза и эритропоэза. Так, медианы анизоцитоза тромбоцитов в 1-й и 2-й группах (17,14 и 16,49 соответственно) были выше ($p < 0,01$), чем в 3-й и 4-й группах (15,88 и 16,38 соответственно). В ходе исследования функции тромбоцитов у пациенток с мезенхимальной дисплазией в 1-й и 2-й группах выявлено увеличение их агрегационной активности в ответ на добавление коллагена (см. рис. 2) в сравнении с пациентками без признаков МД в 3-й и 4-й группах.

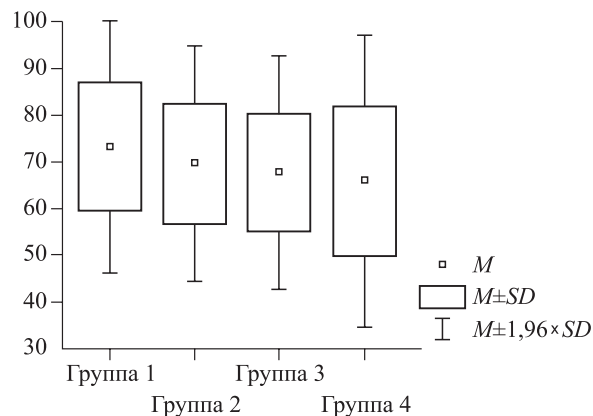


Рис. 2. Диаграмма размаха значений индуцированной агрегации тромбоцитов с добавлением коллагена у беременных с наличием и отсутствием дисплазии соединительной ткани (различия между группой 1 ($n = 56$) и группой 3 ($n = 50$) статистически значимы, $p < 0,03$)

Важными событиями в процессе гемостаза является активация моноцитов и продукция ими тканевого фактора свертывания крови [1, 7, 9]. У пациенток с мезенхимальной дисплазией (1-я группа) отмечено с ранних сроков беременности снижение численности моноцитов в периферическом русле ($p < 0,05$) – $4,82 \pm 1,51 \times 10^8/\text{л}$, что связано с каскадом адгезии этих клеток к поверхности эндотелия и миграцией в субэндотелиальное пространство в результате проникивания микробных агентов. У беременных остальных групп данный показатель оказался выше: во 2-й группе он составил $5,77 \pm 1,78 \times 10^8/\text{л}$, в 3-й группе – $5,85 \pm 1,86 \times 10^8/\text{л}$, в 4-й группе – $5,79 \pm 1,65 \times 10^8/\text{л}$. Результатом таких взаимодействий явилось прогрессирование эндотелиальной дисфункции и формирование микроциркуляторных нарушений в маточно-плацентарном кровотоке у пациенток с нарушением коллагенообразования.

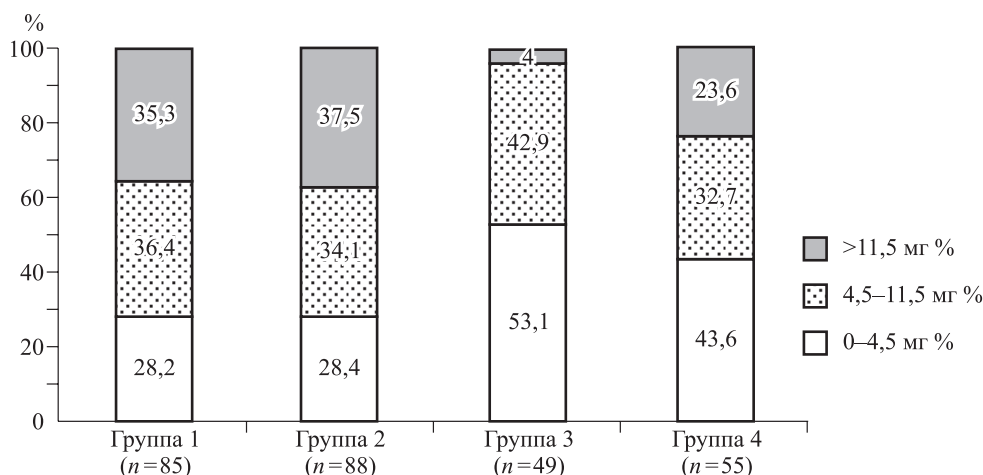


Рис. 3. Содержание РФМК в плазме крови женщин исследуемых групп

Известно, что при тромбинемии и активации свертывания крови происходит расслоение фибриногенового пула в плазме крови с появлением фракции высокомолекулярных производных фибриногена – РФМК [1, 2]. В наших наблюдениях в плазме каждой третьей беременной с МД определялся повышенный уровень РФМК в сравнении с пациентками без признаков МД (рис. 3).

Таким образом, у беременных с недифференцированными формами мезенхимальной дисплазии, сопряженными с носительством протромбогенных аллельных полиморфизмов, установлена более высокая частота бактериально-вирусного инфицирования генитального тракта, что может повлечь за собой повышенный риск тромбообразования и развитие акушерских осложнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: НЬЮДИАМЕД, 2008. 289 с.
2. Батрак Т.А. Участие нарушений полимеризации мономеров фибрина в генезе различных видов кровоточивости: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Барнаул, 1999.
3. Волкова Л., Аляутдина О., Пальцев М., Пальцева Е. Оценка сосудистого эндотелия при различных акушерских патологиях // Врач. 2011. (5). 86–87.
4. Гладких Н.Н., Ягода А.В. Клинико-патогенетические аспекты изменений в системе гемостаза при врожденной дисплазии соединительной ткани // Гематол. трансфузиол. 2007. (3). 42–47.
5. Кадурина Т.И., Горбунова В.Н. Дисплазия соединительной ткани. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2009. 701 с.
6. Козина О.В., Мельник Е.В., Бархина Т.Г., Липман А.Д. Морфофункциональная характеристика плодных оболочек при недифференцированной дисплазии соединительной ткани у матери // Материалы IV съезда акушеров-гинекологов России. М., 2008. 120.
7. Костюченко Г.И., Арзамасцев Д.А., Ананьев Д.А. и др. Роль хронического сосудистого воспаления в патогенезе атеротромботических поражений артерий. Подходы к терапии больных // Гемостазиология. 2012. (2). 53–60.
8. Кузник Б.И., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. и др. Белки теплового шока, атеросклероз, тромбоз, ДВС-синдром и продолжительность жизни. Пептидные механизмы регуляции // Гемостазиология. 2011. (2). 28–52.
9. Момот А.П. Современные методы распознавания тромботической готовности. Барнаул, 2011. 137 с.
10. Суханова Г.А., Баркаган З.С., Котовицкова Е.Ф. Тромботические мезенхимальные дисплазии и их связь с другими тромбофилиями // Гематол. трансфузиол. 2003. (6). 13–14.
11. Уварова Е.В., Гайнова И.Г. Дифференцированный подход к диагностике и лечению дисменореи у девушек // Гинекология. 2003. (4). 23–25.
12. Ходжаева З.С., Сидельникова В.М., Кирющенко П.А., Ходжаева А.С. Применение системной энзимотерапии в акушерстве и гинекологии // Гинекология. 2003. (6). 233–238.

BACTERIAL-VIRAL INFECTIONS AND HAEMOCOAGULATION PROCESSES AT PREGNANTS WITH MESENCHYMAL DYSPLASIA

**Eugenia Gennad'evna KUDINOVA¹, Andrey Pavlovich MOMOT¹,
Irina Alekseevna TARANENKO¹, Il'ya Anatol'evich KARBYSHEV²**

¹ *Altay State Medical University of Minzdrav of Russia
656038, Barnaul, Lenin av., 40*

² *Altai Diagnostic center
656038, Barnaul, Komsomolsk str., 75a*

The results of investigation on interrelation between bacterial-virus infections of reproductive tract and features of clotting processes at pregnant with mesenchymal dysplasia undifferentiated forms are presented. On the basis of the research results the hypothesis according to which insufficient immune protection at collagen forming disorder in reproductive organs leads to the higher frequency of bacterial-virus infection of genital tract of pregnant and indirectly aggravates hemocoagulative shifts during pregnancy of such patients.

Key words: mesenchymal dysplasia, pregnant, thrombophilia, bacterial-viral infection.

Kudinova E.G. – candidate of medical sciences, e-mail: kudinaite@mail.ru

Momot A.P. – doctor of medical sciences, professor, director

Taranenko I.A. – candidate of medical sciences, senior researcher, e-mail: tarania@mail.ru

Karbyshev I.A. – head of the diagnostics laboratory, e-mail: karbyshev@dcak.ru

АКТИВНОСТЬ МЕСТНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО И ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПРОЦЕССА В ПАТОГЕНЕЗЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Валерий Вячеславович ЧЕРНЫХ¹, Егор Викторович ВАРВАРИНСКИЙ¹,
Ольга Михайловна ГОРБЕНКО², Аля Петровна ШВАЮК²,
Дмитрий Валерьевич ЧЕРНЫХ¹, Александр Николаевич ТРУНОВ^{1,2}

¹ Новосибирский филиал ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова
Минздрава России
630071, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10

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

Проведено определение концентраций фактора роста эндотелия сосудов, интерлейкинов 4, 6, 17A в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией. Установлено, что в патогенезе пролиферативной диабетической ретинопатии происходит активация местного иммуновоспалительного процесса и сосудистой пролиферации, о чем свидетельствует достоверное повышение в стекловидном теле концентраций ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-17A и фактора роста эндотелия сосудов. Выявленные корреляционные взаимосвязи между изучаемыми показателями свидетельствуют о сопряженности этих процессов.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, цитокины, фактор роста эндотелия сосудов.

В настоящее время в мире насчитывается 200 миллионов человек, страдающих сахарным диабетом, и их число практически удваивается каждые 10–15 лет. Не вызывает сомнения, что офтальмологические осложнения, возникающие при развитии сахарного диабета, являются важнейшей медико-социальной проблемой, что связано с их значимостью в инвалидизации пациентов, высоким удельным весом в структуре нарушений зрения и необратимой слепоты – тяжелыми социальными последствиями как для отдельного человека, так и для общества в целом [1, 2, 6].

Несмотря на все успехи современной медицины, совершенствование методов контроля содержания глюкозы в крови, существующих методов профилактики и лечения диабетических поражений органа зрения, одним из самых тяжелых специфических поражений глаза остается диабетическая ретинопатия. Известно, что ее распространенность среди больных сахарным диабетом во многом зависит от длительности течения патологического процесса, полноты проведения ком-

плексного лечения и может достигать 80–90 %. Прогрессирование диабетической ретинопатии может осложняться рецидивирующими внутриглазными кровоизлияниями, фиброзом сетчатки и стекловидного тела, тракционной отслойкой сетчатки, атрофией зрительного нерва, что приводит к развитию необратимой слепоты [1, 8, 9, 14].

В настоящее время сахарный диабет рассматривается как многофакторный процесс. Его патогенетической основой являются системные и локальные сосудистые, а также метаболические нарушения, которые приводят и к возникновению поражений органа зрения.

Показано, что у пациентов с диабетической ретинопатией выявляются нарушения, свидетельствующие о значимости в ее патогенезе активности воспалительного процесса, нарушений функционального состояния иммунной системы, включая дисбаланс индукторов межклеточных взаимоотношений – цитокинов, матричных металлопротеиназ, факторов роста и др. [4, 5, 10, 12, 13]. В последние годы большое значение придается роли факторов роста сосудистого эндо-

Черных В.В. – д.м.н., проф., директор

Варваринский Е.В. – врач-офтальмолог

Горбенко О.М. – к.б.н., старший научный сотрудник

Шваюк А.П. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: trunov1963@yandex.ru

Черных Д.В. – врач-офтальмолог

Трунов А.Н. – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, руководитель лаборатории иммунологии, e-mail: trunov1963@yandex.ru

тения в механизмах развития пролиферативной диабетической ретинопатии [3, 7, 11]. Однако, несмотря на активное изучение различных механизмов возникновения и развития диабетической ретинопатии, многие аспекты ее патогенеза требуют дальнейшего изучения, а данные, имеющиеся в настоящее время, о роли дисбаланса, про-, противовоспалительных и регуляторных цитокинов во взаимосвязи с активацией синтеза факторов, активирующих пролиферацию, остаются дискуссионными и требуют дальнейшего изучения [8].

Все вышеизложенное позволило сформулировать цель настоящего исследования – изучить содержание фактора роста эндотелия сосудов, интерлейкинов ИЛ-17А, ИЛ-4, ИЛ-6 в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 38 пациентов, прошедших хирургическое лечение по поводу тракционной отслойки сетчатки на базе Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в период с 2011 по 2012 г. У всех пациентов было получено информированное согласие на использование данных обследования в научных целях, исследования выполняли с согласия локального этического комитета, согласно нормам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

Возраст пациентов составлял от 25 до 78 лет (в среднем $52,6 \pm 4,5$ года). Количество женщин в обследованной группе составило 18 человек, мужчин – 16. В основную группу вошли 22 пациента (14 женщин и 8 мужчин) с тракционной отслойкой сетчатки на фоне пролиферативной диабетической ретинопатии (средний возраст $50,5 \pm 3,2$ года), в группу сравнения – 16 пациентов (6 женщин и 10 мужчин) с тракционной отслойкой сетчатки, не болевших сахарным диабетом и, соответственно, не имевших признаков диабетической ретинопатии (средний возраст $55,5 \pm 2,6$ года). Указанное позволило, при сходном патологическом процессе, связанном с отслойкой сетчатки, определить изменения концентраций изучаемых цитокинов в стекловидном теле, связанные с влиянием сахарного диабета (сравнить полученные величины с референсными значениями не представляется возможным в силу их отсутствия по этическим и медицинским причинам, поскольку для этого потребовалось бы забрать стекловидное тело у здорового человека).

Пациенты обеих подгрупп во время предоперационной подготовки и в послеоперацион-

ный период получали стандартную схему терапии, принятую в Новосибирском филиале ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России: Наклоф 0,1 % раствор (глазные капли), Дексаметазон 0,1 % раствор (глазные капли) – инстилляцией в конъюнктивальный мешок по одной капле 3 раза в сутки в течение 10 дней, Тобрекс 0,3 % раствор (глазные капли) – субконъюнктивально по одной капле 2 раза в сутки в течение 14 дней, Тропикамид 1 % раствор (глазные капли) – инстилляцией в конъюнктивальный мешок по одной капле 3 раза в сутки в течение 7 дней.

Оперативное лечение отслойки сетчатки пациентам обеих групп проводилось по стандартной методике задней трехпортовой витрэктомии 25G, 23G. В качестве исследуемого материала использовалось стекловидное тело, забранное на начальных этапах витрэктомии. Для исключения попадания бессолевого раствора забор материала осуществлялся на фоне воздушной тампонады. Далее проводилась мобилизация сетчатки, ее фиксация перфторорганическим соединением, эндолазеркоагуляция. Во всех случаях витрэктомия была завершена тампонадой силиконовым маслом.

Полученный биологический материал помещался в пробирки и центрифугировался в течение 10 мин при 3000 оборотах в минуту на центрифуге ОПН-3. Образовавшийся надосадочный слой помещался в пластиковые пробирки, замораживался и в дальнейшем использовался для лабораторной диагностики.

В качестве методов лабораторной диагностики было выбрано определение содержания следующих сигнальных белков.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), биологически активная субстанция, способная, связываясь и активируя мембранные рецепторы, запускать сигнальный каскад, стимулирующий рост и пролиферацию эндотелиальных клеток сосуда. После образования новых сосудов VEGF выступает фактором выживаемости через подавление апоптоза эндотелиоцитов. Определение содержания VEGF в стекловидном теле выполнялось с использованием коммерческих тест-систем производства ООО «ВекторБест» (Новосибирск) по инструкции производителя.

Интерлейкин-17А, являющийся провоспалительным цитокином, секретлируемым активированными Т-клетками, и стимулирующий синтез провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , молекул межклеточной адгезии и др.

ИЛ-4 – цитокин, обладающий противовоспалительными свойствами, является активатором Т-хелперного ответа 2-го типа, что определяет

значимость его в развитии иммуновоспалительных и аутоиммунных процессах.

ИЛ-6 – провоспалительный цитокин, являющийся значимым фактором в процессах хронизации воспалительных процессов, в том числе аутоиммунной этиологии.

Определение содержания ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-17А в стекловидном теле выполнялось на коммерческих тест-системах производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) по инструкции производителя.

Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре «Униплан» при длине волны 450 нм.

Полученные цифровые данные были подвергнуты статистическому анализу и представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего. Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Корреляция показателей вычислялась по методу Спирмена. Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем вероятности 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Концентрация фактора роста эндотелия сосудов в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией была более чем в 23 раза выше, чем у пациентов с тракционной отслойкой сетчатки без признаков пролиферативной диабетической ретинопатии ($p < 0,001$).

Концентрация провоспалительного цитокина ИЛ-17А в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией была в 2,8 раза больше значений показателя у пациентов с тракционной отслойкой сетчатки без признаков пролиферативной диабетической ретинопатии ($p < 0,001$).

Таблица

Содержание цитокинов (пг/мл) в стекловидном теле пациентов обследованных групп ($M \pm m$)

Показатель	Группа сравнения	Основная группа
Содержание VEGF	$65,2 \pm 11,2$	$1491 \pm 183,1^*$
Содержание ИЛ-4	$8,1 \pm 0,5$	$32,5 \pm 9,4^*$
Содержание ИЛ-6	$32,8 \pm 8,7$	$64,2 \pm 10,4^*$
Содержание ИЛ-17А	$64,3 \pm 4,8$	$184,2 \pm 18,7^*$

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы сравнения достоверно при $p < 0,05$.

Содержание ИЛ-4 в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией в 4 раза превышало величину соответствующего показателя у пациентов с тракционной отслойкой сетчатки без признаков пролиферативной диабетической ретинопатии ($p < 0,001$).

Концентрация ИЛ-6 в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией была в 1,9 раза больше, чем у пациентов с тракционной отслойкой сетчатки без признаков пролиферативной диабетической ретинопатии ($p < 0,001$).

При исследовании стекловидного тела пациентов основной группы были выявлены прямая коррелятивная взаимосвязь между концентрациями VEGF и ИЛ-17А ($r = 0,5$; $p < 0,05$) и обратная зависимость между содержанием ИЛ-17А и ИЛ-4 ($r = -0,43$; $p < 0,05$). Обнаруженные коррелятивные взаимосвязи свидетельствуют о сопряженности активности пролиферативного и иммуновоспалительного процессов в патогенезе пролиферативной диабетической ретинопатии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило показать, что в механизмах развития пролиферативной диабетической ретинопатии значимую роль играет высокая активность местного иммуновоспалительного процесса, о чем свидетельствует достоверно более высокое, чем у лиц группы сравнения, содержание цитокинов ИЛ-17А, ИЛ-6, ИЛ-4 в стекловидном теле. Указанные процессы приводят к активации сосудистой пролиферации и проявляются более чем 20-кратным повышением содержания фактора роста эндотелия сосудов в стекловидном теле. Выявленные корреляционные взаимосвязи свидетельствуют о сопряженности развития иммуновоспалительного и пролиферативного процессов.

Работа выполнялась с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глазные проявления диабета / Под ред. Л.И. Балашевича. СПб., 2004. 382 с.
2. Либман Е.С., Шахова Е.В. Слепота и инвалидность вследствие патологии органа зрения в России // Вестн. офтальмологии. 2006. 1. 35–37.
3. Слепова О.С., Нероев В.В., Илюхин П.А., Сарыгина О.И. Иммунологический контроль при хирургическом лечении больных с пролиферативной диабетической ретинопатией с предварительным

интравитреальным введением Луцентиса // Рос. офтальмол. журн. 2012. (1). 69–74.

4. Черных В.В., Лысков А.Г., Обухова О.О. и др. Особенности местного иммуновоспалительного процесса при непролиферативной диабетической ретинопатии // Вестн. НГУ. 2011. 9. (1). 164–168.

5. Ходжаев Н.С., Черных В.В., Роменская И.В. и др. Влияние лазеркоагуляции сетчатки на клинико-лабораторные показатели у пациентов диабетическим макулярным отеком // Вестн. НГУ. 2011. 9. (4). 48–53.

6. Bhavsar A.R. Diabetic retinopathy: the latest in current management // Retina. 2006. 26. (6). 71–79.

7. Citirik M., Kabatas E.U., Batman C. et al. Vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in proliferative diabetic retinopathy versus proliferative vitreoretinopathy // Ophthalmic Res. 2012. 47. (1). 7–12.

8. Lim A., Stewart J., Chui T.Y. et al. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in a multi-racial underserved population // Ophthalmic Epidemiol. 2008. 6. 402–409.

9. Kollias A.N., Ulbig M.W. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment // Dtsch. Arztebl. Int. 2010. 5. 75–83.

10. Kowluru R.A., Zhong Q., Kanwar M. Metabolic memory and diabetic retinopathy: role of inflammatory mediators in retinal pericytes // Exp. Eye Res. 2010. 5. 617–623.

11. Pennock S., Kazlauskas A. Vascular endothelial growth factor A competitively inhibits platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent activation of PDGF receptor and subsequent signaling events and cellular responses // Mol. Cell Biol. 2012. 32. (10). 1955–1966.

12. Rasier R., Gormus U., Artunay O. et al. Vitreous levels of VEGF, IL-8, and TNF-alpha in retinal detachment // Curr. Eye Res. 2010. 35. (6). 505–509.

13. Symeonidis C., Papakonstantinou E., Androudi S. et al. Interleukin-6 and the matrix metalloproteinase response in the vitreous during proliferative vitreoretinopathy // Cytokine. 2011. 54. (2). 212–217.

14. Sadaka A., Giuliani G.P. Proliferative vitreoretinopathy: current and emerging treatments // Clin. Ophthalmol. 2012. 6. 1325–1333.

ACTIVITY OF THE LOCAL INFLAMMATORY AND PROLIFERATIVE PROCESSES IN THE PATHOGENESIS OF DIABETIC RETINOPATHY

Valery Vyacheslavovich CHERNYKH¹, Yegor Victorovich VARVARINSKY¹,
Olga Mikhailovna GORBENKO², Alja Petrovna SHVAYUK²,
Dmitry Valerievich CHERNYKH¹, Aleksandr Nikolaevich TRUNOV^{1,2}

¹ Novosibirsk Affiliation of the Academician S.N. Fyodorov Federal State Budgetary Institution Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» of Minzdrav of Russia 630071, Novosibirsk, Kolkhidskaya str., 10

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

The determination of the concentrations of vascular endothelial growth factor, interleukin 4, 6 and 17A in the vitreous body of patients with proliferative diabetic retinopathy has been carried out. It has been found that an activity of local immuno-inflammatory process (increased concentrations of IL-4, IL-6, IL-17A) and vascular proliferation (increased concentrations of vascular endothelial growth factor) play significant role in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. Revealed correlation interconnections between test characteristics testify to these processes associativity.

Key words: diabetic retinopathy, cytokines, vascular endothelial growth factor.

Chernykh V.V. – doctor of medical sciences, professor, director

Varvaranskiy E.V. – ophthalmologist, e-mail: rimma@mntk.nsk.ru

Gorbenko O.M. – candidate of biological sciences, senior researcher

Shvayuk A.P. – candidate of biological sciences, senior researcher

Chernykh D.V. – ophthalmologist, e-mail: rimma@mntk.nsk.ru

Trunov A.N. – doctor of medical sciences, professor, deputy director; head of the laboratory of immunology, e-mail: trunov1963@yandex.ru

МОДИФИКАЦИЯ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Татьяна Павловна НОВГОРОДЦЕВА¹, Юлия Константиновна ДЕНИСЕНКО¹,
Марина Владимировна АНТОНЮК¹, Наталья Владимировна ЖУКОВА^{2,3}

¹ Владивостокский филиал ФГБУ Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения 690105, г. Владивосток, ул. Русская, 73г

² ФГБУ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН 690059, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

³ Дальневосточный федеральный университет 690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8

С целью изучения состава жирных кислот мембран эритроцитов крови при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) в фазе ремиссии обследовано 20 пациентов с диагнозом ХОБЛ легкой степени тяжести в фазе ремиссии и 20 здоровых человек. Состав жирных кислот мембран эритроцитов изучали методом газожидкостной хроматографии. Установлено, что у лиц с ХОБЛ наблюдается модификация состава жирных кислот мембран эритроцитов, характеризующаяся накоплением насыщенных (15:0, 18:0, 20:0) и п6 полиненасыщенных (20:4п6, 22:4п6), дефицитом п3 полиненасыщенных (20:5п3, 22:5п3) жирных кислот, патогенетической основой которой является нарушение их метаболизма. Таким образом, дезорганизация липидного компонента клеточной мембраны является важным звеном патогенеза ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, жирные кислоты, мембрана клетки.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности в современном обществе и представляет собой значительную экономическую и социальную проблему [12]. Важным элементом патогенеза любого неинфекционного заболевания, в том числе и ХОБЛ, является нарушение липидного обмена [3, 13, 14]. Функции липидов в системе органов дыхания очень значительные и специфические [2]. В легких липиды выполняют роль поверхностно-активного фактора, регулятора соотношения вентиляции, перфузии, а также секреции сурфактанта. При этом бронхолегочные ткани характеризуются большой интенсивностью липидного метаболизма, связанного с синтезом основной структуры этого органа – сурфактанта, синтезом эйкозаноидов [17]. Следовательно, изменение липидного метаболизма может приводить к серьезным нарушениям

функции органов дыхания, развитию воспаления, окислительного стресса.

Нарушение липидного метаболизма проявляется комплексом изменений, как в содержании сывороточных липидов, так и в перераспределении состава липидов клеточной мембраны [16]. Пристальное внимание отводится изучению жирных кислот (ЖК) как ключевого структурного компонента биологических мембран и субстрата для биосинтеза различных липидных метаболитов (эйкозаноиды, фактор активации тромбоцитов и др.) [2, 6]. Известно, что нарушение состава жирных кислот клеточных мембран является важным фактором развития и прогрессирования многих заболеваний бронхолегочной системы [1, 2, 9]. Значению жирных кислот и их метаболитов в патогенезе ХОБЛ уделяется не так много внимания. Считается, что низкая активность тучных клеток, главных продуцентов эйкозаноидов, при ХОБЛ

Новгородцева Т.П. – д.б.н., проф., зам. директора по НИР, e-mail: curdeal@mail.ru

Денисенко Ю.К. – д.б.н., зав. лабораторией биомедицинских исследований, e-mail: karaman@inbox.ru

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

Жукова Н.В. – д.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии, e-mail: nzjukova35@list.ru

является причиной отсутствия бронхоспазма. В то же время модификация профиля жирных кислот в липидах мембран не только манифестирует изменение синтеза эйкозаноидов, но и является причиной нарушения физико-химических свойств плазматических мембран, понижения их жидкостности, экспрессии рецепторов, мембранной проницаемости и транспорта веществ [3]. К тому же результаты разных исследователей различаются, что может быть связано с особенностью биоматериала, в котором изучаются жирные кислоты (клетки крови, плазма), степенью клинической тяжести бронхолегочного заболевания [1, 9, 11, 14]. Например, состав жирных кислот плазмы крови значительно зависит от характера питания, состояния экзогенной и эндогенной окружающей среды. Состав жирных кислот мембран эритроцитов, в отличие от жидкой части крови, стабилен в течение периода обновления красных клеток крови. Эритроцит является классической моделью клеточной мембраны, отражает структурные и функциональные изменения клеток всего организма в целом. Поэтому эритроцит – наиболее удачная и универсальная модель клетки для изучения патологических реакций.

В этой связи целью работы стало изучение состава жирных кислот мембран эритроцитов крови при хронической обструктивной болезни легких в фазе ремиссии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 40 человек: 20 пациентов с диагнозом ХОБЛ легкой степени тяжести в фазе ремиссии, подтвержденным соответствующими клиническими и лабораторными методами обследования, и 20 здоровых человек, не курящих, с нормальной функцией внешнего дыхания (контрольная группа). Критериями исключения пациентов из исследования являлось наличие профессиональных заболеваний бронхолегочной системы, сердечно-сосудистых заболеваний (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь) и их осложнений, сахарного диабета, заболеваний щитовидной железы, острых патологических состояний и обострений хронических болезней. Исследование было одобрено этическим комитетом и выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.), все обследованные подписали форму добровольного информированного согласия.

Бронхиальная проходимость оценивалась по показателям объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ1) и форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), индексу ОФВ1/ФЖЕЛ. У пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести

ОФВ1 составляла $82,6 \pm 2,1$ %, ОФВ1/ФЖЕЛ – $68,6 \pm 1,5$ %, средняя длительность заболевания – $8,4 \pm 1,6$ года, средний возраст – $48,8 \pm 2,2$ года. Диагноз ХОБЛ выставлялся в соответствии с Международной статистической классификацией болезней, травм и причин смерти X пересмотра (МКБ-10, 1992 г.) и согласно Глобальной стратегии: диагностика, лечение и профилактика ХОБЛ (GOLD, 2011 г.) [12].

Липидный спектр сыворотки крови оценивали по содержанию общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) в сыворотке крови (наборы фирмы «Ольвекс», Россия). Концентрацию холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) и холестерина липопротеидов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) рассчитывали по формулам Фридвальда: $\text{ХС ЛПНП} = \text{ОХС} - (\text{ХС ЛПВП} + \text{ХС ЛПОНП})$, $\text{ХС ЛПОНП} = \text{ТГ}/2,2$, результаты выражали в ммоль/л. Индекс атерогенности (ИА) рассчитывали по формуле: $\text{ИА} = (\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП}) / \text{ХС ЛПВП}$.

Мембраны эритроцитов получали путем гемолиза клеток дистиллированной водой и центрифугированием в течение 15 мин при 14000 об/мин в натрий-фосфатном буфере с трехкратным промыванием [10]. Экстракцию липидов из мембран эритроцитов крови осуществляли, используя систему растворителей хлороформ – метанол в соотношении 1:2, затем добавляли по 1 объему хлороформа, метанола и 0,9 % раствора хлористого натрия до полного расслоения фаз [5]. Анализ состава ЖК проводили методом газожидкостной хроматографии после их метилирования [7, 8]. Метилловые эфиры ЖК получали с помощью транс-метилирования липидов 1%-м раствором натрия в метаноле и затем 5 % HCl в метаноле. Метилловые эфиры экстрагировали гексаном, после чего очищали с помощью микротонкослойной хроматографии в бензоле. Зону метилловых эфиров на силикагеле определяли по стандарту или с помощью паров йода. Эфиры элюировали хлороформом, раствор упаривали в вакууме на ротонном испарителе ROTADEST 2044 (Венгрия). Перерастворенные в гексане метилловые эфиры анализировали на газожидкостном хроматографе Shimadzu GC-2010 (Япония), снабженном пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой (0,25 мм × 30 м) с привитой фазой Supelcowax 10. Температура колонки и детектора – 210 °С, температура испарителя – 240 °С. Газ-носитель – гелий. Расчет площади хроматографических пиков и обработку результатов проводили на станции Z-Chrom. Идентифицировали метилловые эфиры ЖК по времени удерживания с использованием стандартов (unsaturated fatty acids,

even carbon kit, Supelco, США) и по значениям «углеродных чисел» [18]. Результаты выражали в относительных % от общей суммы ЖК.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Статистическую значимость различий средних величин определяли с помощью непараметрических критериев Вилкоксона, Уайта, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование липидного обмена выявило наличие гиперхолестеринемии у больных ХОБЛ (табл. 1). Установлено повышение содержания атерогенной фракции липопротеидов – ХС ЛПНП ($p < 0,001$), индекса атерогенности ($p < 0,01$). В то же время уровень антиатерогенной фракции липопротеидов (ХС ЛПВП) был пониженным относительно группы здоровых лиц ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о нарушении липидного состава сыворотки крови у больных ХОБЛ.

Анализ количественного состава ЖК липидов мембран эритроцитов пациентов с ХОБЛ выявил значительное увеличение доли насыщенных жирных кислот – 15:0 ($p < 0,001$), 18:0 ($p < 0,05$), 20:0 ($p < 0,001$) по сравнению с группой здоровых лиц (табл. 2). Известно, что насыщенные ЖК, в особенности пальмитиновая и стеариновая, являются строительными компонентами сурфактанта легких [2]. Поэтому повышение содержания ЖК с насыщенной углеводородной цепью в мембране эритроцитов у лиц с ХОБЛ может являться благоприятным фактом. Однако, с другой стороны, накопление насыщенных ЖК в мембране клетки способствует увеличению жесткости липидного бислоя, что приводит к нарушению структурных и функциональных характеристик клетки, умень-

шению ее текучести и активности мембран-связанных ферментов, торможению связывания рецепторов с лигандами, повышает риск мембранодеструкции и гибели клетки по механизму апоптоза или некроза [3].

Отмечалось снижение относительного содержания эссенциальной линолевой кислоты (18:2n6, $p < 0,01$). Доля арахидоновой кислоты (20:4n6) – главного субстрата синтеза провоспалительных и бронхоконстрикторных эйкозаноидов – увеличивалась на 41 % ($p < 0,001$) по сравнению с группой здоровых лиц. В липидном бислое мембран эритроцита выявлено накопление предшественника синтеза эйкозаноидов 2-й и 4-й серии – докозатетраеновой кислоты (22:4n6, $p < 0,001$). Содержание основного антагониста арахидоновой кислоты – эйкозапентаеновой кислоты (20:5n3), напротив, снижалось в два раза ($p < 0,001$) относительно контрольной группы. Падение доли эйкозапентаеновой кислоты в мембране эритроцитов явилось причиной недостатка ее метаболита – докозапентаеновой кислоты (22:5n3), относительное содержание которой снизилось на 9 % ($p < 0,05$). Снижение доли длинноцепочечных n3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) свидетельствует о дефиците субстрата для синтеза противовоспалительных и бронходилатационных эйкозаноидов [17]. Закономерным следствием увеличения доли 20:4n6 и 22:4n6 стало повышение суммарного содержания ПНЖК семейства n6.

Патогенетическая значимость выявленной модификации ЖК у больных ХОБЛ обусловлена функциональной ролью липидов в клеточных структурах. ПНЖК выполняют в клетках две функции – структурную и регуляторную. Последняя связана с тем, что клетки используют ПНЖК в качестве предшественников синтеза биологически активных веществ – эйкозаноидов. Эйкозаноиды локально регулируют функции эндотелия, гладкомышечных клеток, реакцию вазодилата-

Таблица 1

Содержание липидов в сыворотке крови у пациентов с ХОБЛ ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (здоровые), $n = 10$	Больные с ХОБЛ, $n = 15$
Содержание ОХС, ммоль/л	$4,84 \pm 0,04$	$5,34 \pm 0,45^*$
Содержание ТГ, ммоль/л	$1,17 \pm 0,04$	$1,05 \pm 0,15$
Содержание ХС ЛПНП, ммоль/л	$2,57 \pm 0,04$	$3,83 \pm 0,56^{***}$
Содержание ХС ЛПОНП, ммоль/л	$0,53 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,07$
Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л	$1,74 \pm 0,02$	$1,49 \pm 0,11^*$
ИА, у. е.	$1,78 \pm 0,07$	$2,58 \pm 0,19^{**}$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы статистически значимо: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$.

Таблица 2

Состав жирных кислот мембран эритроцитов у пациентов с ХОБЛ

Содержание жирной кислоты, %	Контрольная группа (здоровые), $n = 10$	Больные с ХОБЛ, $n = 15$
Лауриновая (12:0)	$0,18 \pm 0,01$	
Миристиновая (14:0)	$0,39 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,01$
Пентадекановая (15:0)	$0,17 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,01^{***}$
Пальмитиновая (16:0)	$23,98 \pm 1,28$	$23,16 \pm 0,28$
Мальмитоолеиновая (16:1n9)	$0,21 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,05$
Стеариновая (18:0)	$13,40 \pm 0,75$	$16,78 \pm 0,40^*$
Олеиновая (18:1n9)	$14,84 \pm 0,84$	$15,49 \pm 0,73$
Линолевая (18:2n6)	$15,75 \pm 0,28$	$12,21 \pm 0,61^{**}$
α -Линоленовая (18:3n3)	$0,15 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,03$
Экозановая (20:0)	$0,150 \pm 0,035$	$0,46 \pm 0,04^{***}$
Дигомо- γ -линоленовая (20:3n6)	$1,59 \pm 0,51$	$1,70 \pm 0,20$
Арахидоновая (20:4n6)	$12,95 \pm 1,65$	$18,26 \pm 0,50^{***}$
Эйкозапентаеновая (20:5n3)	$1,23 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,06^{***}$
Докозатетраеновая (22:4n6)	$2,37 \pm 0,29$	$3,18 \pm 0,31^{**}$
Докозапентаеновая (22:5n3)	$1,99 \pm 0,02$	$1,82 \pm 0,05^*$
Докозагексаеновая (22:6n3)	$4,67 \pm 0,85$	$5,87 \pm 0,39$
Сумма n6	$32,91 \pm 0,10$	$36,07 \pm 0,55^{**}$
Сумма n3	$8,04 \pm 0,12$	$8,32 \pm 0,42$

Примечание. В таблицу не внесены отдельные представители ЖК, содержание которых не превышает 0,1 %; в основном это насыщенные ЖК нормального строения (10:0, 19:0, 22:0), некоторые моноеновые (14:1, 22:1), диеновые (18:2n-5/9) и триеновые (20:3n-3) ЖК.

Таблица 3

Показатели метаболических превращений жирных кислот у пациентов с ХОБЛ

Показатели превращений ЖК	Контрольная группа (здоровые), $n = 10$	Больные с ХОБЛ, $n = 15$
20:4n6/20:3n6	$8,14 \pm 0,37$	$10,74 \pm 0,44^{**}$
20:4n6/20:5n3	$10,52 \pm 0,12$	$32,60 \pm 2,8^{***}$
22:6n3/22:5n3	$2,34 \pm 0,13$	$3,22 \pm 0,12^{**}$
20:5n3/22:5n3	$0,61 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,05^{***}$
20:4n6/22:6n3	$2,77 \pm 0,04$	$3,11 \pm 0,10^*$
(20:3n6 + 20:5n3)/22:6n3	$0,60 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02^{***}$

ции, агрегацию тромбоцитов, микроциркуляцию и воспаление [4, 6, 13]. Повышенное содержание арахидоновой кислоты и ее метаболитов в мембране эритроцитов у обследованных лиц с хронической патологией бронхолегочной системы свидетельствует об увеличении субстрата для образования медиаторов воспаления (лейкотриена В4), бронхоспазма (простагландин D2) [15]. К тому же увеличение синтеза арахидоновой кислоты происходило на фоне значительного дефицита ее основного ингибитора и конкурента за циклооксигеназные и липоксигеназные метаболические пути – эйкозапентаеновой кислоты (20:5n3). Эндогенный недостаток в клетках ПНЖК семейства n3 приводит к изменению физи-

ко-химических свойств плазматических мембран, активации синтеза эйкозаноидов с провоспалительной и бронхоконстрикторной активностью [16, 17].

Учитывая, что одной из реальных причин модификации состава ЖК при патологических состояниях является нарушение их метаболизма, проанализированы показатели превращений ЖК у больных ХОБЛ. Использованы соотношения индивидуальных ЖК для характеристики активности ферментов элонгаз и десатураз, а также показатели взаимоотношений двух семейств ПНЖК – n6 и n3, отражающие дисбаланс в эйкозаноидном цикле (табл. 3). Соотношение 20:4n6/20:3n6 служит критерием, позволяющим

оценить активность $\Delta 5$ -десатуразы. Характеристикой активности ферментов последнего этапа биосинтеза ЖК является коэффициент $22:6n3/22:5n3$, элонгаз ЖК – соотношения $20:4n6/22:4n6$ и $20:5n3/22:5n3$. Соотношения между ЖК – предшественниками и ингибитором синтеза эйкозаноидов $20:4n6/22:6n3$ и $(20:3n6+20:5n3)/22:6n3$ отражают состояние метаболизма в эйкозаноидном цикле. Отношение двух предшественников эйкозаноидов различных семейств отражается в показателе $20:4n6/20:5n3$. Информативная значимость представленных критериев доказана для больных сердечно-сосудистой патологией как в медико-биологических исследованиях, так и с помощью математического аппарата [3].

Показано, что у больных ХОБЛ происходит увеличение соотношения $20:4n6/20:3n6$, что косвенно указывает на активацию $\Delta 5$ -десатуразы и интенсификацию биосинтеза субстрата для образования эйкозаноидов 2-й и 4-й серии (см. табл. 3). Выявлен рост соотношений $20:4n6/20:5n3$, $20:4n6/22:3n6$ – показателей, характеризующих взаимосвязь между предшественником синтеза эйкозаноидов и ингибитором их образования. Увеличение данных параметров является признаком нарушения метаболизма ЖК и оксипинов. О нарушении в метаболизме $n3$ ПНЖК, простаноидов 3-й серии, лейкотриенов 5-й серии свидетельствует снижение соотношений $20:5n3/22:5n3$ и $(20:3n6+20:5n3)/22:6n3$ в 2,03 и 1,57 раза соответственно ($p < 0,001$) относительно группы здоровых людей. Анализ результатов указывает на выраженные нарушения в метаболизме ЖК, биосинтезе эйкозаноидов у больных ХОБЛ в стадии ремиссии. При отсутствии клинических симптомов у пациентов развиваются метаболические нарушения, обусловленные угнетением активности ферментов начального и последнего этапа метаболизма эссенциальных ЖК, реципрокным подавлением синтеза циклооксигеназных и липоксигеназных метаболитов $n3$ ПНЖК. Значимым фактором повышенного риска развития и отягощения бронхолегочной патологии является увеличение соотношения $20:4n6/20:5n3$, которое свидетельствует о нарушениях в эйкозаноидном цикле, преобладании синтеза провоспалительных медиаторов. Следовательно, рост соотношения $20:4n6/20:5n3$ может являться специфическим маркером неблагоприятного течения бронхолегочной патологии.

Полученные результаты свидетельствуют о модификации состава жирных кислот мембран эритроцитов у лиц с хронической обструктивной болезнью, патогенетической основой которой является нарушение их метаболизма, развивающе-

го вследствие конкурентного ингибирования биосинтеза $n3$ ПНЖК с преобладанием образования $n6$ полиеновых кислот и эйкозаноидов с выраженными провоспалительными, бронхоконстрикторными свойствами. Можно заключить, что у больных ХОБЛ легкой степени тяжести развивается нарушение липидного обмена на клеточном уровне, которое продолжает сохраняться и в фазе ремиссии. Таким образом, важным звеном патогенеза хронической обструктивной болезни легких является дезорганизация липидного компонента клеточной мембраны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лизенко М.В., Петровский В.И., Бахирев А.М. Соотношение содержания арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот в сыворотке крови и липопротеидах низкой плотности больных бронхиальной астмой и изменение этой величины при разгрузочно-диетной терапии // *Вопр. мед. химии*. 1998. 44. (2). 213–218.
2. Мотавкин П.А., Гельцер Б.И. Клиническая и экспериментальная патофизиология легких. М.: Наука, 1998. 366 с.
3. Эндакова Э.А., Новгородцева Т.П., Светашев В.И. Модификация состава жирных кислот крови при сердечно-сосудистых заболеваниях. Владивосток: Дальнаука, 2002. 296 с.
4. Balode L., Strazda G., Jurka N. et al. Lipoxygenase-derived arachidonic acid metabolites in chronic obstructive pulmonary disease // *Medicina (Kaunas)*. 2012. 48. (6). 292–298.
5. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. 37. 911–917.
6. Brash A.R. Arachidonic acid as a bioactive molecule // *J. Clin. Invest.* 2001. 107. 1339–1345.
7. Carreau J.P., Duback J.P. Adaptation of a macroscale method to the microscale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extract // *J. Chromatogr.* 1978. 151. (3). 384–390.
8. Christie W.W. Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas-chromatography – a reappraisal // *J. Chromatogr.* 1978. 447. (2). 305–314.
9. De Castro J., Hernández-Hernández A., Rodríguez M.C. et al. Comparison of changes in erythrocyte and platelet phospholipid and fatty acid composition and protein oxidation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma // *Platelets*. 2007. 18. (1). 43–51.
10. Dodge J., Mitchell C. Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of erythrocytes // *Arch. Biochem. Biophys.* 1963. 100. (1). 119–130.
11. Gangopadhyay S., Vijayan V.K., Bansal S.K. Lipids of erythrocyte membranes of COPD patients: a quantitative and qualitative study // *COPD*. 2012. 9. (4). 322–331.

12. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2011. [Accessed November 10, 2012]. Available from: <http://www.goldcopd.org>.
13. Haworth O., Levy B.D. Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation // *Eur. Respir. J.* 2007. 30. 980–992.
14. Kompauer I., Demmelmaier H., Koletzko B. et al. Association of fatty acids in serum phospholipids with lung function and bronchial hyperresponsiveness in adults // *Eur. J. Epidemiol.* 2008. 23(3). 175–190.
15. Kostikas K., Gaga M., Papatheodorou G. et al. Leukotiene B4 in exhaled breath condensate and sputum supernatant in patients with COPD and asthma // *Chest.* 2005. 127. 155–139.
16. Novgorodtseva T.P., Karaman Y.K., Zhukova N.V. et al. Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome // *Lipids in Health and Disease.* 2011. 10. (82). doi:10.1186/1476-511X-10-82.
17. Schwartz J. Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease // *Am. J. Clin. Nutr.* 2000. 71. (1, Suppl.). 393S–396S.
18. Stransky K., Jursik T., Vitek A., Skorepa J. An improved method of characterizing fatty acids by equivalent chain length values // *J. High. Res. Chromatogr.* 1992. 15. 730–740.

MODIFICATION OF FATTY ACID CONTENT OF CELL MEMBRANES OF ERYTHROCYTES AT CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

**Tatyana Pavlovna NOVGORODTSEVA¹, Yulia Konstantinovna DENISENKO¹,
Marina Vladimirovna ANTONYUK¹, Natalia Vladimirovna ZHUKOVA^{2,3}**

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

² *FSBI A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of FEB RAS
690059, Vladivostok, Palchevskogo str., 17*

³ *Far Eastern Federal University
690950, Vladivostok, Sukhanova str., 8*

20 patients with mild chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in remission and 20 healthy people have been examined in order to study the fatty acid composition of the membranes of red blood. The fatty acid composition of erythrocyte membranes was studied by gas-liquid chromatography. It has been revealed that the modification of fatty acid composition of erythrocyte membranes characterized by the accumulation of saturated (15:0, 18:0, 20:0), n6 polyunsaturated (20:4 n6, 22:4 n6), deficiency of n3 polyunsaturated (20:5 n3, 22 : 5n3) fatty acids is observed in patients with COPD. The pathogenetic basis of this modification is a violation of their metabolism. Thus, disruption of the lipid components of the cell membrane is an important link of the COPD pathogenesis.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, fatty acids, cell membrane.

Novgorodtseva T.P. – doctor of biological sciences, professor, deputy director, e-mail: curdeal@mail.ru

*Denisenko Yu.K. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of biomedical researches,
e-mail: karaman@inbox.ru*

*Antonyuk M.V. – doctor of medicine sciences, professor, head of the laboratory for medical rehabilitation,
e-mail: antonyukm@mail.ru*

Zhukova N.V. – doctor of biological sciences, docent, senior researcher, e-mail: nzhukova35@list.ru

АКТИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ РАКЕ ТЕЛА МАТКИ У ЖЕНЩИН

Николай Анатольевич МАТВЕЕВСКИЙ¹, Игорь Дмитриевич САФРОНОВ^{2,3},
Александр Николаевич ТРУНОВ^{2,3}, Анатолий Васильевич ЕФРЕМОВ²

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

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

³ ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С целью изучения содержания продуктов перекисного окисления липидов, жирорастворимых антиоксидантов и провоспалительных интерлейкинов в крови у женщин с раком тела матки обследованы 290 пациенток с аденокарциномой (I–IV стадии заболевания) и 45 женщин без признаков воспалительных и опухолевых заболеваний. Полученные результаты свидетельствуют, что в сыворотке крови пациенток с раком тела матки содержание малонового диальдегида повышено на 49,8 %, а жирорастворимых антиоксидантов (β-каротина, ретинола, α-токоферола) – снижено более чем на 30 % по сравнению с практически здоровыми женщинами. Показано, что характерной особенностью опухолевого роста у пациенток с аденокарциномой является более чем двукратное увеличение концентрации провоспалительных ИЛ-1β и ИЛ-6 в крови. Представленные данные наглядно демонстрируют тот факт, что одним из важных механизмов патогенеза опухолевых заболеваний тела матки является окислительный стресс, характеризующийся ростом уровня продуктов перекисного окисления липидов и истощением потенциала антиоксидантной защиты, а также высокая провоспалительная цитокиновая активность.

Ключевые слова: рак матки, воспаление, окислительный стресс.

Современный этап изучения патогенеза внутриматочных неопластических заболеваний характеризуется определением роли молекулярных механизмов воспаления в реализации опухолевого процесса [1, 14].

В научной литературе имеется много фактов о роли воспаления в канцерогенезе. Показано, что воспалительные заболевания кишечника тесно связаны с повышенным риском рака толстой кишки [8], простатит предшествует раку простаты [10], а наличие *Helicobacter pylori* модифицирует риск развития рака желудка [12]. Все это свидетельствует о наличии общих пусковых молекулярных механизмов злокачественной неоплазии при воспалении. Так, предполагается, что активные формы кислорода и азота, генерируемые при

инфекции клеткам-эффекторами воспаления, могут вызывать генетические мутации и тем самым способствовать инициации опухолевого процесса в организме. Другие медиаторы воспаления, в частности цитокины, также активно участвуют в канцерогенезе. В частности, обнаружено, что при развитии воспаления нарастает концентрация ИЛ-15 в организме. В норме он стимулирует созревание и пролиферацию натуральных киллеров, которые участвуют в подавлении инфекционного процесса. Однако при хроническом воспалении высокая концентрация ИЛ-15 приводит к трансформации лимфоцитов в неопластические клетки и развитию крупногранулярного лимфатического лейкоза, поскольку ИЛ-15 соединяется с рецепторами на поверхности лимфоцитов, вызывая уси-

Матвеевский Н.А. – к.м.н., научный сотрудник, e-mail: 7281994@mail.ru

Сафронов И.Д. – д.м.н., проф., ведущий научный сотрудник, проф. кафедры патологической физиологии, e-mail: safronov1962@mail.ru

Трунов А.Н. – д.м.н., проф., рук. лаборатории иммунологии, проф. кафедры патологической физиологии, e-mail: trunov1963@yandex.ru

Ефремов А.В. – д.м.н., проф., член-кор. РАМН, зав. кафедрой патофизиологии, e-mail: eav48@yandex.ru

ление экспрессии фактора транскрипции Мус, что, в свою очередь, приводит к запуску ряда сигнальных каскадов (Мус/NF-κB/p65/Hdac-1) в клетке и гиперметилированию ДНК [9]. Активация ядерного фактора транскрипции NF-κB при воспалении может стимулировать злокачественную трансформацию, обеспечивая антиапоптотические и пролиферативные сигналы, мишенями которых могут являться гены цитокинов [6]. Обнаружено, что полиморфизм генов ИЛ-1β, ИЛ-8 модифицирует риск развития рака желудка [13] и верхних дыхательных путей [7].

Актуальность вопроса взаимосвязи между воспалением и неопластическим ростом, в частности при внутриматочных опухолевых заболеваниях, требует дополнительных исследований молекулярных механизмов канцерогенеза.

Цель исследования – изучить содержание продуктов перекисного окисления липидов, жирорастворимых антиоксидантов и провоспалительных интерлейкинов в сыворотке крови у женщин с раком тела матки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для выполнения настоящей работы материалом исследования послужили данные комплексного обследования 290 женщин с раком тела матки (РТМ), полученные на базе ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер» и лабораторий научных учреждений СО РАМН в период с 2007 по 2012 г. Согласно степени дифференцировки опухоли, данная группа состояла из 34,5 % пациенток с высокодифференцированной, 33,8 % – с умереннодифференцированной и 31,7 % – с низкодифференцированной аденокарциномой. Распределение по морфологическим стадиям заболевания показало, что у 67,6 % женщин имеется I стадия заболевания; у 20,6 % – II, у 7,4 % – III и у 4,4 % – IV. Средний возраст пациенток составил $63,3 \pm 5,2$ года.

Из анамнеза на наличие воспалительных заболеваний половых органов было установлено, что у 44,1 % пациенток встречается хронический сальпингоофорит, у 14,5 % – хронический кольпит, а у 13,1 % – хронический эндометрит.

В контрольную группу были включены 45 женщин, находящихся в том же возрасте, что и пациентки клинической группы, в анамнезе которых опухолевые заболевания отсутствовали, а воспалительные заболевания находились в стадии ремиссии.

Все исследования выполнялись в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека» и

«Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266.

Состояние активности окислительного стресса оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови с помощью спектрофотометрического метода по реакции с тиобарбитуровой кислотой [15] на СФ-46 (Россия) при длине волны 532 нм. Содержание жирорастворимых антиоксидантов (β-каротина, ретинола, α-токоферола) в сыворотке крови определяли с помощью метода ВЭЖХ [5] на хроматографе «Милихром» (Россия) с УФ детекцией в диапазоне 260–292 нм.

Концентрацию провоспалительных интерлейкинов (ИЛ-1β и ИЛ-6) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью специализированных тест-систем «ProCon» (Россия) согласно протоколу исследования. В иммуноферментном анализе использовали автоматический ридер «Униплан» (ПИКОН, Россия).

Результаты исследований статистически обрабатывали [3], вычисляя среднюю арифметическую величину (M), ошибку репрезентативности средней величины (m) и уровень значимости различий средних величин (p) на основании t -критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для уровня достоверности 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было выявлено (см. таблицу), что у пациенток с диагнозом РТМ концентрация МДА в сыворотке крови была на 49,8 % выше, чем у женщин группы контроля ($p < 0,05$).

Таблица

Содержание продуктов ПОЛ, жирорастворимых антиоксидантов и провоспалительных интерлейкинов в сыворотке крови пациенток с раком тела матки ($M \pm m$)

Показатель	Группа обследованных женщин	
	Контроль ($n = 45$)	Пациентки с раком матки ($n = 290$)
МДА, нмоль/мл	$2,93 \pm 0,064$	$4,40 \pm 0,091^*$
β-каротин, мкг/л	$3,95 \pm 0,31$	$2,57 \pm 0,23^*$
Ретинол, мкг/л	$5,74 \pm 0,20$	$3,84 \pm 0,20^*$
α-Токоферол, мг/л	$0,123 \pm 0,004$	$0,085 \pm 0,005^*$
ИЛ-1β, пг/мл	$41,3 \pm 6,2$	$104,6 \pm 16,3^*$
ИЛ-6, пг/мл	$24,6 \pm 4,2$	$167,6 \pm 23,1^*$

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0,05$.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии высокой интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме при внутриматочных злокачественных заболеваниях. Поскольку цитотоксические продукты ПОЛ способны вызывать мутационные, деструктивные и другие изменения на различных уровнях организма, то неизбежна реакция со стороны регулирующей антиоксидантной системы [4].

При оценке содержания жирорастворимых антиоксидантов было обнаружено (см. таблицу), что в сыворотке крови пациенток с диагнозом РТМ содержание β -каротина было на 35,1 % меньше, чем в контроле. Анализ концентрации ретинола в сыворотке крови пациенток с РТМ показал, что она на 33,2 % снижена по сравнению с контрольными значениями. При определении уровня витамина Е в сыворотке крови у больных РТМ концентрация α -токоферола оказалась на 30,9 % ниже контрольных значений. Учитывая тот факт, что содержание жирорастворимых антиоксидантов в крови отражает состояние антиоксидантного статуса на уровне целостного организма [4], то, основываясь на полученных результатах, можно предположить наличие депрессии со стороны механизмов, регулирующих активность процессов ПОЛ у пациенток с опухолевыми заболеваниями тела матки.

Дальнейшие исследования по анализу изменения содержания провоспалительных интерлейкинов при опухолевых заболеваниях тела матки показали (см. таблицу), что у пациенток с РТМ концентрация ИЛ-1 β была в 2,5 раза выше ($p < 0,05$) контрольных показателей.

При тестировании концентраций ИЛ-6 в сыворотке крови в группе пациенток с РТМ обнаружено, что величина изучаемого показателя превышала данные контроля в 6,8 раза ($p < 0,05$). Считается, что увеличение содержания ИЛ-6 является негативным фактором в патогенезе опухолевой патологии, поскольку связано с прогрессирующим течением заболевания и формированием синдромов злокачественных процессов [11]. Установлено, что при высоких уровнях ИЛ-6 происходит активация В-лимфоцитов, усиливается синтез противоопухолевых антител, которые блокируют антигены опухолевых клеток и рецепторы Т-киллеров, тем самым защищая опухолевую клетку от иммунного разрушения [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные данные наглядно демонстрируют тот факт, что одним из важных механизмов патогенеза опухолевых заболеваний тела матки является окислительный

стресс, характеризующийся увеличением содержания в крови продуктов ПОЛ и истощением потенциала антиоксидантной защиты, а также высокая провоспалительная цитокиновая активность.

Полученные результаты свидетельствуют, что у пациенток содержание в крови продуктов ПОЛ (МДА) по сравнению с практически здоровыми женщинами повышено, а жирорастворимых антиоксидантов (β -каротина, ретинола, α -токоферола) – снижено.

Показано, что характерной особенностью злокачественного опухолевого роста у пациенток с РТМ является наличие высокого уровня провоспалительных интерлейкинов (ИЛ-1 β и ИЛ-6) в крови по сравнению с практически здоровыми женщинами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян Л.В., Глякин Д.С., Самойлова А.В., Гунин А.Г. Воспалительный процесс в этиологии и патогенезе рака эндометрия // Пробл. репродукции. 2007. (1). 21–25.
2. Бережная Н.М. Интерлейкины и формирование иммунологического ответа при злокачественном росте // Аллергол. иммунология. 2000. 1. (1). 45–61.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: Наука, 2001. 343 с.
5. Микичур Н.И., Сафронов И.Д. Микрометоды определения различных форм токоферола для оценки компенсаторных патологических состояний // Проблемы оценки и прогнозирования функциональных состояний организма в прикладной физиологии. Фрунзе, 1988. 238–240.
6. Чехун В. Воспаление и рак // Онкология. 2009. 11. (4). 244–245.
7. Campa D., Hashibe M., Zaridze D. et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes with risk of developing cancers of the upper aerodigestive tract // Cancer Causes Control. 2007. 18. (4). 449–455.
8. Flossmann E., Rothwell P.M. Commentary: aspirin and colorectal cancer an epidemiological success story // Int. J. Epidemiol. 2007. 36. 962–965.
9. Mishra A., Liu S., Sams G.H. et al. Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation // Cancer Cell. 2012. 22 (5). 645–655.
10. Sandhu J.S. Prostate cancer and chronic prostatitis // Curr. Urol. Rep. 2008. 9. 328–332.

11. Sikorski R., Kapec E., Zaleska W. Serum levels of proinflammatory cytokines in women with uterine myomas // *Ginekol. Pol.* 2001. 72. (12). 1485–1488.
12. Suzuki H., Iwasaki E., Hibi T. Helicobacter pylori and gastric cancer // *Gastric Cancer.* 2009. 12. 79–87.
13. Taguchi A., Ohmiya N., Shirai K. *et al.* Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005. 14. 2487–2493.
14. Wallace A.E., Gibson D.A., Saunders P.T., Jabbour H.N. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma // *J. Endocrinol.* 2010. 206. 141–157.
15. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma // *Methods Mol. Biol.* 1998. 108. 101–106.

ACTIVITY OF OXIDATIVE STRESS AND THE LEVELS OF PROINFLAMMATORY INTERLEUKINS AT UTERUS CANCER IN WOMEN

Nikolay Anatoljevich MATVEEVSKIY¹, Igor Dmitrievich SAFRONOV^{2,3}, Aleksandr Nikolaevich TRUNOV^{2,3}, Anatoly Vasiljevich EFREMOV²

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

² *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

³ *Center of Clinical and Experimental Medicine of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

In order to examine the content of lipid peroxidation products, fat-soluble antioxidants and anti-inflammatory interleukins in blood of women with cancer of the uterine body 290 patients with adenocarcinoma (I–IV stages) and 45 women without signs of inflammatory and neoplastic diseases have been examined. The results indicate that malondialdehyde content increased by 49.8% and fat-soluble antioxidants (β -carotene, retinol, α -tocopherol) concentration reduced by more than 30% in serum of patients with cancer of uterine body compared to healthy women. As a specific characteristic of tumor growth in patients with adenocarcinoma, more than two-fold increase in the concentration of pro-inflammatory IL-1b and IL-6 in the blood has been revealed. The data presented clearly demonstrate that one of the important mechanisms of the pathogenesis of uterine body neoplastic diseases is oxidative stress, characterized by increasing levels of lipid peroxidation products and depletion of antioxidant capacity, and a high pro-inflammatory cytokine activity.

Key words: uterine cancer, inflammation, oxidative stress.

Matveevskiy N.A. – candidate of medical sciences, researcher, e-mail: 7281994@mail.ru

Safronov I.D. – doctor of medical sciences, professor, leading researcher, professor of the chair of pathophysiology, e-mail: safronov1962@mail.ru

Trunov A.N. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of immunology, professor of the chair of pathophysiology, e-mail: trunov1963@yandex.ru

Efremov A.V. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, head of chair for pathophysiology, e-mail: eav48@yandex.ru

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАБЕТА MODY 2 В СИБИРИ

Алла Константиновна ОВСЯННИКОВА

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

С целью определения генетических особенностей диабета MODY 2 в Сибири был проведен осмотр 78 человек с сахарным диабетом (СД; 33 пациента – с СД 1 типа, 33 – с СД 2 типа, 12 – с неverified типом СД) с дебютом заболевания до 25 лет и отягощенной наследственностью по диабету. У 22 пациентов (2 – с выставленным ранее диагнозом СД 1 типа, 8 – с СД 2 типа, 12 – с неverified типом СД), имеющих нехарактерные для диагностированного типа диабета признаки, произведен забор крови для молекулярно-генетической диагностики диабета MODY 2. У 5 пациентов найдены мутации гена глюкокиназы и подтвержден диагноз диабет MODY 2.

Ключевые слова: сахарный диабет, диабет MODY, молодые пациенты, мутации, семейный анамнез.

Распространенность сахарного диабета (СД) во всем мире увеличивается в эпидемических масштабах, также растет количество молодых пациентов с данной нозологией [2, 5]. Очень важно своевременно определить правильный тип СД, поскольку наряду с классическими 1-м и 2-м типами сахарного диабета (соответственно СД 1, СД 2) существуют более редкие наследственные формы, отличающиеся от них клиническим течением и прогнозом. Истинная распространенность «сахарного диабета не 1 типа» в детском и подростковом возрасте неизвестна, предполагается, что она может достигать 10 %. Не всегда удается безошибочно выявить тип СД на основании клинических признаков, в этих случаях следует рассмотреть возможность использования гормональных, иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования. Определение таких типов диабета, как MODY, возможно лишь с помощью молекулярно-генетической диагностики [6].

MODY – редкая моногенно наследуемая форма СД, включающая в себя более 10 подтипов, среди которых в российской популяции преобладают подтипы MODY 2 и 3 [1, 4]. Диагностирование диабета MODY имеет большое значение как для пациентов (отсутствует абсолютная потребность в экзогенном инсулине, нормогликемия в большинстве случаев достигается соблюдением диеты), так и для их родственников (высокая вероятность носительства мутаций у некоторых родственников, что требует более тщательного сбора семейного анамнеза и определения пока-

зателей углеводного обмена). До 80 % случаев диабета MODY не определяется или диагностируется как СД 1, СД 2, поэтому пациентам с некорректно диагностируемым типом СД часто назначается неадекватная терапия, особенно инсулинотерапия [11].

Цель данной работы – определить генетические особенности диабета MODY 2 в Сибири.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для отбора пациентов использованы электронные истории болезней Городского регистра по сахарному диабету города Новосибирска, в котором было 1242 электронные истории болезней пациентов с СД с дебютом заболевания в возрасте моложе 25 лет (с СД 1 – 1172 (94 %), с СД 2 – 70 (6 %) чел.). У 187 пациентов (15 %) из данной выборки заболевание было диагностировано в возрасте до 25 лет, присутствовала отягощенная наследственность по диабету. У 37 больных (20 %) выставлен диагноз СД 2 типа, у 150 (80 %) – СД 1 типа. Из них в ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН было приглашено и обследовано 78 пациентов: 33 – с диагностированным ранее СД 1, 32 – с СД 2 и 12 – с неverified типом СД. Лиц мужского пола было 36 (46 %), женского – 42 (54 %) ($p = 0,335$). Выполнены сбор жалоб, анамнеза, объективное обследование. Кровь для биохимического, гормонального анализов и анализа на наличие антител к β -клеткам забирали из локтевой вены вакутейнером в положении

сидя после 12-часового голодания. Содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1c) измеряли на анализаторе Nycocard READER II (Axis-Shield, Великобритания) методом боратного аффинного анализа. Для молекулярно-генетического исследования в пробирку с 4 % раствором цитрата натрия забирали 5 мл венозной крови и проводили выделение ДНК, полимеразную цепную реакцию, прямое автоматическое секвенирование 12 экзонов гена глюкокиназы для верификации подтипа MODY 2, который превалирует в российской популяции среди других подтипов MODY.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной исследовательской работе диабет MODY 2 был подтвержден с помощью молекулярно-генетического исследования у 5 из 22 пациентов (23 %) (11 % пациентов с «диабетом не 1 типа»), трое из которых были направлены в ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН для подтверждения диагноза, один является родственником пробанда с подтвержденным MODY 2, у одного пациента ранее был выставлен диагноз СД 2. Диагностировано 4 различных миссенс-мутаций. Определены мутации в 7 экзоне: мутация TGG > TGA в нуклеотидной позиции 257 (257G > A), приводящая к замене аминокислоты триптофана на стоп-кодон (Trp257stop); мутация GGC > TGC в нуклеотидной позиции 258 (258G > T), приводящая к замене аминокислоты глицина на цистеин (Gly258Cys). Также были обнаружены мутации в 4 экзоне: 2 идентичные мутации (у пробанда и родственника 1 линии родства) CTG > GTG в нуклеотидной позиции 146 (146C > G), приводящие к замене аминокислоты лейцина на валин (Leu146Val), и в 1 экзоне мутация CCT > CTT, приводящая к замене аминокислоты пролина на лейцин, ранее не описанная. Таким образом, у пациентов с MODY 2 верифицированы миссенс-мутации в 7, 4 и 1 экзонах гена глюкокиназы.

Возраст пациентов на момент диагностирования диабета MODY 2 варьировал от 6 мес. до 25 лет. Данный подтип СД выявлен у четырех мужчин и одной женщины. У троих из пяти пациентов с MODY 2 отсутствовали клинические проявления нарушений углеводного обмена на момент диагностирования заболевания, что характерно для данной формы диабета. У всех пациентов с MODY 2 наблюдалась гипергликемия натощак, а через 2 ч после еды – небольшой прирост содержания глюкозы в крови. У одного пациента при диагностировании заболевания определялись полидипсия и полиурия, у одного

пациента – неспецифические симптомы (отсутствие прибавки в весе, сниженный аппетит). В терапии из пяти пациентов с диагностированным диабетом MODY 2 один человек до подтверждения диагноза использовал инсулинотерапию, один – пероральные сахароснижающие препараты и три – рациональное питание и физические упражнения. Избыточная масса тела и ожирение не были выявлены ни у одного пациента. У всех пациентов с диагностированным MODY 2 диабетом были достигнуты целевые значения содержания в крови HbA1c, уровень С-пептида был ниже референсных значений.

Клинический случай. Пациент Д., мужчина 2002 года рождения, был направлен на консультацию в ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН с подозрением на диабет MODY. Также были направлены родители пробанда, у которых диагностированы нарушения углеводного обмена.

Родился от первой беременности, роды самопроизвольные в 39–40 недель, масса при рождении 2650 г, рост 49 см. Беременность протекала без особенностей. В 5 лет 8 мес. (июль 2008 г.) появились жажда, кожный зуд, уровень глюкозы натощак составлял 6,7 ммоль/л (капиллярная кровь), через 2 ч после еды – 8,9 ммоль/л, через 1 ч при проведении орального теста толерантности к глюкозе – 11,0 ммоль/л. Пациенту Д. верифицировано нарушение толерантности к углеводам, в 2009 г. диагностирован СД тип MODY, требующий уточнения. Выявлены диабетические осложнения: периферическая полинейропатия нижних конечностей, сенсомоторная форма, диабетическая нефропатия, стадия микроальбуминурии, ретинопатия, непролиферативная стадия.

Лабораторные показатели в 2008 г.: анти-тела к глутаматдекарбоксилазе, к инсулину, к β -клеткам отрицательны, уровень HbA1c 5,9 %, тиреотропного гормона 1,5 мкМЕ/мл, свободного тироксина 15,6 мкМЕ/мл, антител к тиреоидной пероксидазе менее 10. Содержание HbA1c в 2009 г. 6,0 %, в 2010 г. 5,7 %, С-пептида в 2010 г. 0,562 нг/мл (ниже низконормальных значений). Пациент соблюдал диету с ограничением легкоусвояемых углеводов, при гипергликемии принимал препараты сульфонилмочевины; выявлены коморбидные состояния: первичный гипотиреоз, аллергия на цветение растений (аллергический ринит, слезотечение).

Наследственность: у матери пробанда в возрасте 24 лет (2009 г.) диагностировано нарушение толерантности к углеводам, у отца – в возрасте 25 лет (2009 г.) при обследовании обнаружена гипергликемия натощак (6,0 ммоль/л), у бабушки по линии отца – нарушение толерантности к угле-

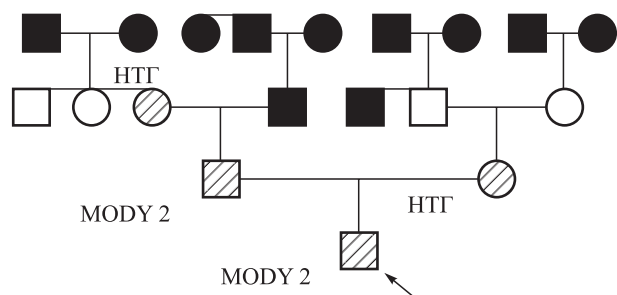


Рис. Родословная семьи пациента Д. ▨ – пробанд, ○ – здоровые родственники пробанда женского пола, □ – здоровые родственники пробанда мужского пола, ▨ – лица с нарушением углеводного обмена мужского пола, ▨ – лица с нарушением углеводного обмена женского пола, ● – умершие родственники пробанда женского пола, ■ – умершие родственники пробанда мужского пола, НТГ – нарушение толерантности к глюкозе

водам (см. рисунок). Родители пациента Д. терапию не получают, жалоб не предъявляют. В возрасте 8 лет пациент Д. был на приеме в ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН. На момент осмотра жалоб не предъявлял. Объективный статус без особенностей.

Лабораторные показатели, полученные при обследовании в ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН: содержание С-пептид ниже низконормальных значений (0,60 нг/мл), глюкозы – 7,00 ммоль/л, HbA1c 6,5 %, антитела к β-клеткам отрицательны, концентрация тиреотропного гормона – 3,17 мкМЕ/мл, общего холестерина – 4,13 ммоль/л, триглицеридов – 0,67 ммоль/л, холестерина липопротеинов высокой плотности – 1,56 ммоль/л, низкой – 1,96 ммоль/л, креатинина – 66,00 мкмоль/л, скорость клубочковой фильтрации – 46,86 мл/мин.

Пациенту Д. проведено прямое автоматическое секвенирование 12 экзонов гена глюкокиназы. Обнаружена миссенс-мутация CTG > GTG в экзоне 4 в нуклеотидной позиции 146 (146C > G), приводящая к замене аминокислоты лейцина на валин (Leu146Val). Данная мутация характерна для MODY 2 подтипа. Также молекулярно-генетическое исследование проведено родителям пробанда. У матери пробанда изменений в гене глюкокиназы не выявлено. У отца обнаружена миссенс-мутация Leu146Val, идентичная мутации пробанда. Таким образом, в семье пациента Д. MODY 2 диабет диагностирован в двух поколениях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовательские работы о распространенности отягощенного семейного анамнеза по СД у пациентов с СД молодого возраста весьма немно-

гочисленны. На сегодняшний день генетические аспекты наследования при СД остаются до конца не выясненными. MODY 2 выявлен у пяти пациентов в четырех семьях. У больного, у которого заболевание диагностировано в возрасте 6 месяцев, обнаружена мутация в 7 экзоне Gly258Cys. Данная миссенс-мутация была описана ранее у пациентов в итальянской популяции [7]. Также в 7 экзоне выявлена миссенс-мутация Trp257Term, которая была упомянута ранее (database HGMD-PUBLIC, Dec. 2012). У пробанда, а также у его отца обнаружены идентичные мутации в 4 экзоне Leu146Val. В данном месте ранее были описаны мутации, но с заменами других аминокислот [8, 9]. Также диагностирована ранее не описанная мутация в 1 экзоне Pro60Leu.

По данным зарубежных ученых, гипергликемия натощак, которая характерна для пациентов с MODY 2, присутствует у них с рождения [10]. В отечественных публикациях самый ранний возраст пациента на момент диагностирования MODY 2 составлял 1 год [1], в нашем исследовании – 6 мес., поэтому даже пациентов такого возраста с мягкой гипергликемией, отсутствием потребности в инсулине и достаточно хорошей компенсацией углеводного обмена следует направлять на проведение молекулярно-генетического исследования для определения дальнейшей тактики ведения.

Врачу не всегда удастся безошибочно определить тип СД на основании клинических признаков. В этих случаях следует рассмотреть возможность использования гормональных, иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования. Выявление таких типов диабета, как MODY, возможно лишь с помощью молекулярно-генетической диагностики.

ВЫВОДЫ

1. Среди обследованных пациентов с «сахарным диабетом не 1-го типа» MODY 2 был выявлен у 11 %.

2. У пациентов с клиническими проявлениями диабета MODY 2 обнаружена одна новая миссенс-мутация (60C > T) и три известные мутации в гене глюкокиназы (257G > A, 258G > T, 146C > G). Выявленные мутации локализируются в 7, 4 и 1 экзонах гена глюкокиназы.

3. Для пациентов с MODY 2 выявлено преимущественное отсутствие характерных клинических симптомов нарушений углеводного обмена (полидипсия, полиурия), невысокие показатели С-пептида в сыворотке крови и отсутствие избыточной массы тела и ожирения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Кураева Т.Л., Ремизов О.В. и др. Генетика сахарного диабета у детей и подростков: пособие для врачей. М., 2003. 74 с.
2. Кураева Т.Л., Дубинина И.А. Клиника и дифференциальная диагностика сахарного диабета 2 типа в детском возрасте // Сахарный диабет. 2009. (3). 16–21.
3. Орлов А.И. Прикладная статистика. М.: Экзамен, 2004. 656 с.
4. Петеркова В.А., Кураева Т.Л., Прокофьев С.А. и др. Молекулярная генетика и клинические особенности моногенных форм сахарного диабета // Вестн. РАМН. 2012. (1). 81–86.
5. Суплотова Л.А., Бельчикова Л.Н., Рожнова Н.А. Эпидемиологические аспекты сахарного диабета 2 типа с манифестацией заболевания в молодом возрасте // Сахарный диабет. 2012. (1). 11–13.
6. Рымар О.Д., Овсянникова А.К., Мустафина С.В. и др. Роль MODY диабета в структуре заболеваемости сахарным диабетом среди пациентов молодого возраста // Сиб. мед. журн. 2011. 26. (4, вып. 2). 45–50.
7. Mantovani V., Salardi S., Cerreta V. et al. Identification of eight novel glucokinase mutations in Italian children with maturity-onset diabetes of the young // Hum. Mutat. 2003. 22. (4). 338.
8. Osbak K.K., Colclough K., Saint-Martin C. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia // Hum. Mutat. 2009. 30. (11). 1512–1526.
9. Sagen J.V., Odili S., Bjørkhaug L. et al. From clinicogenetic studies of maturity-onset diabetes of the young to unraveling complex mechanisms of glucokinase regulation // Diabetes. 2006. 55. (6). 1713–1722.
10. Prisco F., Lafusco D., Franzese A. et al. MODY 2 presenting as neonatal hyperglycaemia: a need to reshape the definition of «neonatal diabetes»? // Diabetologia. 2000. 43. (10). 1331–1332.
11. Shields B.M., Hicks S., Shepherd M.H. et al. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? // Diabetologia. 2010. 53. (12). 2504–2508.

THE GENETIC CHARACTERISTICS OF MODY 2 DIABETES IN SIBERIA

Alla Konstantinovna OVSYANNIKOVA

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

The aim of this study was to determine the genetic characteristics of MODY 2 diabetes in Siberia. 78 patients with diabetes (33 patients – with 1 type, 33 – with 2 types, 12 – with not verified type of diabetes) with the debut of the disease before 25 years of age and family history of diabetes have been examined. 22 patients (2 with previously diagnosed diabetes of type 1 and 8 – type 2, 12 – not verified type of diabetes) with uncharacteristic symptoms of diabetes were performed on the molecular genetic testing of MODY 2 diabetes. 4 mutations of the glucokinase gene have been found and MODY 2 diabetes has been confirmed.

Key words: diabetes, MODY diabetes, young patients, mutations, family history.

Ovsyannikova A.K. – postgraduate student, e-mail: aknikolaeva@bk.ru

УДК 616.728.3-018.3:611.018.2.:577.2.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПРОТЕОГЛИКАНОВ ИЗ РАЗНЫХ ТОПОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН КОЛЕННОГО СУСТАВА У БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ: ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФЕНОТИПА ХОНДРОЦИТОВ

Татьяна Васильевна РУСОВА, Елена Леонидовна СТРОКОВА,
Анастасия Александровна ВОРОПАЕВА, Елена Игоревна ЩЕЛКУНОВА

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

Исследовали содержание и свойства протеогликанов хряща из разных топографических зон коленного сустава у больных идиопатическим остеоартрозом III стадии. В образцах хряща из разных зон исследовали количество протеогликанов и экспрессию основных структурных генов хряща: агрекана, люмикана, версикана, коллагенов типа I и II, а также генов пролиферации и дифференцировки хондроцитов – SOX-9, TGF β -3, TGF β R, KLF4. Содержание и свойства протеогликанов в разных топографических зонах хряща различаются – в зоне с максимальной механической нагрузкой их количество минимально относительно других зон, они более прочно связаны с фибриллами коллагена, более подвижны в электрическом поле и менее агрегированы. Установлено, что клетки всех топографических зон, независимо от выраженности дегенерации и механической нагрузки, сохраняют способность экспрессировать гены основных компонентов внеклеточного матрикса, а также сигнальных белков пролиферации и дифференцировки на одном уровне, однако в наиболее нагружаемой зоне снижена экспрессия гена протеогликана версикана и регуляторного белка KLF4. Таким образом, в хряще разных зон коленного сустава фенотипически различные хондроциты продуцируют протеогликаны, отличающиеся по количеству и свойствам.

Ключевые слова: протеогликаны, экспрессия генов протеогликанов, экспрессия генов пролиферации и дифференцировки хондроцитов, суставной хрящ, остеоартроз.

Остеоартроз – самое распространенное заболевание суставов невоспалительного дегенеративного характера, которое затрагивает все компоненты сустава и связано с локальными, нарастающими со временем, потерями внеклеточного матрикса суставного хряща, основными компонентами которого являются коллаген типа II и протеогликаны (ПГ).

ПГ представляют собой молекулы, состоящие из центральной нити белка (кора) с присоединенными к нему углеводными цепями гликозаминогликанов (ГАГ). Углеводные цепи больших ПГ агрекана и версикана участвуют в сохранении гидратированности хрящевой ткани. Версикан и агрекан при участии линк-белка образуют агрегаты с гиалуроновой кислотой, структурируя внеклеточный матрикс хрящевой ткани [20]. Малый ПГ люмикан участвует в формировании фибрилл коллагена [20]. Потеря ПГ снижает сопротивление ткани к сжатию и предшествует повреж-

дению фибриллярной сети коллагена, которая отвечает за механическую способность ткани к растяжению [6, 16, 18].

Контроль активности экспрессии генов специфических белков хондроцитов осуществляют регуляторные белки TGF β -3, SOX-9 и, как мы предполагаем, KLF4. TGF β -3 является одной из изоформ известного цитокина TGF β , который участвует в дифференцировке клеток, эмбриогенезе и эмбриональном и постнатальном развитии тканей организма [21]. TGF β -3, как полагают, регулируют синтез молекул, участвующих в клеточной адгезии и в формировании внеклеточного матрикса. В то же время он усиливает синтез белков межклеточного матрикса, способствует заживлению ран, оказывает анаболическое действие [20, 21]. Экспрессия SOX-9 обнаружена во всех зачатках хрящей, зрелой хрящевой ткани и совпадает с экспрессией гена α_1 цепи коллагена типа II (COL2A1). SOX-9 рассматривается в ка-

Русова Т.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела,
e-mail: TRusova@niito.ru

Строчкова Е.Л. – научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: EZavyalova@niito.ru

Воропаева А.А. – к.б.н., научный сотрудник Отдела инноваций и интеллектуальной собственности,
e-mail: Voropaeva2011@rambler.ru

Щелкунова Е.И. – научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: EShelkunova@niito.ru

честве первого фактора транскрипции, который необходим для дифференцировки хондроцитов хряща [9]. KLF4 играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке клеток. Это доказано для эпителиальных клеток роговицы и некоторых других тканей (почки, легкие). В клетках хряща экспрессия гена KLF4 не исследовалась.

В настоящее время считается, что разрушение суставного хряща при заболевании остеоартрозом является результатом чрезмерной нагрузки, возрастных изменений и нарушения обмена веществ [6, 18, 19]. В здоровом суставном хряще пролиферативная активность клеток, включение новых синтезированных молекул в каркас матрикса и удаление из матрикса исчерпавших свой ресурс компонентов крайне низки. Вместе с тем клетки хрящевой ткани обладают мощным метаболическим потенциалом, их активация отмечена при развитии патологических состояний, в том числе таких, как остеоартроз [18]. Давление на хрящевые поверхности суставов, соответствующее физиологической норме, стимулирует синтез хондроцитами протеогликанов, которые обеспечивают упругие свойства хряща, подходящие для сопротивления переменным механическим нагрузкам. Вместе с тем механическая нагрузка стойко модулирует экспрессию генов специфических белков хондроцитов [4, 5, 17].

Известно, что при развитии остеоартроза происходит деформирование сустава и возникает так называемая варусная деформация, которая влечет за собой значительное увеличение нагрузки на хрящевую ткань в области медиального мыщелка большой берцовой кости [2]. Это дает основание предполагать, что в различных зонах коленного сустава, испытывающих неодинаковую механическую нагрузку, хондроциты отличаются по фенотипу, что может проявляться в изменениях синтеза количества и типов ПГ.

Таким образом, целью нашего исследования явилось изучение влияния биомеханических нагрузок на фенотип хондроцитов из разных топографических зон коленного сустава у больных остеоартрозом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы хряща из разных топографических зон коленного сустава, испытывающих разную биомеханическую нагрузку, у больных идиопатическим остеоартрозом III степени с варусной деформацией (14 человек, возраст от 65 до 75 лет). После операции эндопротезирования коленного сустава для исследования были отобраны следующие образцы: 1 – задний край внутреннего мыщелка бедра, испытывающий

наименьшую механическую нагрузку (зона не нагружаемого хряща); 2 – латеральный мыщелок (зона малонагружаемого хряща); 3 – медиальный мыщелок большой берцовой кости, расположенный в зоне варусной деформации (нагружаемый хрящ) [1].

ПГ выделяли из ткани последовательным экстрагированием растворами разной ионной силы – 0,14М NaCl (пул 1), 4М гуанидина гидрохлоридом (пул 2). Оставшуюся нерастворенную ткань обрабатывали раствором папаина (пул 3) [2]. ПГ очищали ионообменной хроматографией на сефадексе ДЕАЕ А-25, осаждали спиртом в присутствии 2,5 % ацетата калия, высушивали и растворяли в воде.

Количество ПГ определяли по содержанию в их углеводной части сульфатированных гликозаминогликанов и гексуроновых кислот, гексозы (галактоза) [1], а также белка методом Бредфорд [1]. Структурные особенности ПГ из разных экстрактов определяли по их подвижности в электрическом поле, разделяя их горизонтальным электрофорезом в композитном геле агароза/полиакриламид в 0,1М трис-буфере pH 6,3 [15].

Для определения синтетического потенциала клеток суставного хряща у больных остеоартрозом в разных топографических зонах коленного сустава с помощью ПЦР исследовали экспрессию генов, характерных для дифференцировки, пролиферации (KLF4, SOX-9, TGF β -3), восприимчивости клеток к стимулирующим факторам (TGF β R), а также активность генов коллагенов типа I и II (COL1A1, COL2A1), протеогликанов – агрекана (Acan), люмикана (Lum), версикана (Vcan), гена HAPLN1, кодирующего линк-белок, который обеспечивает связь мономеров агрекана с гиалуроновой кислотой.

Материалом для исследования уровня экспрессии генов служили клетки, выделенные из хрящевой ткани коленного сустава разных топографических зон. Суспензию клеток получали обработкой кусочков хрящевой ткани 1,5 % раствором коллагеназы. РНК выделяли из клеток тризольным методом (TRI reagent, Sigma-Aldrich, США) с последующей обработкой ДНКазой, свободной от РНКаз (Fermentas). ДНК получали в реакции обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы М-MLV (Promega, США) в присутствии праймера Oligo (dT)15 (БИОССЕТ, Россия). Амплификацию фрагментов целевых генов проводили методом ПЦР на амплификаторе TRIO-Thermoblock (Biometra, Германия). В качестве контрольного гена использовался ген «домашнего хозяйства» фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. ПЦР была выполнена с использованием Taq-

Таблица 1

Последовательность праймеров

Название гена	Название праймера	Последовательность праймера	Размер целевого фрагмента, пар оснований	Условия проведения реакции
Acan	ACAN1 1f ACAN1 1r	5'-ATCGTCACCCCCGAGGAGCAG-3' 5'-GGCGCTGGACAAACCCCTCTG-3'	379	3 мин при 95 °C, 30 циклов: 30 с 95 °C, 30 с 58 °C
Vcan	VCAN f VCAN r	5'-ACTGCTTTAAACGACCTGATCGCTGC-3' 5'-TGAGATGGGCACCCTGCAGACGG-3'	360	
Lum	LUM2 f LUM2 r	5'-GTGACTGGGCTGGGTCTCCCC-3' 5'-GGCACTTGGGTAGCTTTCAGGGC-3'	329	3 мин при 95 °C, 30 циклов: 30 с 95 °C, 30 с 60 °C
HAPLN1	HAPLN1f HAPLN1r	5'-GGCAGAACACAGTGCCCGGAGTC-3' 5'-GCGCACTGCAGCCTCAGTAGGAC-3'	317	
COL1A1	COL1A1 f COL1A1 r	5'-ATCCAGCTGACCTTCCTGCG-3' 5'-TGGAAGCCGAATTCCTGGTCT-3'	301	
COL2A1	COL2A1 f COL2A1 r	5'-GAAACCATCAATGGTGGCTTCC-3' 5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'	322	
TGF _β R	TGFBR f TGFBR r	5'-GGCGAGCGGTCTTGCCCATC-3' 5'-CTCAAGGCTTCACAGCTCTGCCA-3'	468	
TGF _β -3	TGF f TGF r	5'-GGCTGGCGGAGCACAACGAA-3' 5'-GGGTTGTCGAGCCGGTGTGG-3'	535	
SOX-9	SOX9 f SOX9 r	5'-GCGTCAACGGCTCCAGCAAGA-3' 5'-GGCCTGCAGCGCCTGAAGAT-3'	369	

полимеразы и ген-специфичных праймеров при условиях, указанных в табл. 1. Анализ продуктов ПЦР проводили методом горизонтального гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле в буфере TAE в присутствии бромистого этидия. Сканирование геля проводили в ультрафиолетовом свете с помощью видеосистемы «DNA Analyzer» (Россия).

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, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы проверить гипотезу о влиянии биомеханических нагрузок на фенотип хондроцитов, мы исследовали содержание и структуру ПГ из разных топографических зон коленного сустава больных остеоартрозом, а также экспрессию генов основных ПГ хряща и факторов пролиферации и дифференцировки хондроцитов.

Количество выделяемых ПГ из разных зон коленного сустава представлено в табл. 2. В зонах 1 и 2 (не нагружаемый и мало нагружаемый хрящ) содержание воды в ткани, белка в ПГ, а также их структурных компонентов – сульфатированных

ГАГ – практически одинаково. Но в зоне малонагружаемого хряща (зона 2) достоверно снижена концентрация глюкозуриновых кислот, входящих в состав хондроитинсульфатов (цепей ГАГ, ответственных за удержание воды), и в 2 раза повышено содержание гексоз.

В зоне нагружаемого хряща содержание всех компонентов достоверно снижается, кроме гексоз, количество которых увеличивается в 2,7 раза по сравнению с ненагружаемой зоной. Эти изменения определяются особенностями течения дегенеративных процессов в разных топографических зонах сустава, под влиянием разных внешних условий, в данном случае – неодинаковой биомеханической нагрузки [1].

Следует подчеркнуть, что в структуре ПГ из разных топографических зон относительное содержание белка снижается от не нагружаемого хряща к нагружаемому. Все это может быть, хотя и косвенно, признаком изменения структуры ПГ, имеющих укороченную центральную нить белка, а также разное количество углеводных цепей, присоединенных к ней.

Накопление нейтральных гексоз, скорее всего, связано с накоплением продуктов конечного гликирования и формированием дополнительных поперечных связей в сети коллагеновых фибрилл, которые обычно сопровождают процессы старения и дегенерации [6, 10]. Таким образом, снижение в хряще соотношения ГАГ/белок и нако-

Таблица 2

Общее количество химических компонентов гликозаминогликанов в хрящевой ткани разных топографических зон коленного сустава больных остеоартрозом III стадии (n = 11)

Исследуемый показатель (содержание)	Зона 1	Зона 2	Зона 3
Вода, %	70,6 ± 1,51	69,1 ± 3,87	58,8 ± 2,89*
Сульфатированные ГАГ, мкг/мг сухой ткани	55,2 ± 6,28	45,6 ± 5,21	19,4 ± 1,12*
Уроновые кислоты, мкг/мг сухой ткани	33,1 ± 3,06	22,4 ± 2,12*	23,4 ± 1,79*
Гексозы, мкг/мг сухой ткани	65,4 ± 6,24	124,5 ± 17,6*	196,8 ± 10,2*
Белок, мкг/мг сухой ткани	10,2 ± 1,25	11,2 ± 1,03	6,6 ± 0,52*

Примечание. Зона 1 – хрящ заднего края внутреннего мыщелка бедра (ненагружаемая зона); зона 2 – мыщелок большой берцовой кости, расположенный в стороне от варусной деформации колена (малонагружаемый хрящ); зона 3 – медиальный мыщелок большой берцовой кости, расположенный в зоне варусной деформации (нагружаемый хрящ).

пление гексоз прямо связано с дегенеративными изменениями хряща в ходе развития заболевания. То есть в коленном суставе больных с III стадией остеоартроза выраженность дегенеративных процессов в разных топографических зонах различается и непосредственно зависит от внешних условий воздействия на сустав, в данном случае – механической нагрузки.

Эффективность выделения ПГ из хряща зависит от структуры ткани и прочности связей в ней. Доступность ПГ для растворителей существенно различается в разных топографических зонах. В качестве количественной характеристики ПГ в данной работе мы приняли содержание в их структуре сульфатированных ГАГ.

Наиболее слабым растворителем – 0,14М раствором NaCl – выделяются ПГ, еще не вошедшие в состав структур внеклеточного матрикса, т.е. это могут быть недавно синтезированные протеогликановые [13]. 4М раствор гуанидина гидрохлорида позволяет выделить ПГ, включенные посредством различных связей в функционально активный внеклеточный матрикс. Оставшиеся ПГ, доступные только после полного разрушения белковых структур матрикса, скорее всего, участвуют в формировании «базовых» структур, в которых преобладают белковые образования с прочными поперечными связями. Соотношение этих трех групп (пулов) ПГ отличается в разных топографических зонах (рис. 1).

Так, в не нагружаемой зоне хряща (зона 1) основное количество ПГ экстрагируется 4М раствором гуанидина гидрохлорида (см. рис. 1), практически одинаково (9–10 %) выделяется 0,14М NaCl и папаином, т.е. количество ПГ, слабо связанных со структурами внеклеточного матрикса, и тех, что прочно фиксированы поперечными связями с белковыми структурами в глубоких слоях ткани, равно.

В малонагружаемом хряще (зона 2) в сравнении с другими топографическими зонами уро-

вень ГАГ относительно высок – 20 % всех сульфатированных ГАГ выделяется 0,14М раствором NaCl (пул 1). Основное количество ПГ в этой зоне можно экстрагировать 4М раствором гуанидина гидрохлорида (пул 2) и после разрушения ткани папаином (пул 3). Относительное количество ПГ в этих пулах практически одинаково и составляет около 40 %.

В зоне хряща со стороны варусной деформации, испытывающего максимальную механическую нагрузку (зона 3), основное количество ПГ (75 %) прочно фиксировано в структурах ткани и выделяется только после обработки ткани папаином (пул 3). Оставшиеся ПГ (примерно 25 %) поровну распределены между пулами 1 и 2.

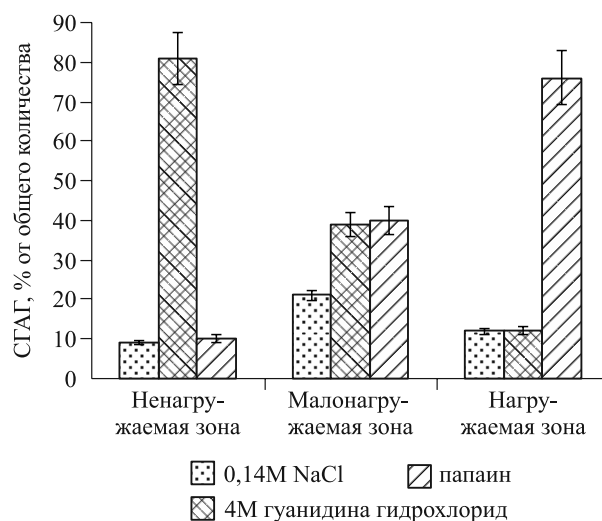


Рис. 1. Распределение сульфатированных ГАГ между пулами протеогликанов суставного хряща, выделяемых из разных зон коленного сустава больных остеоартрозом III стадии последовательно разными растворителями – 0,14 М NaCl, 4 М гуанидина гидрохлоридом, раствором папаина. СГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

Таким образом, в хряще из разных зон коленного сустава у больных остеоартрозом с III стадией заболевания метаболические процессы существенно различаются, что отражается на доступности ПГ для экстракции разными растворителями. Но даже в остатках хряща, который подвержен максимальным механическим нагрузкам, часть ПГ можно выделить 0,14М раствором NaCl, что, вероятно, свидетельствует о присутствии в этой зоне новосинтезированных молекул. Надо подчеркнуть общую закономерность: чем выше механическая нагрузка и активнее течение дегенеративных процессов, тем больше относительный объем труднодоступных ПГ, т.е. тем многочисленнее поперечные связи в структурных элементах ткани не только за счет накопления конечных продуктов гликирования белков, но и за счет преобладания коллагена. Причины такого различия, возможно, связаны с изменением фенотипа хондроцитов, продуцирующих ПГ и коллагены различного типа [8, 11, 17, 18], под влиянием как заболевания, так и вмешательством внешних воздействий на хрящ коленного сустава.

Разделение ПГ методом вертикального электрофореза в композитном геле агароза/полиакриламид в 0,1М трис-буфере pH 6,3 позволяет выявить структурные различия ПГ из разных топографических зон при условии разной подвижности в электрическом поле в зависимости от размеров молекул и их электрического заряда (рис. 2).

Подвижность ПГ в электрическом поле из различных топографических зон, выделяемых 0,14М раствором NaCl (пул 1), различается. Если

ПГ этого пула из ненагружаемого хряща движутся единой полосой (см. рис. 2, а, дорожка 1), то в малонагружаемом (см. рис. 2, б, дорожка 1) и наиболее нагружаемом хряще (см. рис. 2, в, дорожка 1) обнаружено разделение на 2 полосы. При этом в нагружаемой зоне коленного сустава молекулы разделяются на 2 полосы более четко, чем в малонагружаемой, и, как видно по рисунку, количество легких молекул больше в зоне, испытывающей наибольшую нагрузку.

ПГ пула 2, выделяемые 4М раствором гуанидина гидрохлорида, во всех топографических зонах одинаково «тяжелые» относительно других пулов ПГ. Подвижность экстрагируемых таким образом ПГ из зоны ненагружаемого хряща (см. рис. 2, а, дорожка 2) отличается от подвижности молекул из других зон (см. рис. 2, б, в, дорожки 2). Эти ПГ являются «агрегированными» и разделяются на более «легкую» и более «тяжелую» фракции, отсутствующие в данном пуле, выделенном из других зон коленного сустава.

Третий пул ПГ, которые выделяются после разрушения ткани папаином из зон ненагружаемого и малонагружаемого хряща, представлен одинаково «легкими» молекулами (см. рис. 2, а, б, дорожки 3). Но в зоне нагружаемого хряща наряду с такими «легкими» молекулами содержится и более «тяжелые» (см. рис. 2, а, дорожка 2).

Таким образом, ПГ из разных топографических зон коленного сустава, при разделении их с помощью электрофореза демонстрируют как общие, так и индивидуальные свойства для каждого пула. Такую гетерогенность молекулярного состава протеогликанов, которая подтверждается измененным составом их углеводной части – ГАГ [1], можно объяснить вариабельностью фенотипа функционирующих хондроцитов, причем в каждой топографической зоне этот фенотип специфичен. Известно, что в постнатальном развитии суставного хряща вследствие неодинакового распределения механических нагрузок в суставе формируются популяции фенотипически различных хондроцитов [4, 17]. Такое фундаментальное свойство хондроцитов сохраняется у больных остеоартрозом и обеспечивает хрящевому покрытию адаптацию к переменным биомеханическим нагрузкам в различных зонах сустава. «Легкие» молекулы ПГ, обнаруживаемые в виде отдельных полос на электрофореграмме, могут появляться вследствие двух разнонаправленных процессов: либо в результате накопления молекул малых размеров – декорина, бигликана, люмикана, что происходит с возрастом [8], либо вследствие активных катаболических процессов в тканях коленного сустава при развитии остеоартроза [3, 8], которые сопровождаются увели-

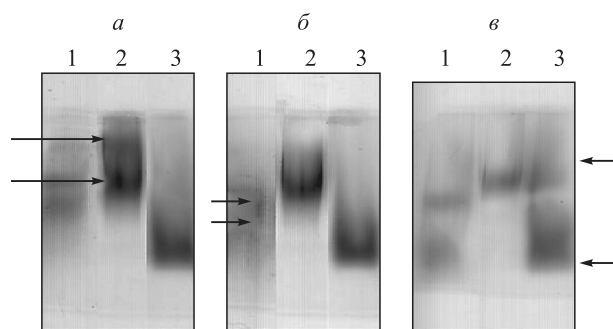


Рис. 2. Электрофоретическое разделение разных пулов ПГ, выделенных последовательно разными способами: 1 – с помощью экстракции 0,14М NaCl; 2 – с помощью экстракции 4М гуанидина гидрохлоридом; 3 – с помощью обработки ферментом (папаином). а – ПГ выделены из ненагружаемого хряща; б – ПГ выделены из малонагружаемого хряща; в – ПГ из нагружаемого хряща. Стрелками указаны отдельные выделенные полосы разделения молекул ПГ

чением содержания в хряще продуктов распада больших молекул. Наши данные подтверждают накопление низкомолекулярных ПГ, поскольку в нагружаемых зонах возрастает относительное количество кератансульфата [1], который является составной частью низкомолекулярных ПГ [14], т.е. в хрящевой ткани меняется состав ГАГ. Возможно также, что это связано с одновременным увеличением активности катаболических процессов в тканях коленного сустава при развитии дегенеративных процессов [3, 8], приводящих к накоплению в хряще продуктов распада больших молекул.

В ходе исследования потенциальной синтетической активности клеток из различных топографических зон коленного сустава было обнаружено, что независимо от степени нагрузки и, соответственно, дегенерации в хрящевой ткани суставов, в хондроцитах больных остеоартрозом сохраняется активность генов структурных компонентов внеклеточного матрикса: основного ПГ хряща агрекана, участвующего в формировании коллагеновых фибрил малого ПГ люмикана, а также гена линк-белка HAPLN1, который связывает большой ПГ агрекан с гиалуроновой кислотой и таким образом способствует формированию больших агрегатов молекул (рис. 3). Кроме того, сохраняется экспрессия генов пролиферации и дифференцировки клеток SOX-9, $TGF_{\beta-3}$ и гена рецептора $TGF_{\beta-3}$ ($TGF_{\beta-R}$).

Отсюда следует, что в условиях выраженных дегенеративных изменений даже в тонком слое хряща, сохраненном на границе с костной поверхностью большой берцовой кости, в оставшихся живых клетках экспрессируются гены не только молекул его структурных компонентов хряща, но и сигнальных белков пролиферации и дифференцировки. Ген SOX-9 играет важнейшую роль в регуляции образования хряща и дифференцировке хондроцитов, его продукт активирует экспрессию гена коллагена типа II и других, специфических для хряща генов [9, 12]. Некоторые авторы отмечают снижение уровня экспрессии SOX-9 в хряще больных остеоартрозом [9], однако в нашем исследовании это не подтвердилось. $TGF_{\beta-3}$ и его рецептор принимают участие в запуске биосинтеза хондроцитами молекул внеклеточного матрикса [20]. Сохраняющие свою активность гены регуляторных белков – фактора пролиферации хондроцитов SOX-9, цитокина $TGF_{\beta-3}$ и его рецептора, вероятно, поддерживают и регулируют процессы синтеза молекул внеклеточного матрикса хрящевой ткани даже в участках ткани, подверженных наибольшему дегенеративным изменениям. Вероятно, экспрессия совокупности этих генов вносит свой вклад в способность со-

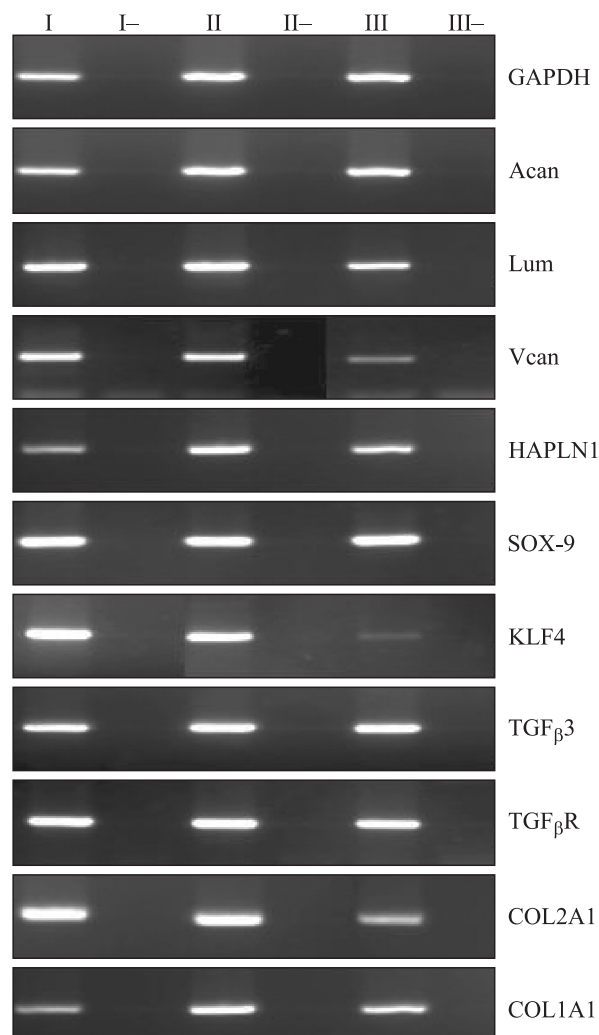


Рис. 3. Экспрессия генов в хрящевой ткани пациентов, больных артрозом. Условные обозначения: I – ненагружаемый хрящ, II – малонагружаемый хрящ, III – нагружаемый хрящ; I-, II-, III- отрицательный контроль

хранившихся клеток из разных зон сустава в определенной мере поддерживать активные метаболические процессы, потенциал пролиферации, дифференцировки и восприимчивости клеток к регуляторным внешним сигналам даже в наиболее патологически измененном хряще, по крайней мере какое-то время.

Тем не менее прогрессирующее ухудшение состояния хрящевой ткани свидетельствует о причастности к процессу дегенерации хряща других факторов. В нашем исследовании обнаружено, что в зависимости от действующей нагрузки в хрящевой ткани больных остеоартрозом происходят изменения экспрессии по крайней мере четырех генов, два из которых кодируют структурные белки матрикса – коллагены I и II типа, один кодирует регуляторный белок, а продукт

четвертого входит в состав молекулы, несущей как регуляторную, так и структурную функцию. Так, нами установлено, что в зоне нагружаемого хряща, подвергнувшегося наибольшей дегенерации, относительно двух других зон снижена экспрессия гена основного структурного белка хрящевой ткани коллагена II типа (см. рис. 3). Экспрессия гена коллагена I типа, являющегося минорным компонентом хрящевой ткани, повышалась в малонагружаемом хряще и имела тенденцию к уменьшению в наиболее нагружаемом участке хрящевой ткани (см. рис. 3). Кроме того, в нагружаемой зоне несколько понижена экспрессия ПГ версикана (см. рис. 3), способного выполнять структурную и регуляторную функцию [20], и существенно снижена экспрессия регуляторного гена *KLF4* (см. рис. 3), ответственного за пролиферацию и дифференцировку клеток. Уменьшение экспрессии указанных генов может служить как причиной выраженной дегенерации хрящевой ткани именно в этой зоне коленного сустава, так и ее следствием, однако, несомненно, является звеном патогенеза остеоартроза и поэтому требует дальнейшего изучения.

Таким образом, установлено, что в каждой топографической зоне коленного сустава больных остеоартрозом хрящевая ткань обладает определенной спецификой обменных процессов и состава внеклеточного матрикса. Известно, что остеоартроз проявляется в потерях не только молекул из ткани хряща, но и хрящевого покрытия костных поверхностей в целом [3–6]. Необходимо подчеркнуть, что хондроциты хряща здоровых и пораженных остеоартрозом суставов проявляют одинаковую синтетическую активность, продуцируют сравнимые количества макромолекул независимо от возраста или болезни [7]. Поэтому снижение числа хондроцитов в хряще с возрастом и при развитии остеоартроза суставов может быть решающим фактором в ограничении количества поступающих в матрикс вновь синтезированных макромолекул и репаративных возможностей ткани, провоцирующих прогрессирование заболевания [7].

У больных тяжелой формой остеоартроза в хряще коленного сустава сохраняются активные метаболические процессы: синтезируется ряд ключевых компонентов внеклеточного матрикса и регуляторных белков активации, пролиферации и дифференцировки хондроцитов, молекулы ПГ – одного из основных компонентов матрикса хряща, в хондроцитах экспрессируются гены основного белка хряща коллагена типа II и гены пролиферации и дифференцировки хондроцитов. Эти процессы отмечены в хряще всех исследованных зон коленного сустава, испытыва-

ющих разную биомеханическую нагрузку – от максимально сохранившейся ткани в стороне от активной двигательной нагрузки до минимально сохранившейся ткани в области варусной деформации сустава. Тем не менее, по всей вероятности, существенное снижение экспрессии гена регуляторного белка *KLF4* и гена составной части структурного ПГ хряща версикана вместе с постоянно возрастающей в ходе дегенерации нагрузкой на хрящевую ткань являются факторами, связанными с прогрессированием остеоартроза, и свидетельствуют о специфике функционирования хондроцитов из этой зоны.

Топографическое разнообразие структуры протеогликанов, выявленное в настоящем исследовании, также предполагает фенотипическую спецификацию хондроцитов в зависимости от топографической зоны коленного сустава, в которой они локализованы. Биомеханические напряжения оказывают существенное влияние на все стороны физиологических процессов в ткани хряща. Очевидно, что совокупность внешних и внутренних регуляторных и метаболических влияний в конечном итоге приводит у больных остеоартрозом к перерождению ткани гиалинового хряща в ткань с иной структурой и иными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании выявлено, что у больных с тяжелой формой идиопатического остеоартроза (III стадия заболевания) в хряще разных топографических зон коленного сустава, возникающих под влиянием неодинаковой биомеханической нагрузки, содержание и структура протеогликанов значительно различаются. В зоне максимальной нагрузки (относительно минимально нагружаемой зоны) снижается содержание ПГ и накапливаются молекулы малых размеров, обладающие высокой подвижностью при разделении их в электрическом поле. Свойства молекул ПГ непосредственно связаны с особенностью строения ткани в каждой топографической зоне. При этом в клетках всех топографических зон одинаково экспрессируются гены основных структурных элементов хряща – коллагена и агрекана, а также гены сигнальных белков пролиферации и дифференцировки клеток, т.е. даже в условиях тяжелых дегенеративных изменений в хряще резидентные клетки сохраняют жизнеспособность и потенциал синтетической активности. Возможно, что снижение уровня экспрессии гена версикана и *KLF4* в зоне, испытывающей наибольшую механическую нагрузку, влияет на прогрессирующее поражение хрящевой ткани при данном заболевании. Неодинаковая биомехани-

ческая нагрузка в разных топографических зонах коленного сустава определяет фенотип хондроцитов данной зоны, которые формируют хрящ, способный максимально адекватно соответствовать внешним влияниям. Такие фенотипические различия определяют особенности структуры ПГ в разных топографических зонах единого коленного сустава.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования Российской Федерации по Федеральной целевой программе «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., Соглашение о предоставлении гранта № 8301.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Русова Т.В., Баумов В.С. Структура гликозаминогликанов суставного хряща у больных остеоартрозом: влияние топографии коленного сустава // Бюл. СО РАМН. 2012. 32. (2). 54–60.
2. Русова Т.В., Баумов В.С. Биохимические изменения протеогликанов суставного хряща при прогрессирующем остеоартрозе // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2008. (2). 26–30.
3. Abramson S.B., Attur M. Developments in scientific understanding of osteoarthritis // Arthritis Res. Ther. 2009. 11. (3). 227–235.
4. Aigner T., Dudhia J. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis // Ann. Rheum. Dis. 1997. 56. 287–291.
5. Aigner T., Söder S., Gebhard P.M. et al. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis – structure, chaos and senescence // Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2007. 7. 391–399.
6. Anderson A.S., Loeser R.F. Why is osteoarthritis an age-related disease? // Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. 2010. 24. (1). 15–25.
7. Bobacz K., Erlacher L., Smolen J. et al. Chondrocyte number and proteoglycan synthesis in the aging and osteoarthritic human articular cartilage // Ann. Rheum. Dis. 2004. 63. 1618–1622.
8. Cs-Szabo G., Ragasa D., Berger R.A., Kuettner K.E. The many faces of osteoarthritis. Berlin, 2002. 489 p.
9. Cucchiari M., Thurn T., Weimer A. et al. Resorption of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX-9 // Arthritis Rheum. 2007. 56. (1). 158–167.
10. DeGroot J., Verzijl N., Wenting-van Wijk M.J., et al. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis // Arthritis Rheum. 2004. 50. 1207–1215.
11. Dejica V.M., Mort J.S., Lavery S. et al. Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage // Arthritis Res. Ther. 2012. 14. (3). R113.
12. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders // Arthritis Res. Ther. 2010. 12. (5). 216–224.
13. Hardingham T.E., Muir H. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation // Biochem. J. 1974. 139. 565–581.
14. Hardingham T.E., Fosang A.J. Proteoglycans: many forms and many function // FASEB J. 1992. 6. 861–870.
15. Iozzo R.V. Cartilage and smooth muscle cell proteoglycans detected by affinity blotting using biotinylated hyaluronan // Methods Mol. Biol. 2000. 171. 53–66.
16. Kurz B., Lemke A.K., Fay J. et al. Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury // Ann. Anat. 2005. 187. 473–485.
17. Little C.B., Ghosh P. Variation in proteoglycan metabolism by articular chondrocytes in different joint regions is determined by post-natal mechanical loading // Osteoarthritis Cartilage. 1997. 5. (1). 49–62.
18. Loeser R.F. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis // Clin. Geriatr. Med. 2010. 26. (3). 371–386.
19. Loeser R.F. Aging cartilage and osteoarthritis – what's the link? // Curr. Opin. Rheumatol. 2011. 23. (5). 492–496.
20. Settembre C., Arteaga-Solis E., McKee M.D. et al. Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification // Genes Dev. 2008. 22. 2645–2650.
21. Van Osch G.J., van der Veen S.W., Buma P., Verwoerd-Verhoef H.L. Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix // Matrix Biol. 1998. 17. (6). 413–424.

SPECIFIC METABOLISM OF PROTEOGLYCANS FROM DIFFERENT TOPOGRAPHICAL ZONES OF THE KNEE IN PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS: THE VARIABILITY OF CHONDROCYTES PHENOTYPE

**Tatyana Vasilievna RUSOVA, Elena Leonidovna STROKOVA,
Anastasiya Aleksandrovna VOROPAEVA, Elene Igorevna SHCHELKUNOVA**

*Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsyvjan
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

The content and properties of cartilage proteoglycans from different topographical zones of knee joint of patients with idiopathic knee osteoarthritis (OA) of Grade III were investigated. The expression of cartilage main structural genes – proteoglycans (PG) – aggrecan, lumikan, versican, collagens type I and II, as well as proliferation and differentiation genes of chondrocytes – SOX-9, TGF β -3, TGF β R, and KLF4 were examined in the cartilage specimens from these zones. The content and properties of proteoglycans differ between topographical zones: the zone with maximum mechanical load has minimal PG level. They are more firmly bounded to the collagen fibrils, more flexible in electric field and less aggregated. It has been revealed that the cells from all topographic zones despite the degeneration degree and mechanical load retain the capability to express genes of main components of extracellular matrix as well as signal proteins of proliferation and differentiation at the same level. However, the gene expression of proteoglycan versican and regulatory protein KLF4 was reduced in the most loaded zone. Thus, the phenotypical variant chondrocytes produce proteoglycans differing in quantity and property in varied zones of the knee cartilage.

Key words: proteoglycans, proteoglycans genes expression, chondrocyte differentiation and proliferation gene expression, articular cartilage, osteoarthritis.

*Rusova T.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory-experimental department,
e-mail: TRusova@niito.ru*

Strokova E.L. – researcher of the laboratory-experimental department, e-mail: EZavyalova@niito.ru

*Voropaeva A.A. – candidate of biological sciences, researcher of the innovations and intellectual property department,
e-mail: Voropaeva2011@rambler.ru*

Shchelnkounova E.I. – researcher of the laboratory-experimental department, e-mail: EShelnkounova@niito.ru