

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КРОВЕНОСНЫХ КАПИЛЛЯРОВ НА ПОЗДНЕЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ КАРЦИНОСАРКОМЫ WALKER 256 ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ЦИКЛОФОСФАНА И МЕЛАТОНИНА

Елена Владимировна ОВСЯНКО¹, Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА¹,
Александра Олеговна КУЛИШЕНКО¹, Александр Сергеевич ВИНОГРАДОВ¹,
Наталья Петровна БГАТОВА², Елена Николаевна САМСОНОВА¹

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

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

Изучена ультраструктурная реорганизация эндотелия карциносаркомы Walker 256 при воздействии циклофосфана в сочетании с мелатонином. Использовали самцов крыс линии Wistar массой 180–200 г. Суспензию клеток перевиваемой карциносаркомы Walker 256 вводили животным в мышцу бедра в дозе 10×10^6 клеток. Для электронно-микроскопического исследования забирали материал опухолевой ткани на 5-й день после трансплантации опухолевых клеток. Применение циклофосфана как в качестве моноагента, так и в сочетании с мелатонином вызывает однонаправленные изменения внутриклеточной организации эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256, но разной степени выраженности: снижение объемной и численной плотности митохондрий, а также свободных полисомальных и прикрепленных рибосом, объемной плотности гранулярной цитоплазматической сети, объемной плотности все типов микропиноцитозных везикул.

Ключевые слова: карциносаркома Walker 256, эндотелиоциты, циклофосфан, мелатонин.

Практически все используемые в настоящее время в лечении онкобольных классические препараты вызывают побочные эффекты, значительно снижая качество жизни пациентов. Одним из приоритетных направлений терапии онкозаболеваний является изучение минимизирования побочных эффектов на здоровые клетки организма и сохранение, а возможно, и повышение эффективности лекарственных средств. Таким препаратом выбора является мелатонин, действие которого связывают с его иммуномодулирующими, антипролиферативными и антиоксидантными свойствами [7, 8]. Однако имеется мало данных, которые помогут раскрыть возможность влияния мелатонина на ангиогенез, являющийся одним из основных биологических механизмов, ответственных за распространение опухоли.

Ранее в своих работах мы демонстрировали, что мелатонин проявляет синергизм с циклофосфаном в клетках карциносаркомы Walker 256 по потенцированию внешнего пути апоптоза и индуцирует морфогенетические процессы, приводящие к усилению структурированности опухолевого узла карциносаркомы Walker 256 с формированием обособленных псевдофолликулярных структур, разделенных соединительно-ткаными септами [4, 5]. Включение мелатонина в схемы противоопухолевой терапии приводило к снижению митотического индекса и к усилению апоптоза опухолевых клеток. По данным иммуногистохимического исследования после применения циклофосфана и мелатонина как в качестве моноагентов, так и в сочетании в опухолевых клетках карциносаркомы Walker 256 значительно

Овсянко Е.В. – д.м.н., доцент кафедры анатомии человека педиатрического факультета,
e-mail: vin_san92@mail.ru

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

Кулишенко А.О. – заочный аспирант кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии

Виноградов А.С. – студент 5-го курса стоматологического факультета

Бгатова Н.П. – д.б.н., проф., зав. лабораторией ультраструктурных исследований, e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Самсонова Е.Н. – д.м.н., проф., зав. учебной частью кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии, e-mail: Elena-samsonova@mail.ru

снижалась экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 и усиливалась экспрессия проапоптотических белков Вах и Bad. При этом происходило значительное уменьшение отношений Bcl-2/Вах и Bcl-2/Bad, особенно при сочетанном применении цитостатических препаратов: отношение Bcl-2/Вах наиболее значительно снижено после сочетанного применения циклофосфана и мелатонина [5]. Анализ основных параметров опухолевого роста карциносаркомы Walker 256 и системных проявлений неопластического процесса после изолированного и сочетанного применения циклофосфана и мелатонина также свидетельствовал о том, что наибольшая эффективность терапии достигалась при сочетанном применении химических агентов с разными механизмами действия [4].

В то же время имеется мало данных об ультраструктурных перестройках эндотелиоцитов кровеносных капилляров в динамике развития опухоли и в условиях терапевтического воздействия на нее, что имеет значение для определения эффективности лекарственной терапии [2, 10]. Все эти факты делают процесс ангиогенеза и уже сформированные эндотелиальные клетки новообразованных сосудов привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии [3].

Цель настоящей работы – изучение ультраструктурной реорганизации эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256 при сочетанном воздействии циклофосфана и мелатонина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали самцов крыс линии Wistar массой 180–200 г. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Использовали перевиваемый штамм карциносаркомы Walker 256, поддерживаемый *in vivo* (лаборатория физиологической генетики Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Суспензию клеток перевиваемой карциносаркомы Walker 256 вводили животным в мышцу бедра в дозе 1×10^6 клеток [6].

Через 5 суток с момента перевивки опухоли, когда ее объем достигал $2,51 \pm 0,42$ см³, животных разделяли на 3 группы: 1-ю группу ($n = 7$) использовали в качестве контроля («спонтанное» развитие опухоли), крысам 2-й группы ($n = 7$) вводили циклофосфан («Биохимик», Саранск), 3-й группы ($n = 7$) – циклофосфан и мелатонин (ICN Biomedicals Inc., США). Циклофосфан вво-

дили однократно внутрибрюшинно из расчета 25 мг/кг в 0,1 мл изотонического раствора NaCl спустя 5 суток с момента перевивки опухоли, мелатонин – внутрибрюшинно из расчета 0,3 мг/кг в течение 14 суток начиная с 5-х суток после введения опухолевых клеток. Животных содержали при фиксированном световом режиме (свет – темнота 12:12 с включением освещения в 8.00 и выключением в 20.00) и стандартизированной температуре.

Для электронно-микроскопического исследования забирали материал опухолевой ткани на 19 день после трансплантации опухолевых клеток. Образцы опухоли величиной 1 мм³ по 5 кусочков от каждого животного фиксировали в 4 % параформальдегидном фиксаторе на 0,1 М фосфатном буфере Миллонига (рН 7,4) при комнатной температуре в течение 2 ч, затем промывали в охлажденном буфере Миллонига и в течение 1 ч дополнительно фиксировали на холоде в 1%-м осмиевом фиксаторе на 0,2 М какодилатном буфере (рН 7,4) с добавлением 1,5 % ферроцианида калия. После дегидратации в серии спиртов возрастающей концентрации образцы заключали в эпоновую смолу. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм на ультратоме LKB-8800 (Швеция), контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010 (Япония). Морфометрию эндотелиоцитов кровеносных капилляров (по 20 клеток на каждую группу) проводили при конечном увеличении в 32 000 раз с помощью открытой тестовой системы.

Полученные в экспериментах цифровые данные обрабатывали с использованием общепринятых методов статистики [1], 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

Через 14 суток после введения циклофосфана отмечали возрастание электронной плотности цитоплазмы и ядер эндотелиоцитов. Практически не определялись микропиноцитозные везикулы. Контакты между эндотелиальными клетками

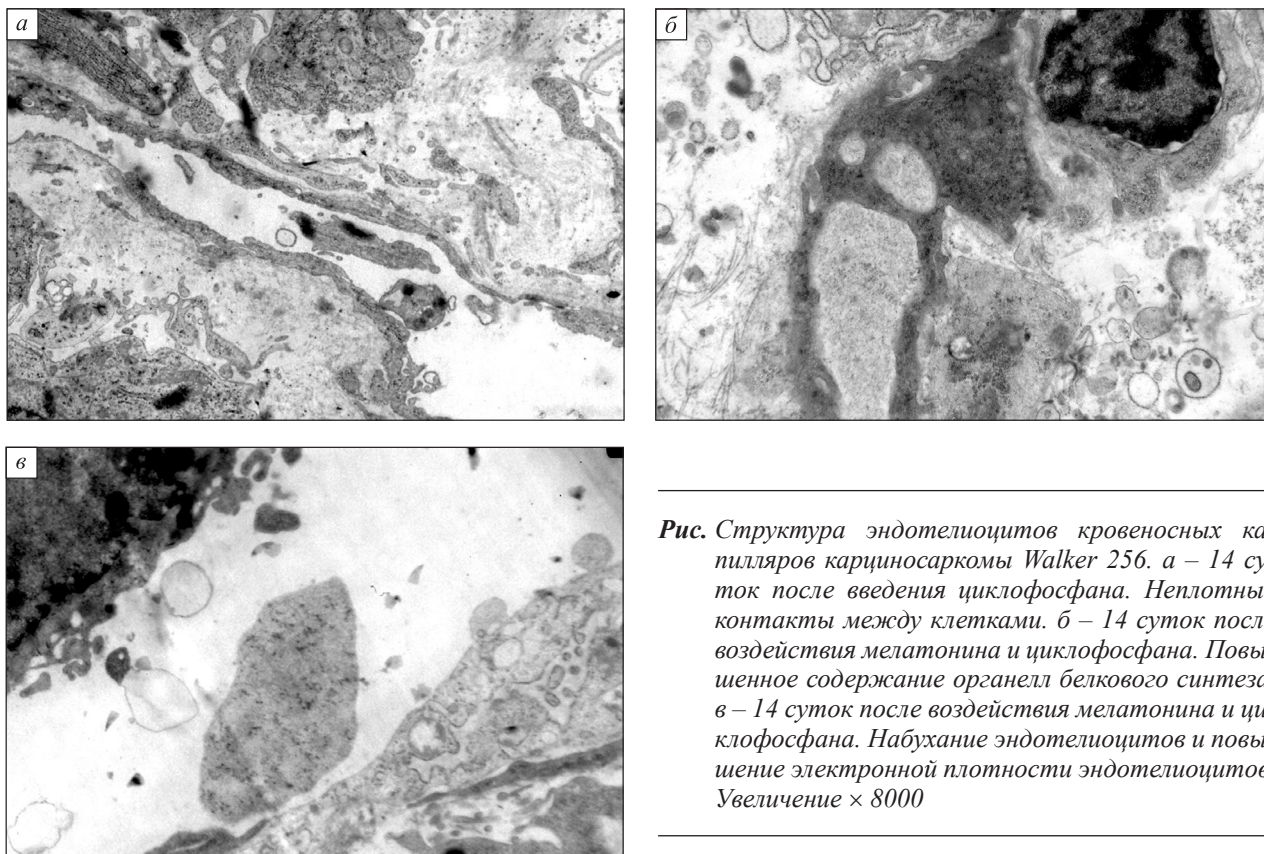


Рис. Структура эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256. а – 14 суток после введения циклофосфана. Неплотные контакты между клетками. б – 14 суток после воздействия мелатонина и циклофосфана. Повышенное содержание органелл белкового синтеза. в – 14 суток после воздействия мелатонина и циклофосфана. Набухание эндотелиоцитов и повышение электронной плотности эндотелиоцитов. Увеличение $\times 8000$

были неплотными (рисунок, а). В эндотелиоцитах кровеносных капилляров по сравнению со спонтанным развитием опухоли снижались объемная плотность митохондрий (на 49 %) и концентрация крист (на 54 %), а также объемная плотность микропиноцитозных везикул уменьшилась: люминальных – на 35 %, цитоплазматических – на 57 %, базальных – на 57 %. Достоверно снижались численные плотности митохондрий, свободных и прикрепленных рибосом по сравнению с контролем и спонтанным развитием опухоли. Объемная плотность гранулярной цитоплазматической сети была меньше, чем при спонтанном развитии опухоли на 72 %, а численные плотности прикрепленных и свободных рибосом – на 79 и 66 % соответственно (см. таблицу).

После сочетанного воздействия мелатонина и циклофосфана на периферии опухолевого роста отмечали кровеносные капилляры с хорошо развитой сетью мембран гранулярной цитоплазматической сети, прикрепленных и свободных полисомальных рибосом (рисунок, б). В кровеносных капиллярах отмечали набухание эндотелия и усиление электронной плотности отдельных клеток (рисунок, в). При сравнении морфометрических показателей эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256 через 14 суток после введения мелатонина и циклофосфана и

эндотелиоцитов при спонтанном развитии опухолевого процесса было выявлено снижение в первом случае объемной плотности митохондрий на 16 % и концентрации крист на 48 % (в связи с набуханием органелл), а также объемная плотность микропиноцитозных везикул: люминальных – на 34 %, цитоплазматических – на 51 %, базальных – на 36 %. Достоверно снижались численные плотности митохондрий, свободных и прикрепленных рибосом по сравнению с соответствующими величинами в контроле и при спонтанном развитии опухоли (см. таблицу).

Анализ полученных данных свидетельствует, что введение мелатонина совместно с циклофосфаном вызывало изменения структурно-функциональной организации кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256, которые определялись цитотоксическими свойствами каждого из них, а выраженность изменений – количеством сочетаний противоопухолевых воздействий, при этом не снижая терапевтических свойств самого циклофосфана [4, 5]. Так, при применении циклофосфана как моноагента в эндотелиоцитах кровеносных капилляров было выявлено значительное снижение объемной (на 44 %) и численной (на 19 %) плотности митохондрий, объемной плотности лизосом (на 26 %) и гранулярной цитоплазматической сети (на 59 %) (см. таблицу)

Таблица

Содержание органелл в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256 при воздействии цитостатиками ($M \pm m$)

Параметр	19 сут после трансплантации	14 сут после введения циклофосфана	14 сут после введения мелатонина и циклофосфана
Митохондрии (V_v)	$8,5 \pm 0,32$	$4,0 \pm 0,52^*$	$7,1 \pm 0,22^{*\circ}$
Митохондрии S_v внутр. мембрана \bar{S}_v наружн. мембрана	$2,3 \pm 0,15^*$	$1,2 \pm 0,33^*$	$1,2 \pm 0,36^*$
Митохондрии (N_A)	$4,1 \pm 0,28$	$2,6 \pm 0,11^*$	$3,2 \pm 0,18^{*\circ}$
ГЭР (V_v)	$19,3 \pm 0,45^*$	$5,2 \pm 0,28^*$	$12,7 \pm 0,24^{*\circ}$
Рибосомы прикрепленные (N_A)	$42,5 \pm 1,67^*$	$8,1 \pm 2,74^*$	$10,1 \pm 3,28^*$
Рибосомы свободные полисомальные (N_A)	$35,4 \pm 1,76^*$	$10,7 \pm 1,67^*$	$10,8 \pm 1,56^*$
Лизосомы (V_v)	$2,2 \pm 0,12$	$1,7 \pm 0,14^*$	$2,3 \pm 0,15^\circ$
Лизосомы (N_A)	$2,3 \pm 0,34$	$1,5 \pm 0,23$	$1,9 \pm 0,22$
Люминальные МПВ (V_v)	$6,2 \pm 0,11^*$	$4,6 \pm 0,35^*$	$3,6 \pm 0,14^{*\circ}$
Цитоплазматические МПВ (V_v)	$6,5 \pm 0,27^*$	$3,0 \pm 0,42^*$	$3,2 \pm 0,45^*$
Базальные МПВ (V_v)	$5,3 \pm 0,14^*$	$3,8 \pm 0,16^*$	$3,4 \pm 0,12^*$

Примечание. V_v – объемная плотность (%); N_A – численная плотность (число в тестовой площади); S_v – поверхностная плотность ($\text{мкм}^2/\text{мкм}^3$); ГЭР – гранулярная цитоплазматическая сеть, МПВ – микропиноцитозные везикулы. * – достоверное отличие от соответствующих показателей у крыс с Walker 256 без лечения; $^\circ$ – достоверное отличие от соответствующих показателей у крыс с Walker 256 при лечении циклофосфаном; обозначение и размерность параметров приведены согласно рекомендациям Международного стереологического общества [9].

по сравнению с сочетанным применением циклофосфана и мелатонина. В то же время объемная плотность люминальных микропиноцитозных везикул возрастала – на 22 % (см. таблицу).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение циклофосфана как в качестве моноагента, так и в сочетании с мелатонином вызывает однонаправленные изменения внутриклеточной организации эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256, но разной степени выраженности: снижение объемной и численной плотности митохондрий, а также свободных полисомальных и прикрепленных рибосом, объемной плотности гранулярной цитоплазматической сети, объемной плотности всех типов микропиноцитозных везикул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Бгатов Н.П., Мешалкин Ю.П., Изаак Т.И. и др. Микроциркуляторное русло экспериментальной лимфосаркомы и метастазирование опухолевых клеток при введении наночастиц // Бюл. СО РАМН. 2008. (5). 18–25.
3. Жуков Н.В. Современное состояние ангиогенной терапии. Целевая терапия без мишени? // Практич. онкология. 2007. 8. (3). 64–172.

4. Лушникова Е.Л., Овсянко Е.В., Непомнящих Л.М. и др. Пролиферация клеток карциносаркомы Walker 256: влияние общей гипертермии и противоопухолевых агентов // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. (3). 59–166.

5. Овсянко Е.В., Ефремов А.В., Лушникова Е.Л. и др. Иммуногистохимический анализ программируемой гибели клеток карциносаркомы Walker 256 при воздействии цитостатическими препаратами // Бюл. эксперим. биол. мед. 2009. 149. (10). 455–460.

6. 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.

7. Bartsch C., Kvetnoy I.M., Kvetnaia T.V. et al. Nocturnal urinary 6-sulfatoxymelatonin and proliferating cell nuclear antigen-immunopositive tumor cells show strong positive correlations in patients with gastrointestinal and lung cancer // J. Pineal Res. 1997. 23. 90–96.

8. Maestroni G.J.M., Conti A. Melatonin in relation to the immune system // Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical applications / Ed. H. Yu, R.J. Reiter. Boca Raton, 1993. 289–295.

9. Weibel E.R. Stereological methods. Practical method for biological morphometry. Vol. 1. London; New York; Toronto; Sidney; San Francisco: Acad. Press, 1979. 47–50.

10. Wildiers H., Guetens G., De Boeck G. et al. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11 // Br. J. Cancer. 2003. 88. 1979–1986.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF BLOOD CAPILLARY ENDOTHELIOCYTES AT THE LATE STAGE OF WALKER 256 CARCINOSARCOMA DEVELOPMENT UNDER COMBINED INFLUENCE OF MELATONIN AND CYCLOPHOSPHAMIDE

**Elena Vladimirovna OVSYANKO¹, Mariya Gennad'evna PUSTOVETOVA¹,
Aleksandra Olegovna KULISHENKO¹, Aleksandr Sergeevich VINOGRADOV¹,
Nataliya Petrovna BGATOVA², Elena Nikolaevna SAMSONOVA¹**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

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

The ultrastructural reorganization of endothelial Walker 256 carcinosarcoma when exposed to cyclophosphamide in combination with melatonin has been investigated. Wistar line male rats weighing 180–200 g have been used. The cell suspension of transplantable Walker 256 carcinosarcoma has been administered into animals' femoris muscle in a dose of 1×10^6 cells. The tumour tissue samples were taken on the 5th day after the tumour transplantation for electron microscopic investigation. Administration of cyclophosphamide as monoagent as well as in combination with melatonin causes unidirectional changes in intracellular organization of endothelial cells of capillaries in carcinosarcoma Walker 256, but of varying severity: reduced volumetric and numerical density of mitochondria, as well as free polysomal and attached ribosomes, volume density of all the types of micropinocytotic vesicles.

Key words: Walker carcinosarcoma 256, endothelial cells, cyclophosphamide, melatonin.

Ovsyanko E.V. – doctor of medical sciences, associate professor of the chair for human anatomy,
e-mail: vin_san92@mail.ru

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

Kulishenko A.O. – post-graduate student of the chair for physiopathology and clinical physiopathology

Vinogradov A.S. – student

Bgatova N.P. – doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory of ultrastructural studies,
e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Samsonova E.N. – doctor of medical sciences, professor, head of curriculum of the chair for physiopathology and clinical physiopathology, e-mail: Elena-samsonova@mail.ru

ГЕНЫ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА И СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ КАК МАРКЕРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ НЕХОДЖКИНСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ У ЖИТЕЛЕЙ г. НОВОСИБИРСКА

Ольга Валерьевна БЕРЕЗИНА¹, Александра Сергеевна ШАДРИНА²,
Татьяна Ивановна ПОСПЕЛОВА¹, Максим Леонидович ФИЛИПЕНКО²

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

² ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8

Изменения в генах фолатного цикла и системы биотрансформации ксенобиотиков могут опосредовать различную предрасположенность к неходжкинским злокачественным лимфомам (НХЗЛ). В настоящем исследовании изучена связь семи однонуклеотидных замен в генах фолатного цикла и делеций в генах глутатион-S-трансфераз M1 и T1 (GSTM1 и GSTT1) с риском развития НХЗЛ. Для полиморфного локуса G1258A гена *MTHFD1* выявлена ассоциация мутантного 1958A-аллеля со снижением риска возникновения агрессивных лимфом (OR = 0,578, С. I. [0,415–0,805], $p < 0,001$). Сочетание мутантных 1420T-аллелей в гомозиготном T/T-генотипе *SHMT1* обуславливает повышение риска развития данной группы лимфом в 2,2 раза ($p < 0,02$). У носителей мутантного генотипа *GSTM1* повышен риск развития фолликулярных лимфом (OR = 1,96, С. I. [1,072–3,581], $p < 0,02$). Таким образом, указанные полиморфные локусы могут играть роль в патогенезе НХЗЛ и использоваться в диагностике этих заболеваний.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, ДВККЛ, фолликулярная лимфома, гены биотрансформации ксенобиотиков, фолатный цикл, полиморфизм.

Достижения генетики и молекулярной биологии оказали огромное влияние на понимание природы инициализации и прогрессии злокачественных образований, что открыло принципиально новые возможности в диагностике и лечении опухолевых заболеваний. В настоящее время сформировалось несколько направлений использования молекулярных тестов в онкологии, одним из которых является генетическое тестирование онкологического риска путем исследования полиморфных вариантов генов [4]. Для некоторых заболеваний уже появилась возможность сформировать «геномный профиль болезни», представляющий собой распределение по геному полиморфных аллелей, характерных для определенной патологии [1]. В ряде исследований показана генетическая предрасположенность для неходжкинских злокачественных лимфом (НХЗЛ), что делает обоснованным поиск молекулярных

маркеров развития данной группы неоплазий [13, 18]. В исследованиях Е.Н. Воропаевой и соавторов была показана роль мутантных аллелей ряда полиморфных локусов генов системы репарации ДНК, программированной клеточной смерти, хемокиновых рецепторов в развитии НХЗЛ у жителей г. Новосибирска [3, 5], но для создания геномного профиля необходимо продолжить поиск молекулярных маркеров заболевания. Такими маркерами могут являться гены фолатного цикла и системы биотрансформации ксенобиотиков, которые играют ключевую роль в процессах синтеза и метилирования ДНК, биотрансформации ксенобиотиков, а их полиморфизмы, изменяя свойства кодируемых белков, могут вызывать нестабильность генома, что в ряде случаев способствует предрасположенности носителей этих генов к развитию опухолей различной локализации. Вместе с тем роль данных полиморфизмов в па-

Березина О.В. – к.м.н., ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии,
e-mail: ovberezina@mail.ru

Шадрина А.С. – старший лаборант лаборатории фармакогеномики, hamlet85@yandex.ru

Поспелова Т.И. – д.м.н., проф., зав. кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии,
e-mail: post_gem@mail.ru

Филипенко М.Л. – к.б.н., руководитель лаборатории фармакогеномики, e-mail: max@niboch.nsc.ru

тогенезе гемобластозов остается малоизученной. Ряд авторов указывают на то, что одни и те же аллели полиморфных локусов генов фолатного цикла и системы биотрансформации ксенобиотиков глутатион-S-трансфераз T1 и M1 могут иметь как проонкогенный, так и защитный эффект, в зависимости от этнической принадлежности популяции, типа ткани, из которой развивается опухоль, и воздействия вредных факторов внешней среды [1], что делает обоснованным изучение их влияния на развитие НХЗЛ в популяции г. Новосибирска.

Учитывая вышеизложенное, представляется значимым и перспективным исследование врожденных генетических полиморфизмов C677T и A1298C гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), A2756G гена метионинсинтазы (*MTR*), A66G гена редуктазы-метионинсинтазы (*MTRR*), G1958A гена метилентетрагидрофолат-дегидрогеназы (*MTHFD1*), C1420T гена серингидроксиметилтрансферазы (*SHMT1*), T833C/844ins68 гена цистатионин-β-синтазы (*CBS*), глутатион-S-трансфераз T1 и M1 (*GSTT1* и *GSTM1*) у больных НХЗЛ с целью установления их роли в предрасположенности к развитию заболевания.

Цель работы – изучить полиморфные варианты генов ключевых ферментов фолатного цикла и второй фазы системы биотрансформации ксенобиотиков глутатион-S-трансфераз T1 и M1 у больных неходжкинскими злокачественными лимфомами и установить их связь с риском развития заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе были использованы Tween 20 («Serva», США), додецилсульфат натрия, Tris base, акриламид, N,N-метиленбисакриламид, ТЕМЕД (все «ICN», США), Taq ДНК-полимераза (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия), протеиназа К («Serva», США). Остальные реактивы были отечественного производства и имели категорию не ниже «хч». Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP), TaqMan-зонды и олигонуклеотидные праймеры синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Выборки. Группу обследованных составили 146 пациентов с впервые установленным диагнозом НХЗЛ. Средний возраст больных – $52,4 \pm 14,97$ года (18–72 лет). По полу больные распределились поровну: мужчины и женщины по 73 человека. В соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. [17] пациенты были разделены на группы в зависимости от иммунологической при-

надлежности: с В-клеточными лимфомами – 135 человек (92,5 %), с Т-клеточными – 11 пациентов (7,5 %). Агрессивные лимфомы (диффузная крупноклеточная, беркиттоподобная, плеоморфная, лимфобластная, центробластная, иммунобластная, плазмобластная, анапластическая, мантийноклеточная, фолликулярная 3-го цитологического типа) были диагностированы у 89 пациентов (61 %), а индолентные (диффузная мелкоклеточная, пролимфоцитарная, центроцитарная, лимфо-плазмоцитарная, фолликулярная 1-го и 2-го цитологического типов, из клеток маргинальной зоны, MALT-лимфома) – у 57 человек (39 %). Средний возраст больных агрессивными лимфомами составил $49,4 \pm 14,2$ года, пациентов с индолентными лимфомами – $57,2 \pm 13,5$ года. Стадия заболевания определялась согласно классификации Ann Arbor (1971 г.). В обеих группах подавляющее большинство пациентов имели генерализованные (III и IV) стадии заболевания: 75 человек (84 %) в группе агрессивных НХЗЛ и 45 пациентов (79 %) в группе индолентных лимфом. Контрольная группа для генов ферментов фолатного цикла состояла из 549 доноров Новосибирского центра крови, средний возраст обследованных был равен $33,0 \pm 11,0$ года. Для полиморфных локусов *GSTM1* и *GSTT1* группу контроля составили 177 доноров Новосибирского центра крови, средний возраст $31,0 \pm 12,0$ года. Исследования выполнены в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.), все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с требованиями этического комитета.

Генотипирование. ДНК выделяли из венозной крови с использованием стандартной процедуры, включающей выделение и лизис клеток крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку ДНК экстракцией примесей фенол-хлороформом и осаждение ДНК этанолом, а также из буккального эпителия с использованием стандартной методики выделения ДНК на силике.

Генотипы полиморфных локусов G1958A гена *MTHFD1* и 844ins68 гена *CBS* определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с изучением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Реакцию для определения данных SNPs проводили одновременно в одной пробирке. ПЦР выполняли в конечном объеме 15 мкл, содержащем 65 мМ Tris-HCl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония; 3,5 мМ MgCl₂; 0,05%-й Tween 20; 0,2 мМ dNTP; 0,3 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров (табл. 1), 20–100 нг ДНК и 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы на ДНК-амплификаторе фирмы «Eppendorf» (Германия) с начальной денатурацией при 95 °С 3 мин, далее в

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов

Название локуса	Последовательность праймеров	Последовательность TagMan-зондов
<i>C677T MTHFR</i>	5'-ctgaagcactgaaggag-3' 5'-tcacaagcggaagaatg-3'	5'-R6G-ctgcgggagccgatttc-BHQ-3' 5'-FAM-ctgcgggagtcgatttc-BHQ-3'
<i>A1298C MTHFR</i>	5'-aggagctgctgaagatgtg-3' 5'-atcactcactttgtgaccattc-3'	5'-FAM-ccagtggaagaagtgtctttg-BHQ-3' 5'-R6G-ccagrgaagcaagtgtctttg-BHQ-3'
<i>A2756G MTR</i>	5'-ctatcttgctatttcagtggtcc-3' 5'-atctgtttctaccacttaccttgag-3'	5'-R6G-ctcataatggccctgtctaa-BHQ-3' 5'-FAM-ctcataatggctcctgtctaa-BHQ-3'
<i>A66G MTRR</i>	5'-ccttatcggtactactaatacagtg-3' 5'-tgaggaggtttctgttactatatgc-3'	5'-R6G-ttctcacacatttctct-BHQ-3' 5'-FAM-cttctcacatatttctct-BHQ-3'
<i>C1420T SHMT1</i>	5'-ccaggtgggtccagagtg-3' 5'-gagagactggcaggggataa-3'g	5'-R6G-cttcgcctctctctccctct-BHQ-3' 5'-FAM-cttcgcctctctctccctct-BHQ-3'
<i>G1958A MTHFD1</i>	5'-tccataccggtgaatgtgtggtc-3' 5'-ccaacaagcttgagtcgggtc-3'	-----
<i>844ins68 CBS</i>	5'-caggcacctgcctttacttctgag-3' 5'-ggttgctgctccgtctgggtc-3'	-----
<i>GSTM1</i>	5'-gtcaaggacatcatagacgagaa-3' 5'-ctcaggagaactgaagccaaa-3'	-----
<i>GSTT1</i>	5'-gctagttgctgaagtcctgctta-3' 5'-cttgccctcagaatgacct-3'	-----
<i>LTM</i>	5'-tgggtgctagaggtataatcg-3' 5'-ttagaggaagctgggtaagag-3'	-----

течение 38 циклов с денатурацией 10 с при 95 °С, отжигом праймеров 10 с при 63 °С и элонгацией 15 с при 72 °С. Финальную элонгацию проводили при 72 °С в течение 5 мин. Амплификационные продукты длиной (169 пар нуклеотидов, п. н.) обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *BmeI*81. Длины фрагментов, получаемых в результате гидролиза, составляли: 129 + 20 п. н. при генотипе *MTHFD1* G/G, 149 + 129 + 20 п. н. при генотипе *MTHFD1* G/A, 149 + 20 п. н. при генотипе *MTHFD1* A/A, 271 + 68 + 48 п. н. при генотипе *CBS* D/D, 339 + 271 + 68 + 48 п. н. при генотипе *CBS* D/I, 339 + 48 п. н. при генотипе *CBS* I/I. Анализ продуктов гидролиза проводили в 8%-м ПААГ, гель окрашивали бромистым этидием с визуализацией ДНК УФ-светом, затем фотографировали с помощью цифровой видеокамеры.

Полиморфные варианты генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* и *SHMT1* определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфной последовательности ДНК. ПЦР выполняли в конечном объеме 25 мкл, содержащем 65 мМ Tris-HCl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония, 3,5 мМ MgCl₂, 0,01%-й Tween 20, 0,2 мМ dNTP, 0,3 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров, 0,1 мкМ растворы TaqMan-зондов, 20–100 нг ДНК и 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Последовательности праймеров и TaqMan-зондов приведены в табл. 1. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе *iCycler iQ5* («Bio-Rad», США)

с начальной денатурацией при 96 °С 2 мин, далее в течение 42 циклов: 96 °С 8 с, затем 60 °С для *C677T MTHFR* и *C1420T SHMT1*, 58 °С для *A1298C MTHFR* и *A2756G MTR*, 56 °С для *A66G MTRR* в течение 40 с.

Амплификацию специфических участков генов *GSTM1* и *GSTT1* также проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Для исключения отсутствия флуоресцентного сигнала в связи с отсутствием ДНК или ингибированием ПЦР в реакционные смеси добавляли в качестве внутреннего контроля легкоплавкие праймеры (LTM). Структуры праймеров приведены в табл. 1. ПЦР выполняли в стандартном буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ KCl, 0,05 % Tween 20, 2,4 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, растворы праймеров (1 мМ LTM + 1 мМ *GSTM1* или 0,5 мМ LTM + 1 мМ *GSTT1*), 0,8x SYBR Green, 0,5–2 нг/мкл матрицы ДНК, 0,02 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Амплификацию осуществляли на ДНК-амплификаторе *iCycler iQ5* с применением методики hot-старт, при этом праймеры и dNTP с помощью парафина отделяли от ДНК и Taq-полимеразы. Реакционный объем составлял 25 мкл, каждая реакционная смесь была покрыта равным объемом минерального масла. ПЦР проводили при следующих условиях: для *GSTM1* – начальная денатурация 2 мин при 95 °С, далее 40 циклов при следующих условиях: денатурация 10 с при 95 °С, отжиг праймеров 10 с при 66,0 °С, элонгация 10 с при 72 °С, регистрация флуорес-

центного сигнала 10 с при 78 °С, затем 10 с при 85 °С; для *GSTT1* – начальная денатурация 2 мин при 95 °С, далее 10 циклов при следующих условиях: денатурация 10 с при 95 °С, отжиг праймеров 10 с при 66 °С, элонгация 10 с при 72 °С, затем 30 циклов при следующих условиях: денатурация 10 с при 95 °С, отжиг праймеров 10 с при 64 °С, элонгация 10 с при 72 °С, регистрация флуоресцентного сигнала 10 с при 78 °С, затем 10 с при 91 °С. Далее регистрировали кривые плавления: 60 циклов по 10 с с повышением температуры на 0,5 °С в каждом цикле – начальная температура составила 65 °С для *GSTM1* + LTM и 70 °С для *GSTT1* + LTM, регистрацию флуоресцентного сигнала производили в каждом цикле. Полученные результаты интерпретировали, исходя из анализа графиков накопления флуоресценции, специфичность оценивали с помощью кривой плавления. Накопление флуоресцентного сигнала происходило прямо пропорционально накоплению фрагментов ДНК, так как использовался интеркалирующий краситель SYBR Green – вещество, способное к значительному увеличению флуоресценции при связывании с двуцепочечной молекулой ДНК. При регистрации кривой плавления происходила денатурация двуцепочечных продуктов ПЦР и, соответственно, снижался уровень флуоресцентного сигнала, температура плавления составляла 78 °С для LTM, 85 °С для *GSTM1* и 91 °С для *GSTT1*.

Статистическая обработка данных. Частоты встречаемости аллелей и генотипов однонуклеотидных замен (SNPs) в генах фолатного цикла, делеционных генотипов *GSTT1* и *GSTM1* в выборке больных НХЗЛ сравнивали с таковыми в контрольной группе. Значимость различий оценивали с помощью критерия χ^2 , статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Соответствие контрольной выборки равновесию Харди – Вайнберга также проверяли с помощью критерия χ^2 . Для оценки величины относительного риска использовали отношение шансов (OR) с его доверительным интервалом (С. I.) при уровне доверия 95 %. Вычисления проводили с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Поиск публикаций для метаанализа осуществляли с помощью базы данных PubMed. При включении оригинальных исследований в метаанализ учитывали следующие критерии: а) исследование ассоциации одного из изучаемых SNP и НХЗЛ; б) дизайн эксперимента типа «case-control»; в) численность контрольной группы и группы пациентов с НХЗЛ не менее 150 человек; г) распределение генотипов в контрольной груп-

пе соответствует равновесию Харди – Вайнберга. Для метаанализа использовались значения OR и 95 % С. I. (редкий аллель против частый аллель).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании изучена роль генов системы фолатного цикла и второй фазы системы биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1* и *GSTT1*, имеющих доказанное функциональное значение. Данные полиморфные варианты, изменяя активность, стабильность или количество соответствующих ферментов, могли бы обусловить нарушение баланса между важнейшими метаболическими путями цикла фолиевой кислоты – синтезом dTMP и пуриновых нуклеотидов и метилированием ДНК, приводить к повреждению ДНК и, как следствие, злокачественной трансформации путем накопления большего количества активных метаболитов, обладающих мутагенными и канцерогенными свойствами, тем самым влияя на индукцию канцерогенных процессов.

Были определены частоты встречаемости аллелей и генотипов исследуемых полиморфных локусов у пациентов с НХЗЛ и у лиц контрольной группы. Распределение частот встречаемости генотипов соответствовало закону Харди – Вайнберга в группе контроля.

Для полиморфного локуса G1958A гена *MTHFD1* выявлена сильная ассоциация аллеля 1958A со сниженным риском развития ДВККЛ (OR = 0,429; С. I. [0,279–0,659], $p < 0,00008$, табл. 2), которая является наиболее частым гистологическим вариантом агрессивных НХЗЛ. Для индолентных лимфом ассоциации данного полиморфного локуса с риском развития НХЗЛ не обнаружено. Однонуклеотидная замена G1958A приводит к замене Arg653Gln в формилтетрагидрафолатсинтетазном домене фермента MTHFD и уменьшает его термостабильность и метаболическую активность [9]. Субстратом MTHFD является тетрагидрофолат, накопление которого может приводить к увеличению концентрации 5,10-метилтетрагидрофолата, что, в свою очередь, способно увеличивать эффективность синтеза тимидилата и метилирования ДНК, тем самым препятствуя злокачественной трансформации. К настоящему времени существует ряд исследований, указывающих на протективный эффект фолата (предшественника тетрагидрофолата) в отношении НХЗЛ [11, 12, 16]. Однако данных о связи полиморфного локуса G1958A *MTHFD1* с увеличением внутриклеточной концентрации тетрагидрофолата на сегодняшний день не обнаружено. В работе Christensen et al. [9]

Таблица 2

Анализ ассоциации полиморфных локусов *G1958A MTHFD1* и *C1420T SHMT1* с риском развития агрессивных лимфом

	Ассоциация аллелей			Ассоциация генотипов	
	<i>G1958A MTHFD1</i>				
	G, % (n)	A, % (n)	G/G, % (n)	G/A, % (n)	A/A, % (n)
Больные ДВККЛ (n = 54) и ККЛ (n = 27)	70 (76)	30 (32)	50 (27)	41 (22)	9 (5)
Контроль (n = 539)	50,5 (544)	49,5 (534)	26 (141)	49 (262)	25 (136)
OR	2,331	0,429	5,209	0,439	0,192
С. I.	1,517–3,584	0,279–0,659	1,949–3,918	0,241–0,798	0,072–0,513
p	0,00008	0,00008	0,0003	0,006	0,0003
	<i>C1420T SHMT1</i>				
	C, % (n)	T, % (n)	C/C, % (n)	C/T, % (n)	T/T, % (n)
Больные агрессивными лимфомами (n = 85)	61 (104)	39 (66)	40 (34)	42 (36)	18 (15)
Контроль (n = 504)	68 (689)	32 (319)	46 (231)	45 (227)	9 (46)
OR	0,730	1,371	0,451	1,077	2,215
С. I.	0,521–1,021	0,980–1,918	0,228–1,895	0,651–1,782	1,117–4,395
p	0,06	0,9	0,02	0,7	0,02

показана ассоциация аллеля 1958A со снижением эффективности синтеза пуриновых нуклеотидов, что могло бы, напротив, обусловить влияние полиморфного аллеля на увеличение риска онкологических заболеваний. В исследовании Wang L. et al. [21] обнаружена ассоциация генотипа 1958AA с риском рака желудка, что может быть обусловлено как раз эффектом данной замены. Вероятно, для одних видов неоплазий, в том числе индолентных НХЗЛ, процесс синтеза пуринов играет более существенную роль, чем синтез тимидилата и метилирование ДНК, для других же, например для агрессивных лимфом, важнее два последних процесса.

При анализе влияния аллелей и генотипов полиморфного локуса *C1420T* гена *SHMT1* на развитие НХЗЛ обнаружена ассоциация минорного Т-аллеля с повышенным риском развития агрессивных НХЗЛ на грани статистической значимости (OR = 1,371, С. I. [0,980–1,918], $p = 0,06$). Однако сочетание аллелей Т в гомозиготном Т/Т-генотипе обуславливает повышение риска развития агрессивных лимфом в 2,2 раза ($p < 0,02$), что говорит о суммации эффектов минорных аллелей (см. табл. 2). Фермент *SHMT1* имеет решающее значение в обеспечении метильными группами для синтеза пуринов, тимидилата и метионина, а также имеет другие метаболические функции. Однонуклеотидная замена *C1420T* в гене *SHMT1* приводит к замене лейцина на фенилаланин в 427 позиции (Leu427Phe), что приводит к уменьшению каталитической активности фермента и,

как следствие, снижению эффективности синтеза ДНК [14]. Данные по влиянию этой однонуклеотидной замены на внутриклеточный уровень фолатов противоречивы, так же как и сведения о ее влиянии на развитие разных видов неоплазий. Skibola et al. не наблюдали ассоциации *C1420T SHMT1* с развитием НХЗЛ [19]. Подобные результаты получены S. Niclot et al. на выборке пациентов с фолликулярной лимфомой и M. Berglund et al. у больных фолликулярной и диффузной В-крупноклеточной лимфомами в когорте шведских пациентов [8, 14]. Вместе с тем в исследовании, в которое были включены пациенты с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), лица, несущие *C1420T* аллель гена *SHMT1*, характеризовались снижением риска развития ОЛЛ [20].

Анализ остальных исследуемых локусов системы фолатного цикла ассоциации с агрессивными и индолентными НХЗЛ в выборке жителей г. Новосибирска не выявил.

Анализ частот генотипов генов второй фазы системы биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1* и *GSTT1* показал, что распределение нормальных и делеционных генотипов *GSTM1* и *GSTT1* в группах больных агрессивными лимфомами не отличалось и совпадало с популяционным. У пациентов с фолликулярными лимфомами 1-го и 2-го цитологического типов частота делеционного генотипа *GSTM1* составила 10/15 (67%), что почти в 2 раза больше, чем в группах больных агрессивными вариантами заболевания и контроле (табл. 3). Мутантный (делеционный)

Таблица 3

Распределение генотипов полиморфных локусов *GSTM1* и *GSTT1* в подгруппах агрессивных и индолентных неходжкинских злокачественных лимфом

Генотип	Контроль (n = 177), n (%)	ДВККЛ (n = 56), n (%)	ККЛ (n = 28), n (%)	ДВМКЛ (n = 17), n (%)	ФЛ (n = 15), n (%)	OR [95% С. I.]
<i>GSTM1</i> null	70 (40)	18 (32)	9 (32)	9 (53)	10 (67) *,#,^	3,06 [1,01–9,32]
<i>GSTM1</i> +	107 (60)	38 (68)	19 (68)	8 (47)	5 (33) *,#,^	0,33 [0,11–1,01]
<i>GSTT1</i> null	48 (27)	18 (32)	4 (14)	3 (18)	4 (27)	–
<i>GSTT1</i> +	129 (73)	38 (68)	25 (86)	14 (82)	11 (73)	–
<i>GSTM1</i> null/ <i>GSTT1</i> null	22 (12,5)	8 (14)	0 (0)	0 (0)	4 (27)	–
<i>GSTM1</i> +/ <i>GSTT1</i> +	73 (41,5)	28 (50)	14 (50)	3 (18)	5 (33)	–
<i>GSTM1</i> null/ <i>GSTT1</i> + и <i>GSTM1</i> +/ <i>GSTT1</i> null	82 (46)	20 (36)	14 (50)	14 (82)	6 (40)	–

Примечание. ДВМКЛ – диффузные В-мелкоклеточные лимфомы, ФЛ – фолликулярные лимфомы; обозначены статистически значимые отличия от величины соответствующего показателя: * – группы контроля ($p < 0,04$), # – пациентов с ДВККЛ ($p < 0,02$), ^ – пациентов с ККЛ ($p < 0,04$).

генотип *GSTM1* обуславливает повышение риска развития фолликулярной лимфомы в 3 раза (OR = 3,06, С. I. [1,01–9,32], $p < 0,039$), тогда как нормальный генотип *GSTM1* обладает протективным эффектом. Подобные результаты получены S. Nohaus et al., 2007, которые показали, помимо увеличения риска развития фолликулярных лимфом, что делеционный генотип *GSTM1* может модифицировать факторы, входящие в прогностические индекс FLIPI, приводя к более плохим результатам лечения у пациентов именно низкой группы риска [10]. Для ряда опухолей установлено увеличение частоты мутаций в гене апоптоза p53 у носителей делеции в генах глутатион-S-трансфераз [6, 7, 22]. Поскольку путем апоптоза элиминируются потенциально злокачественные клетки, результатом модификации гена p53 является значительное повышение вероятности развития злокачественных опухолей. Нарушение функции p53 в результате точечных мутаций, делеций, образования комплекса с другим клеточным регулятором или изменение внутриклеточной локализации приводит к утрате супрессивных свойств и стимулирует опухолевый процесс. Нарушения процессов апоптоза являются ключевыми в патогенезе развития индолентных лимфом в целом и фолликулярной лимфомы в частности [2]. Показано, что частота мутаций в гене p53 у пациентов с лимфомами меньше, чем у больных с солидными неоплазиями, но в то же время при фолликулярных лимфомах – несколько больше, чем при других вариантах НХЗЛ, в частности ДВККЛ, и достигает 16 % [5]. Вышесказанное может объяснять большую частоту делеционного генотипа *GSTM1* именно у пациентов с фолликулярной лимфомой.

Различий в подгруппах как агрессивных, так и индолентных лимфом между собой и в сравнении с контрольной группой по полиморфному локусу *GSTT1* не выявлено. Для всех групп неходжкинских злокачественных лимфом не обнаружено влияния сочетания нормальных и делеционных генотипов на риск развития, что может быть связано с нивелированием эффектов отдельных локусов в комбинации.

Одной из проблем широкого внедрения достижений предиктивной медицины является доказательство достоверности ассоциации определенного гена или полиморфизма с развитием заболевания, что нередко обусловлено небольшой выборкой пациентов и контроля. В связи с этим важным является проведение метаанализа, позволяющего увеличить статистическую мощность исследования и выявить дополнительные ассоциации. Нами выполнен метаанализ данных по генам фолатного цикла (для полиморфных локусов в генах *MTHFD1* и *CBS* метаанализ не проводился в связи с недостаточным количеством публикаций). С целью снижения вероятности учета исследований с возможными ошибками генотипирования в метаанализ включались только работы с выполнением закона Харди – Вайнберга в контрольной группе. Размеры объединенной выборки больных НХЗЛ колебались от 896 человек для полиморфного локуса A66G гена *MTRR* до 4176 пациентов для однонуклеотидной замены С677Т в гене *MTHFR*. В большинстве исследований, включая настоящее, отмечена ассоциация мутантного 2756G-аллеля *MTR* со сниженным риском развития НХЗЛ, и при расчете объединенного отношения шансов она оказалась статистически значимой (OR = 0,902; С. I. [0,821–0,991],

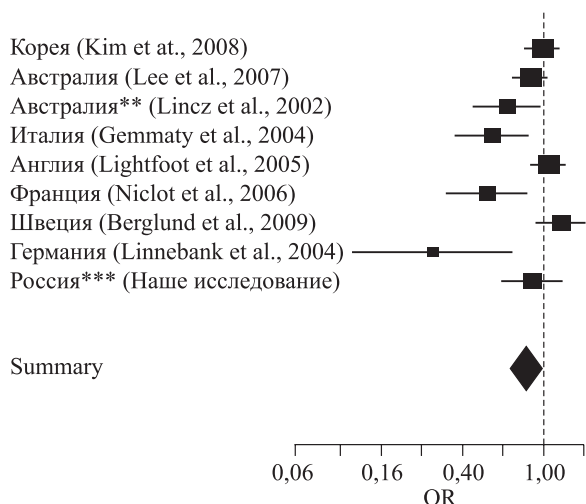


Рис. Форест-график для полиморфного локуса A2756G гена MTR. Размер объединенной выборки: большие – 2602 человека, контроль – 4756 человек

$p = 0,03$), что подтвердило вклад данной замены в предрасположенность к НХЗЛ (см. рисунок).

Ассоциация 2756G-аллеля со сниженным количеством гиперметилированных CpG-островков в составе генов-супрессоров опухоли была показана в работе M.F. Paz et al. [15]. Вероятно, мутантный аллель способствует активации генов-супрессоров опухоли, что обуславливает полученную ассоциацию, однако детальный механизм такого влияния данного аллеля в настоящее время остается неизученным.

Ни для одного из остальных полиморфных локусов не было выявлено ассоциации с НХЗЛ в объединенной выборке при выполнении мета-анализа. Стоит отметить, что для большинства полиморфных замен наблюдался большой разброс значений отношения шансов и 95%-го доверительного интервала между исследованиями, включенными в метаанализ. Вероятно, такие различия в результатах связаны с влиянием этнических особенностей выборок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование выявило ассоциацию полиморфного локуса G1958A гена MTHFD1 со снижением риска и C1420T гена SHMT1, напротив, с увеличением риска развития агрессивных НХЗЛ, в то время как подобной связи с риском развития индолентных лимфом не обнаружено. Носители делеции в гене GSTM1 имеют риск развития фолликулярной лимфомы. Полученные данные могут свидетельствовать о разном вкладе мутантных генотипов данных полиморфных локусов в образование агрессивных и индолентных лимфом. Таким образом, полиморфные локусы G1958A MTHFD1, C1420T SHMT1, ген GSTM1

могут рассматриваться как дополнительные молекулярные маркеры развития НХЗЛ. В то же время их разнонаправленное действие на возникновение лимфом может подтверждать сложное действие однонуклеотидных замен на лимфогенез, и в дальнейших исследованиях предстоит определить, имеют ли данные замены самостоятельные функциональные последствия или находятся в неравновесии по сцеплению с другими, еще не известными вариантами, которые ответственны за наблюдаемые ассоциации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб., 2009. 528 с.
2. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2007. 1120 с.
3. Воропаева Е.Н., Скворцова Н.В., Воевода М.И., Тарновский Р.В. Клиническое значение делеции гена CCR5 у больных неходжкинскими злокачественными лимфомами // Бюл. СО РАМН. 2011. 31. (2). 26–30.
4. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная генетика в клинической онкологии // Сиб. онкол. журн. 2004. 2–3 (10–11). 40–47.
5. Поспелова Т.И., Воропаева Е.Н., Воевода М.И., Березина О.В. Полиморфизм гена p53 как потенциальный маркер предрасположенности к развитию неходжкинских злокачественных лимфом // Гематол. трансфузиол. 2010. 55. (1). 11–17.
6. Agodi A., Barchitta M., Cipresso R. et al. Distribution of p53, GST, and MTHFR polymorphisms and risk of cervical intraepithelial lesions in Sicily // Int. J. Gynecol. Cancer. 2010. 20. (1). 141–146.
7. Avti P.K., Vaiphei K., Pathak C.M., Khanda K.L. Involvement of various molecular events in cellular injury induced by smokeless tobacco // Chem. Res. Toxicol. 2010. 2. (7). 1163–1174.
8. Berglund M., Enblad G., Turesson I. et al. Folate-metabolizing genes in lymphoma patients from Sweden // Scand. J. Immunol. 2009. 70 (4). 408–410.
9. Christensen K.E., Rohlicek C.V., Andelfinger G.U. et al. The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects // Hum. Mutat. 2009. 30. (2). 212–220.
10. Hohaus S., Mansueto G., Massini G. et al. Glutathione-S-transferase genotypes influence prognosis in follicular non-Hodgkin's Lymphoma // Leuk. Lymphoma. 2007. 48. (3). 564–569.
11. Koutros S., Zhang Y., Zhu Y. et al. Nutrients contributing to one-carbon metabolism and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes // Am. J. Epidemiol. 2008. 167 (3). 287–294.
12. Lim U., Schenk M., Kelemen L.E. et al. Dietary determinants of one-carbon metabolism and the risk of

- non-Hodgkin's lymphoma: NCI-SEER case-control study, 1998–2000 // *Am. J. Epidemiol.* 2005. 162 (10). 953–964.
13. Linet M.S., Pottern L.M. Familial aggregation of hematopoietic malignancies and risk of non-Hodgkin's lymphoma // *Cancer Res.* 1992. 52 (19). 5468–5473.
14. Niclot S., Pruvot Q., Besson C. et al. Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas // *Blood.* 2006. 108 (1). 278–85.
15. Paz M.F., Avila S., Fraga M.F. et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors // *Cancer Res.* 2002. 62 (15). 4519–4524.
16. Polesel J., Dal Maso L., La Vecchia C. et al. Dietary folate, alcohol consumption, and risk of non-Hodgkin lymphoma // *Nutr. Cancer.* 2007. 57. (2). 146–150.
17. Sabbatini E., Bacci F., Sagrasso C., Pileri S.A. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview // *Pathologica.* 2010. 102. (3). 83–87.
18. Segel G.B., Lichtman M.A. Familial (inherited) leukemia, lymphoma, and myeloma: an overview // *Blood Cells Mol. Dis.* 2004. 32. (1). 246–261.
19. Skibola C.F., Forrest M.S., Coppede F. et al. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma // *Blood.* 2004. 104. 2155–2162.
20. Skibola C.F., Smith M.T., Hubbard A. et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia // *Blood.* 2002. 99. 3786–3791.
21. Wang L., Ke Q., Chen W. et al. Polymorphisms of MTHFD, plasma homocysteine levels, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population // *Clin. Cancer Res.* 2007. 13. (8). 2526–2532.
22. Zhang Z., Deng X., Ren X., Zhang B. et al. Expression of mutant p53 and of the multidrug resistant proteins P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi correlated in colorectal adenocarcinoma // *Scand. J. Gastroenterol.* 2010. 45. (7–8). 925–934.

FOLATE CYCLE AND XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION SYSTEM GENES AS MARKERS OF DEVELOPMENT RISK OF NON-HODGKIN MALIGNANT LYMPHOMAS IN THE RESIDENTS OF NOVOSIBIRSK

Olga Valerievna BEREZINA¹, Aleksandra Sergeevna SHADRINA²,
Tatyana Ivanovna POSPELOVA¹, Maksim Leonidovich FILIPENKO²

¹ Novosibirsk State Medical University of Misdzrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

² Institute for Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentiev av., 8

Changes in folate cycle and xenobiotic biotransformation system genes may cause the different susceptibility to non-Hodgkin's lymphomas (NHL). In the present study the association between seven single nucleotide substitutions in the folate cycle genes and deletions in genes of glutathione-S-transferase M1 and T1 (*GSTM1* and *GSTT1*) with genetic risk of NHL was investigated. Association of 1958A-mutant allele with decreased aggressive lymphoma risk was revealed for polymorphic locus G1258A *MTHFD1* (OR = 0.578, CI [0.415–0.805], $p < 0.001$). The combination of mutant 1420T alleles in homozygous T/T-genotype of *SHMT1* gene may cause an increased aggressive lymphoma risk in 2.2 times ($p < 0.02$). The carriers of the mutant *GSTM1* genotype have increased follicular lymphoma risk (OR = 1.96, CI [1.072–3.581], $p < 0.02$). Thus, these polymorphic variants may play a role in the pathogenesis of NHL and be used in non-Hodgkin's lymphomas diagnosis.

Key words: non-Hodgkin's lymphoma, Diffuse B-cell lymphoma, follicular lymphoma, genes of biotransformation, folate cycle, polymorphism.

Berezina O.V. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for therapy, hematology and blood transfusiology, e-mail: ovberezina@mail.ru

Shadrina A.S. – senior assistant of the pharmacogenomic laboratory, e-mail: hamlet85@yandex.ru

Pospelova T.I. – doctor of medical sciences, professor, the head of the chair for therapy, hematology and transfusiology, e-mail: post_gem@mail.ru.

Filipenko M.L. – candidate of biological sciences, head of the pharmacogenomic laboratory, e-mail: max@niboch.nsc.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ TNF-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ В МОДЕЛИ КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА

Елена Алексеевна ВЯЗОВАЯ¹, Людмила Борисовна ТОПОРКОВА¹,
Ирина Павловна ГИЛЕВА², Мария Дондоковна ЦЫРЕНДОРЖИЕВА^{1,3},
Сергей Николаевич ЩЕЛКУНОВ², Ирина Анатольевна ОРЛОВСКАЯ¹

¹ ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

² ФГБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Новосибирская обл., наукоград Кольцово

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

Исследованы эффекты эпикутанных аппликаций рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы VARV-CtmB в модели контактного дерматита. Показано, что VARV-CtmB достоверно снижает индуцированную динитрохлорбензолом (ДНХБ) миграцию лейкоцитов (дендритных клеток/клеток Лангерганса) в афферентной фазе контактной реакции и показатель «величина отека уха» в эфферентной фазе контактной реакции. Известно, что при воспалении популяция пролиферирующих и мигрирующих клеток Лангерганса пополняется за счет рекрутирования костно-мозговых предшественников. Исследование костно-мозгового гемопоэза в модели контактного дерматита показало, что совместное эпикутанное нанесение ДНХБ + VARV-CtmB достоверно снижает ДНХБ-индуцированное повышение количества гранулоцитарно-макрофагальных колоний до уровня контрольных значений. Полученные результаты позволяют предполагать возможность использования для лечения воспалительных заболеваний кожи блокаторов TNF при их эпикутанном применении.

Ключевые слова: контактный дерматит, вирус натуральной оспы, костный мозг, гемопоэз, фактор некроза опухолей, TNF-связывающий белок.

В настоящее время в мире отмечается неуклонный рост частоты и распространенности воспалительных и аллергических заболеваний кожи: атопического и контактного дерматита, экземы, от которых в ряде стран страдает до 25 % населения. Хронические воспалительные заболевания кожи, в том числе контактные дерматиты, приводят к серьезным физическим и психологическим страданиям пациентов.

Аллергический контактный дерматит относится к реакциям замедленного типа и развивается в 2 этапа: в афферентной фазе аллерген проникают в кожу, захватывается резидентными

дендритными клетками (ДК) эпидермиса – клетками Лангерганса (КЛ), которые затем мигрируют в регионарные лимфатические узлы и индуцируют активацию специфических Т-клеточных предшественников. Многие авторы отмечают, что как у мышей, так и у человека в афферентной фазе контактной реакции в коже наблюдается резкое повышение концентрации провоспалительных цитокинов TNF, IL-1 β , IL-18; TNF является основным триггером воспалительной реакции кожи в ответ на контакт с повреждающим агентом [11, 18, 26]. Одновременно генерируются сигналы, которые рекрутируют клетки-предше-

Вязовая Е.А. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологии стволовой клетки, e-mail: viazovaia@mail.ru

Топоркова Л.Б. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологии стволовой клетки, e-mail: toporkova12@mail.ru

Гилева И.П. – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела геномных исследований и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов, e-mail: gileva@vector.nsc.ru

Цырендоржиева М.Д. – лаборант исследователь лаборатории иммунобиологии стволовой клетки и студент лечебного факультета, e-mail: mashats_lovely@mail.ru.

Щелкунов С.Н. – д.б.н., проф., зав. отделом геномных исследований и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов, e-mail: snshchel@vector.nsc.ru

Орловская И.А. – д.м.н., проф., зав. лабораторией иммунобиологии стволовой клетки, e-mail: irorl@mail.ru

ственники костно-мозгового происхождения в кожу для восполнения популяции ДК/КЛ [21, 23]. Вторая, эфферентная фаза контактной реакции, индуцируется повторным контактом кожи с антигеном (аллергеном), что приводит через 24–48 часов к быстрому рекрутированию специфических Т-лимфоцитов и развитию локальной воспалительной реакции. Эта реакция затем постепенно затухает при участии цитокинов IL-4 и IL-10 [10]. В мышинной модели контактной реакции на динитрохлорбензол (ДНХБ) эффекторными клетками являются цитотоксические Т-лимфоциты CD8+, которые пролиферируют во вторичных лимфоидных органах после его презентации ДК [27].

Блокада провоспалительных цитокинов с помощью моноклональных антител существенно снижает миграцию ДК в дренирующие лимфатические узлы и вызывает ослабление повреждений кожи [1, 12, 13]. Введение антител к TNF- α снижает повреждения кожи при дерматите и псориазе [14]. При псориазе и дерматитах высокий уровень TNF- α в коже индуцирует повышенную экспрессию матриксных металлопротеиназ (ММП), разрушающих базальную мембрану. Терапия с помощью моноклональных антител к TNF- α существенно снижает уровень ММП-9, уменьшает зуд и отечность [15]. Использование ингибиторов TNF актуально в лечении, например, тяжелых форм псориаза [25]. Представляется перспективным подход к лечению воспалительных заболеваний кожи с помощью блокаторов TNF при их эпикутанном применении.

Новый тип TNF-антагониста разрабатывается на основе рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы VARV-CrmB [3, 4]. В процессе эволюции вирус натуральной оспы освоил эффективные механизмы преодоления иммунологического барьера человека. В частности, вирусный геном детерминирует синтез секретлируемых белков, имеющих структурное сходство с клеточными рецепторами цитокинов. Вирусные белки функционируют как рецепторы, связывающие цитокины, блокируя, таким образом, их активность. Способность вирусных белков взаимодействовать с иммунной системой человека открывает перспективу их использования для разработки иммунокорригирующих терапевтических средств. В настоящее время продемонстрирована эффективная TNF-нейтрализующая активность VARV-CrmB *in vitro* и *in vivo* [2, 3, 6–9, 20].

Целью настоящего исследования является изучение эффектов рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы VARV-CrmB при эпикутанном воздействии в модели контактного дерматита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на мышах-самцах линии Balb/c массой 23–25 г. Животных выводили из эксперимента согласно правилам использования экспериментальных животных с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Модель экспериментального контактного дерматита вызывали аппликацией классического контактного аллергена динитрохлорбензола (ДНХБ), который широко используется для исследования различных звеньев течения аллергического дерматоза. Аппликации ДНХБ вызывают первично-контактную реакцию у лабораторных животных, которая разрешается на 2–3-й день, а на 6-е сутки возникает местное воспаление.

Рекомбинантный TNF-связывающий белок вируса натуральной оспы (VARV-CrmB) выделяли методом аффинной хроматографии из клеток насекомых линии SF21, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом, содержащим в своем геноме ген *G2R* вируса натуральной оспы штамма Garsia [2]. Чистоту и TNF-нейтрализующую активность рекомбинантного вирусного белка определяли как описано в работе [4].

Эпикутанную аппликацию 1 % ДНХБ (Fluka, Германия) и VARV-CrmB на дорзальную поверхность обеих ушей мышей в объеме 25 мкл/ухо проводили по M. Cumberbatch et al. [17]. VARV-CrmB в дозе 500 нг/мышь наносили спустя 30 мин после ДНХБ. Контрольной группе мышей апплицировали растворитель, смесь ацетона и оливкового масла (4:1).

Миграцию лейкоцитов из кожного эксплантата оценивали по методу С.Р. Larsen [22]. Эксплантаты готовили через 17 ч после однократной аппликации мышам раствора ДНХБ: животных забивали цервикальной дислокацией под эфирным наркозом, уши промывали 70%-м этанолом, отделяли дорзальную часть кожи уха и помещали дермальной стороной вниз в ячейку 12-луночного планшета с 1 мл полной культуральной среды. Образцы инкубировали в течение 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Затем отбирали среду в центрифужные пробирки, вносили в каждую лунку по 100 мкл культуральной среды с 0,25 % трипсином, инкубировали при 37 °С, после чего вносили по 200 мкл полной среды, смывали прилипшие клетки и объединяли с первой порцией клеток в центрифужных пробирках. Клетки концентрировали центрифугированием при 1500 об/мин и после осторожного удаления супернатанта

количество клеток, мигрировавших из одного уха, подсчитывали в камере Горяева. Суммарное количество клеток, мигрировавших из целого кожного лоскута (дорзальная поверхность уха) через 17 ч после аппликации ДНХБ, подсчитывали через 24 ч культивирования. Кроме того, в тесте с трипановым синим оценивали жизнеспособность мигрирующих клеток, которая составила 95–98 %. Клетки, прикрепившиеся к стеклу, анализировали с помощью световой микроскопии.

Для оценки влияния аппликативных воздействий ДНХБ + VARV-CrmB на клеточный иммунный ответ использовали метод «величина отека уха» (MEST) [19]. 50 мкл 1 % раствора ДНХБ в смеси ацетона и оливкового масла (4:1) наносили на межлопаточную область мышей Balb/c, где предварительно была выстрижена шерсть на участке площадью 1,5×1,5 см, в течение трех дней. Через 30 мин после аппликации аллергена на этот же участок кожи наносили 50 мкл раствора VARV-CrmB. Животным контрольной группы апплицировали растворитель (ацетон:оливковое масло). На 5-й день от начала аппликаций всем животным наносили 25 мкл 0,5 % ДНХБ на обе поверхности левого уха, на правое наносили такое же количество растворителя. Через 24, 48 и 72 ч измеряли толщину обеих ушей с помощью электронного штангенциркуля, за величину отека принимали разницу толщины левого и правого ушей для каждого животного. Пик реакции приходится на 48 ч после повторного воздействия. Индекс отека подсчитывали по формуле: $((s_l - s_r) \times 100) / s_r$, где s_l – толщина левого уха, s_r – толщина правого уха.

Определение количества коммитированных гемопоэтических предшественников проводили через 72 ч после троекратного апплицирования (в течение трех суток) 1 % раствора ДНХБ и ДНХБ+VARV-CrmB на дорзальную поверхность обоих ушей. Клетки костного мозга в концентрации $2,5 \times 10^4$ /мл инкубировали в метилцеллюлозной среде M3434 («Stem Cell Technology», Канада), содержащей цитокины SCF, EPO, IL-3, IL-6. Количество гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ), эритроидных (БОЕ-Э + КОЕ-Э) и гранулоцитарно-эритроцитарно-макрофагально-мегакариоцитарных (КОЕ-ГЭММ) колоний подсчитывали под микроскопом после 7–14-дневной инкубации при температуре 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Достоверность межгрупповых различий оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Все данные представлены в работе как среднее значение ± стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при эпикутанной аппликации ДНХБ происходит значительное (более чем четырехкратное) усиление миграционной активности лейкоцитов мышей (рис. 1). Нарушения эпидермального гомеостаза ведут к локальной продукции провоспалительных цитокинов с индукцией мобилизации КЛ/ДК в лимфоидную ткань. Усиление миграции лейкоцитов может быть связано с активацией резидентных гистиоцитов, КЛ, ДК, гранулоцитов, продуцирующих целый спектр хемотактических медиаторов, таких как лейкотриены С₄, В₄, D₄, интерлейкины (IL-1β, IL-6, IL-8 и др.), TNF и компоненты комплемента С_{3а}, С_{5а} [5].

Как видно из рис. 1, аппликативное воздействие VARV-CrmB в дозе 500 нг/мышь спустя 30 мин после ДНХБ достоверно (более чем в 2 раза) снижает миграционную активность ДК, вызванную ДНХБ. Полученные данные согласуются с опубликованными результатами с интрадермальным введением мышам rMu-TNF и rIL-1β, где наблюдали активацию миграции КЛ, которую отменяло применение соответствующих моноклональных антител [11]. Таким образом, исследуемый белок оказывает корректирующий эффект на показатель ДНХБ-индуцированной миграции лейкоцитов.

Для оценки влияния аппликативных воздействий ДНХБ + VARV-CrmB на клеточный иммунный ответ использовали метод «величина отека уха» (MEST). Установлено, что аппликации в течение трех дней ДНХБ вызывают 6-кратное увеличение выраженности отека уха, а эпикутанное нанесение VARV-CrmB после воздействия ДНХБ

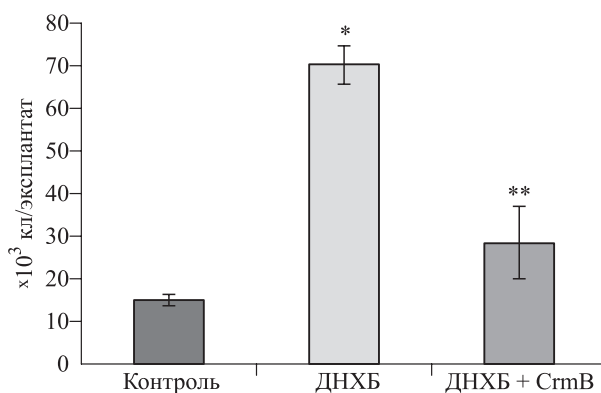


Рис. 1. Влияние VARV-CrmB на миграцию лейкоцитов из кожного лоскута в афферентной фазе контактной реакции на ДНХБ. Здесь и на рис. 2, 3 обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – в контроле, ** – при аппликации ДНХБ

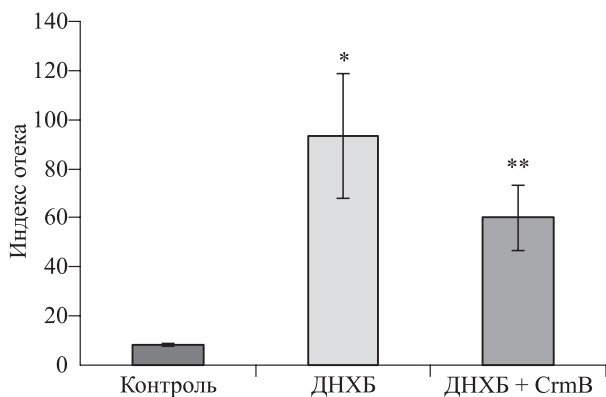


Рис. 2. Влияние VARV-CrmB на величину отека уха в эфферентной фазе контактной реакции на ДНХБ

на тот же участок кожи (межлопаточная область) достоверно снижает показатель «величина отека уха» в ответ на разрешающее воздействие ДНХБ, опосредуемое цитотоксическими Т-лимфоцитами CD8+ (рис. 2). Таким образом, аппликативное воздействие VARV-CrmB оказывает противовоспалительный эффект в модели контактной реакции на ДНХБ как в индуктивной, так и в продуктивной фазах, снижая интенсивность локальной воспалительной реакции.

Нанесение ДНХБ вызывает значительное повреждение кожи: в результате цитотоксического воздействия Т-лимфоцитов, направленного против кератиноцитов, эпидермис повреждается и образуется струп. Установлено, что при совместном нанесении ДНХБ и VARV-CrmB заживление раны и отторжение струпа наступает на 13–15 день, в среднем на 4–5 дней раньше, чем при изолированном применении ДНХБ.

Считается, что популяция КЛ кожи пополняется за счет рекрутирования костно-мозговых предшественников только в процессе воспаления [24]. Костно-мозговым источником КЛ являются миелоидные предшественники Flk2+ [23]. В работе исследовалось влияние накожных аппликаций VARV-CrmB на ДНХБ-индуцированные изменения колониеобразующей активности клеток костного мозга мышей. Определение количества коммитированных гемопоэтических предшественников проводили через 72 ч после троекратного апплицирования (в течение трех суток) ДНХБ и ДНХБ + VARV-CrmB (рис. 3).

Накожные аппликации ДНХБ не изменяют численность эритроидных колоний (БОЕ-Э + КОЕ-Э); нанесение VARV-CrmB спустя 30 мин после ДНХБ вызывает их недостоверное снижение. Воздействие ДНХБ приводило к статистически значимому увеличению количества КОЕ-ГМ, а его совместное с VARV-CrmB эпикутанное нанесение отменяло этот эффект,

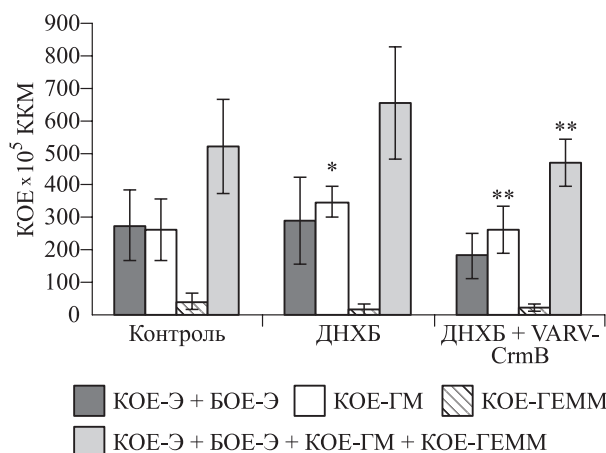


Рис. 3. Влияние ДНХБ и VARV-CrmB при эпикутанном способе воздействия на колониеобразующую активность клеток костного мозга (ККМ) мышей

достоверно снижая число гранулоцитарно-макрофагальных колоний до уровня контрольных значений. Численность КОЕ-ГЭММ достоверно снижается после аппликаций ДНХБ, что может свидетельствовать об истощении популяции ранних предшественников; воздействие исследуемого белка не приводило к изменению объема этой популяции. Суммарное количество колоний, недостоверно повышенное при аппликациях ДНХБ, статистически значимо снижалось при воздействии VARV-CrmB.

Увеличение количества костно-мозговых гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ) колоний может свидетельствовать о «включении» в костном мозге механизмов компенсаторного пополнения пула гранулоцитов-макрофагов и, соответственно, ДК. Вероятно, изменения колониеобразующей активности клеток костного мозга при эпикутанном воздействии ДНХБ могут быть обусловлены проникновением в костный мозг активированных ДК через лимфатическую и венозную циркуляцию. Хоминг дифференцированных ДК в костный мозг и их контакт с костно-мозговыми Т-клетками был подтвержден с помощью интравитального окрашивания и микроскопирования [16].

Таким образом, TNF-блокирующие свойства VARV-CrmB продемонстрированы в модели контактного дерматита: VARV-CrmB оказывает корригирующие эффекты в отношении показателей, характеризующих афферентную и эфферентную фазы развития контактной реакции, и колониеобразующей способности гемопоэтических предшественников. Полученные результаты позволяют предполагать возможность использования для лечения воспалительных заболеваний кожи блокаторов TNF при их эпикутанном применении.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (гос. контракт 02.740.11.0485) и РФФИ (грант 10-04-00387а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинов В.М., Щелкунов С.Н., Сандахчиев Л.С. Возможный молекулярный фактор, обуславливающий генерализацию инфекции вирусом натуральной оспы // Докл. РАН. 1993. 328. (1). 109–111.
2. Гилева И.П., Рязанкин И.А., Непомнящих Т.С. и др. Экспрессия генов TNF-связывающих белков ортопоксвирусов в клетках насекомых и изучение свойств рекомбинантных белков // Молек. биол. 2005. 39. (2). 245–254.
3. Гилева И.П., Малкова Е.М., Непомнящих и др. Изучение действия TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы на развитие ЛПС-индуцированного эндотоксического шока // Цитокины и воспаление. 2006. (1). 44–48.
4. Гилева И.П., Непомнящих Т.С., Рязанкин И.А., Щелкунов С.Н. Рекомбинантный TNF-связывающий белок вируса натуральной оспы как потенциальный TNF-антагонист нового поколения // Биохимия. 2009. 74. (12). 1664–1671.
5. Маянский Д.Н. Лекции по клинической патологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 464 с.
6. Орловская И.А., Цырендоржиев Д.Д., Топоркова Л.Б. и др. Биологические эффекты рекомбинантного белка вируса натуральной оспы, связывающего фактор некроза опухолей // Медицинская иммунология. 2012. 14. (1–2). 33–42.
7. Цырендоржиев Д.Д., Сенников С.В., Вязовая Е.А. и др. Влияние рекомбинантного tnf-связывающего белка вируса натуральной оспы на миграционную и окислительно-метаболическую функцию лейкоцитов крови мышей при эпикутанной аппликации TNF // Бюл. СО РАМН. 2011. 31. (3). 73–79.
8. Цырендоржиев Д.Д., Сенников С.В., Орловская И.А. и др. Влияние TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы на TNF-индуцированную окислительно-метаболическую активность и продукцию IL-1 β и IL-6 мононуклеарными клетками здоровых доноров // Иммунология. 2011. 32. (4). 209–213.
9. Цырендоржиев Д.Д., Сенников С.В., Орловская И.А. и др. Эффективность рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы в модели коллаген-индуцированного артрита // Медицинская иммунология. 2013. 15. (6). 513–524.
10. Akiba H., Kehren J., Ducluzeau M.-T. et al. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic

cells inducing keratinocyte apoptosis // J. Immunol. 2002. 68. 3079–3087.

11. Antonopoulos C., Cumberbatch M., Mee J.B. et al. IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis // J. Leukoc. Biol. 2008. 83. 361–367.

12. Bodmer J.L., Schneider P., Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily // Trends Biochem. Sci. 2002. 27. 19–26.

13. Borysenko C.W., Furey W.F., Blair H.C. Comparative modeling of TNFRSF25 (DR3) predicts receptor destabilization by a mutation linked to rheumatoid arthritis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. 328. 794–799.

14. Boyce B.F., Li P., Yao Z. et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption // Keio J. Med. 2005. 54. 127–131.

15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. 72. 248–254.

16. Cavanagh L.L., Bonasio R., Mazo I.B. et al. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells // Nat. Immunol. 2005. 6. (10). 1029–1037.

17. Cumberbatch M., Dearman R.J., Griffiths C.E.M., Kimber I. Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens // APMIS. 2003. 111. 797–804.

18. Enk A.H., Katz S.I. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. 89. 1398–1402.

19. Garrigue J.L., Nicolas J.F., Fraguinals R. et al. Optimization of the mouse ear swelling test for in vivo and in vitro studies of weak contact sensitizers // Contact Dermatitis. 1994. 30. 231–237.

20. Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V. et al. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different // Biochim. Biophys. Acta. 2006. 1764. (11). 1710–1718.

21. Jakob T., Ring J., Udey M.C. Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin // J. Allergy Clin. Immunol. 2001. 108. (5). 688–696.

22. Larsen C.P., Steinman R.M., Witmer-Pack M. et al. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants // J. Exp. Med. 1990. 172. 1483–1493.

23. Mende I., Karsunky H., Weissman I.L. et al. Flk2+ myeloid progenitors are the main source of Langerhans cells // Blood. 2006. 107. (4). 1383–1390.

24. Merad M., Manz M.G., Karsunsky H. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions // Nat. Immunol. 2002. 3. 1135–1141.

25. *Quaglino P., Ortoncelli M., Comessatti A. et al.* Circulating CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺ T cells are up-regulated by biological therapies and correlate with the clinical response in psoriasis patients // *Dermatology*. 2009. 219. 250–258.

26. *Wang B., Fujisawa H., Zhuang L. et al.* Depressed Langerhans cell migration and reduced contact

hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75 // *J. Immunol.* 1997. 159. 6148–6155.

27. *Wang B., Fujisawa H., Zhuang L. et al.* CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity // *J. Immunol.* 2000. 163. 6783–6788.

STUDY OF THE EFFECTS OF RECOMBINANT TNF-BINDING VARIOLA VIRUS PROTEIN IN MODEL OF CONTACT DERMATITIS

**Elena Alekseevna VYAZOVAYA¹, Lyudmila Borisovna TOPORKOVA¹,
Irina Pavlovna GILEVA², Maria Dondokovna TSYRENDORZHIEVA^{1,3},
Sergei Nikolaevich SHCHELKUNOV², Irina Anatolyevna ORLOVSKAYA¹**

¹ *Institute of Clinical Immunology of SB RAMS
630099, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14*

² *Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor
630559, Novosibirsk region, Koltsovo*

³ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

The effects of applications of recombinant TNF-binding variola virus protein VARV-CrmB in model of contact dermatitis have been investigated. It is shown that VARV-CrmB significantly reduces dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced migration of leukocytes (dendritic cells/Langerhans cells) in the afferent phase of contact reaction and the indicator «value ear edema» in the efferent phase of contact reaction. It is known that during inflammation population of proliferating and migrating Langerhans cells replenished by recruitment of bone marrow precursors. Study of bone marrow hematopoiesis in contact dermatitis model showed that the coapplication of DNCB+VARV-CrmB significantly reduced DNCB-induced increase in the number of granulocyte-macrophage colony up to control values. The obtained results suggest the possibility of use of TNF blockers by application in the treatment of inflammatory diseases of the skin.

Key words: contact dermatitis, variola virus, hemopoiesis, bone marrow, tumor necrosis factor, TNF-binding protein.

Viazovaia E.A. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of stem cell immunobiology, e-mail: viazovaia@mail.ru

Toporkova L.B. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of stem cell immunobiology, e-mail: toporkova12@mail.ru

Gileva I.P. – doctor of biological sciences, leading researcher of department of genomic research and development of methods of DNA diagnosis of poksviruses, e-mail: gileva@vector.nsc.ru

Tsyrendorzhieva M.D. – laboratory assistant researcher of laboratory of stem cell immunobiology and student of medical faculty, e-mail: mashats_lovely@mail.ru

Shchelkunov S.N. – doctor of biological science, head of department of genomic research and development of methods of DNA diagnosis of poksviruses, e-mail: snschel@vector.nsc.ru

Orlovskaya I.A. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of stem cell immunobiology, e-mail: irorl@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ДЕКОРИНА В ГЕТЕРОТОПИЧЕСКОМ ЭНДОМЕТРИИ ПРИ ДВУХ ФОРМАХ ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

**Игорь Олегович МАРИНКИН¹, Светлана Владимировна АЙДАГУЛОВА¹,
Юлия Сергеевна ТИМОФЕЕВА¹, Сергей Алексеевич АРХИПОВ²,
Виталий Михайлович КУЛЕШОВ¹, Галина Александровна АВДИЮК¹,
Светлана Геннадьевна КУЧЕРЕНКО¹, Людмила Анатольевна ПИВЕНЬ¹**

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

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

Цель исследования – изучить экспрессию протеогликана декорина при двух формах генитального эндометриоза. Материал и методы: 49 образцов операционного материала 14 пациенток с эндометриоидным поражением яичников и 3 с аденомиозом, двухшаговый стрептавидин-биотиновый метод. Продемонстрирована статистически значимо более выраженная экспрессия декорина в клеточных элементах цитогенной стромы при эндометриоидном поражении яичников по сравнению с образцами аденомиоза ($p < 0,0001$) и эндометриоидных кист на фоне применения комбинированных оральных контрацептивов в течение 6 мес. перед операцией. Достоверных различий в экспрессии декорина в фиброзной строме эндометриоидных гетеротопий при двух формах генитального эндометриоза не обнаружено.

Ключевые слова: эндометриоидное поражение яичников, аденомиоз, декорин, иммуногистохимия, автоматический анализ изображения.

Эндометриоидная болезнь характеризуется доброкачественным разрастанием за пределами полости матки ткани, по морфологическим и функциональным свойствам подобной эндометрию. Заболевание отличается чрезвычайно вариабельной клинической картиной; тактика ведения больных эндометриозом зависит от возраста пациенток, формы и стадии заболевания, репродуктивных задач и других факторов [1], и в большинстве случаев процесс рецидивирует. Эндометриоидная болезнь имеет фундаментальные аналогии с опухолевым ростом: активация ангиогенеза, склонность гетеротопий к инвазивному росту и метастазированию [4], что направляет вектор исследований к изучению ремоделирования соединительной ткани, в том числе компонентов экстрацеллюлярного матрикса, выполняющих множество сигнальных функций.

Один из них – декорин, член небольшого семейства мелких протеогликанов, богатых лейцином и содержащих дерматансульфат, с широким «репертуаром» связывания: во-первых, локализуясь во внеклеточном матриксе соединительной ткани, он взаимодействует с коллагенами I и II типа, ингибируя образование коллагеновых фибрилл, что приводит к их истончению. Во-вторых, декорин взаимодействует с факторами роста, в том числе суперсемейством лигандов трансформирующего фактора роста β [5]. В микроокружении опухоли стромальный декорин непосредственно связывает несколько рецепторных тирозинкиназ, которые часто избыточно экспрессируются в опухолевых клетках [7].

Повышенная экспрессия декорина продемонстрирована в образцах злокачественных опухолей, например, колоректальной карциномы [9].

Маринкин И.О. – д.м.н., проф., зав. кафедрой акушерства и гинекологии, ректор

Айдагулова С.В. – д.б.н., проф., зав. лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ЦНИЛ, e-mail: a_sv@ngs.ru

Тимофеева Ю.С. – студентка 6-го курса лечебного факультета

Архипов С.А. – д.б.н., зав. лабораторией цитологии и клеточных культур

Кулешов В.М. – д.м.н., проф., проф. кафедры акушерства и гинекологии

Авдиюк Г.А. – к.м.н., ассистент кафедры акушерства и гинекологии

Кучеренко С.Г. – к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии

Пивень Л.А. – к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии

Это свойственно и некоторым доброкачественным образованиям с выраженной фиброзной реакцией, например, миоме матки, также отличающейся повышенной экспрессией декорина [3]. Другие новообразования, такие как аденокарцинома яичников [6], характеризуются пониженной экспрессией декорина.

Поскольку эндометриоподобная ткань имеет определенные аналогии с опухолевой и в связи с возрастанием экспрессии ряда протеогликанов и ферментов их метаболизма при злокачественном процессе, прямо коррелирующим с метастазированием (например, при аденокарциноме предстательной железы [2, 8]), нами изучена экспрессия декорина в различных тканевых компартаментах при двух формах генитального эндометриоза.

Цель работы – изучить характер экспрессии декорина при эндометриоидном поражении яичников и при аденомиозе на основе иммуногистохимического анализа операционного материала эндометриоидных гетеротопий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено клинко-патоморфологическое исследование 14 пациенток с эндометриоидным поражением яичников и 3 – с аденомиозом (с акцентом на изучении экспрессии декорина в эу- и гетеротопических фокусах эндометрия). Возраст пациенток с эндометриоидным поражением яичников варьировал от 21 до 47 лет ($27,7 \pm 5,2$ года), при этом 13 женщин из 14 были не старше 35 лет. Возраст 3 пациенток с аденомиозом составлял от 41 года до 46 лет ($43,8 \pm 1,8$ года).

Образцы стенок эндометриоидных кист (38) и очагов аденомиоза (11) фиксировали в 4 % параформальдегиде, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по ван Гизону. Экспрессию декорина исследовали на парафиновых срезах толщиной 5 мкм с помощью двухшагового стрептавидин-биотинового метода, в качестве первичных антител использовали мышиные моноклональные антитела (anti-human) к декорину («Abnova», США) в разведении 1:200; продукты реакции визуализировали с помощью диаминобензида (DAB). В качестве негативного контроля использовали срезы без первичных антител, в качестве позитивного контроля – препараты аденокарциномы предстательной железы. Площадь интра- и экстрацеллюлярных продуктов иммуногистохимической реакции оценивали с помощью микроскопа Axio Scope.A1 с фотокамерой AxioCam MRc5 и программного обеспечения ZEN blue (Zeiss, Германия), для каждого параметра оценивали по 20 изображений суммарной площадью 1025 мм².

Для оценки равенства дисперсий между выборками применяли критерий Фишера. Для сравнительной оценки количества DAB-позитивных продуктов реакции на срезах между группами применяли критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аденомиоз. Все 3 пациентки предъявляли жалобы на нарушение овариально-менструального цикла в виде меноррагии и на тянущие боли внизу живота. В гинекологическом анамнезе у пациенток: медицинские аборт (от 6 до 13), хронический сальпингит, миома тела матки (в двух случаях одиночная и в одном симптомная множественная), патология эндометрия (в двух случаях железисто-кистозная гиперплазия и в одном полипоз); у всех женщин диффузная мастопатия по фиброному типу. Одна пациентка перенесла оперативное лечение в объеме тубэктомии по поводу внематочной беременности и диатермоэлектрокоагуляцию эрозии шейки матки. В двух случаях было двое самопроизвольных срочных родов, в одном – оперативное родоразрешение. У всех пациенток диагностирована анемия средней и легкой степени тяжести.

При ультразвуковом исследовании обнаружены эхоскопические признаки внутреннего эндометриоза. Оперативное лечение проводили в плановом порядке: в двух случаях – надвлагалищную ампутацию, в одном – простую экстирпацию матки. На основании клинического обследования, интраоперационных данных и послеоперационного гистологического исследования, во всех трех случаях диагностирован аденомиоз, диффузная форма, 2-я стадия.

Эндометриоз яичников. У 11 (78,6 %) пациенток с эндометриоидным поражением яичников в анамнезе отсутствовали беременности. В структуре жалоб преобладали болевой синдром (5 больных, 35,7 %) и диспареуния (4 женщины, 28,6 %); лишь одна пациентка жалоб не предъявляла. Нарушения овариально-менструального цикла (гиперполименорея, дисменорея) отмечали 3 (21,4 %) пациентки. Инфекции, передаваемые половым путем, были в анамнезе у 6 (42,9 %) больных. Уровень СА-125 определяли у 4 женщин, и у 1-й из них содержание данного онкомаркера превысило референсное значение, составив 59,0 Ед/л.

При ультразвуковом исследовании во всех случаях были обнаружены кисты, соответствующие ультразвуковым критериям эндометриоидных; у 9 (64,3 %) женщин – признаки воспали-

тельного процесса в органах малого таза; у трех пациенток верифицирована миома тела матки клинически значимых размеров, что в одном клиническом наблюдении определило объем хирургического вмешательства. Патология яичников установлена у трех пациенток: у двух – ретенционные кисты и у одной – киста яичника. Патология эндометрия выявлена у трех пациенток: у двух – полип эндометрия и у одной – железисто-кистозная гиперплазия эндометрия.

Монофазные низкодозированные комбинированные оральные контрацептивы (КОК) в течение 6 мес. до операции применяли 4 (28,6 %) пациентки и одна в течение 5 мес. – диеногест. Оперативное вмешательство выполняли в плановом порядке, в пролиферативную фазу менструального цикла: 13 пациенткам осуществили вылущивание эндометриоидных кист лапароскопическим доступом, одной женщине операция проведена через лапаротомный доступ по Пфаннештилю в объеме надвлагалищной ампутации матки и аднексэктомии слева. Дополнительно, по показаниям, в 12 (92,3 %) случаях были выполнены адгезиолизис, в 5 (38,5 %) – коагуляция эктопических очагов, в 2 (15,4 %) – консервативная миомэктомия, одной пациентке проведена цистэктомия. Прходимость маточных труб интраоперационно посредством хромосальпингоскопии определена 6 (46,2 %) женщинам.

В целом эндометриоз яичников 2-й степени был установлен у 6 (42,9 %), эндометриоз яичников 3-й степени – у 8 (57,1 %) пациенток. При этом эндометриоз брюшины углублений малого таза выявлен у 11 (78,6 %) женщин, наружный экстраперитонеальный эндометриоз ретроцервикальной локализации 2-й степени – у 1-й пациентки. Спаечный процесс в малом тазу отмечен во всех клинических наблюдениях.

Иммуногистохимическое исследование операционного материала. При аденомиозе в эутопическом эндометрии DAB-позитивные продукты иммуногистохимической реакции на декорин (таблица) выявлялись преимущественно интрацеллюлярно, в небольшом числе клеточных элементов, диффузно инфильтрирующих субэпителиальную строму; кроме того, отмечено незначительное DAB-позитивное окрашивание коллагеновых фибрилл. В гетеротопическом эндометрии, локализованном в толще миометрия, экспрессия декорина имела исключительно интрацеллюлярный характер – в одиночных клеточных элементах цитогенной стромы и многочисленных клетках очаговых, в основном достаточно плотных, субэпителиальных мононуклеарных клеточных инфильтратов. Одиночные «меченные» декорином клетки (лимфоциты) мигрирова-

ли в эпителий гетеротопических эндометриальных желез. В приуроченной к цитогенной строме фиброзной ткани экспрессия декорина имела ассоциированный с коллагеновыми волокнами характер, в том числе периваскулярный.

В отличие от эндометриоидных гетеротопических очагов в миометрии при аденомиозе, цитогенная строма в эндометриоидных кистах яичников характеризовалась более значительной экспрессией декорина с интрацеллюлярной концентрацией продуктов реакции. Важно отметить, что в образцах операционного материала пациенток, принимавших перед операцией КОК, экспрессия декорина в цитогенной строме была не столь значительна, но достоверно снижена ($p = 0,047$) (см. таблицу), по-видимому, в том числе за счет уменьшения «клеточности» цитогенной стромы.

В стенках эндометриоидных кист яичников, с присущей им значительной долей фиброзной ткани, имела место почти диффузная экстрацеллюлярная экспрессия декорина с усилением концентрации продуктов реакции в периваскулярных зонах с большим числом крупных матрикс-продуцирующих клеток; при этом параметры фиброзной компоненты не имели значимых различий в зависимости от применения КОК, имея тенденцию к возрастанию численных показателей. Выраженность экспрессии декорина в периэндометриальной фиброзной ткани при аденомиозе статистически значимо не отличалась от средней площади DAB-позитивных продуктов фиброзной ткани, прилежащей к гетеротопическому эндометрию в эндометриоидных кистах яичников (см. таблицу).

Таким образом, в образцах овариальных эндометриоидных кист при эндометриозе яичников 2-й и 3-й степени с помощью иммуногистохимического исследования парафиновых срезов продемонстрирована более выраженная экспрессия декорина в клеточных элементах цитогенной стромы и экстрацеллюлярном матриксе, чем в образцах аденомиоза; достоверных различий между величинами показателя в фиброзной строме эндометриоидных гетеротопий при двух формах генитального эндометриоза не обнаружено.

Декорин принадлежит к классу сигнальных молекул, контролирующих широкое разнообразие процессов, и поэтому рассматривается как потенциальная противоопухолевая молекула и терапевтическая мишень [5]. Например, поскольку установлено сниженное содержание декорина в плазме крови у пациентов с плоскоклеточной карциномой пищевода, его предлагают использовать в качестве нового биомаркера для диагностики и прогноза этой формы злокачественного опухолевого процесса [10].

Таблица

Морфометрический анализ ДАВ-позитивной экспрессии декорина в эндометриоидных гетеротопиях (% площади) при генитальном эндометриозе ($M \pm SD$)

Локализация	Субэпителиальная цитогенная строма	Фиброзная строма
Аденомиоз		
Эутопический эндометрий	6,20 ± 2,28 ¹	–
Гетеротопический эндометрий	3,22 ± 1,62 ^{1,4}	18,01 ± 3,36 ⁵
Эндометриоидные кисты яичников		
Гетеротопический эндометрий	10,35 ± 2,27 ^{2,4}	20,79 ± 4,40 ^{3,5}
Гетеротопический эндометрий на фоне КОК	8,55 ± 3,16 ²	23,57 ± 4,61 ³

Примечание. M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение. Показатели достоверности различий при попарном сравнении: ¹ – $p = 0,000028$, ² – $p = 0,047$, ³ – $p = 0,055$, ⁴ – $p = 0,000001$, ⁵ – $p = 0,066$.

С помощью молекулярных механизмов секвестрации факторов роста или непосредственно через антагонизм рецепторных тирозинкиназ декорин участвует в подавлении ангиогенеза и ослаблении пролиферации и миграции опухолевых клеток, что позволяет рассматривать его как «стража» экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани из-за способности нивелировать проонкогенные сигналы [6, 7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с помощью иммуногистохимического исследования парафиновых срезов операционного материала нами исследован характер экспрессии одного из компонентов экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани – декорина – в цитогенной строме и приуроченной к ней фиброзной ткани при двух формах генитального эндометриоза. Полученные данные демонстрируют определенные количественные и качественные различия в локализации изученного протеогликана, что согласуется с представлениями о разном патогенезе эндометриоидного поражения яичников и аденомиоза. Статистически значимые различия в интрацеллюлярной экспрессии декорина при изученных формах генитального эндометриоза, по-видимому, могут свидетельствовать о неоднозначной патогенетической роли клеточных элементов цитогенной стромы в развитии отдельных форм заболевания, что требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян Л.В., Андреева Е.Н. Роль современной гормонмодулирующей терапии в комплексном

лечении генитального эндометриоза // Проблемы репродукции. 2011. (6). 66–77.

2. Кунин И.С., Бобоев М.М., Куценко О.С. и др. Молекулярные маркеры метастазирования аденокарциномы предстательной железы // Онкоурология. 2012. (4). 44–48.

3. Berto A.G., Sampaio L.O., Franco C.R. et al. A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium // Biochim. Biophys. Acta. 2003. 1619. 98–112.

4. Bondza P.K., Maheux R., Akoum A. Insights into endometriosis-associated endometrial dysfunctions: A review // Front. Biosci. 2009. 1. 415–428.

5. Iozzo R.V., Sanderson R.D. Proteoglycans in cancer biology, tumor microenvironment and angiogenesis // J. Cell. Mol. Med. 2011. 15. (5). 1013–1031.

6. Nash M.A., Deavers M.T., Freedman R.S. The expression of decorin in human ovarian tumors // Clin. Cancer Res. 2002. 8. (6). 1754–1760.

7. Neill T., Schaefer L., Iozzo R.V. Decorin: a guardian from the matrix // Am. J. Pathol. 2012. 181. (2). 380–387.

8. Suhovskih A.V., Mostovich L.A., Kunin I.S. et al. Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer // ISRN Oncol. 2013. 2013. ID 680136.

9. Tsara M.E., Theocharis A.D., Theocharis D.A. Compositional and structural alterations of proteoglycans in human rectum carcinoma with special reference to versican and decorin // Anticancer Res. 2002. 22. (5). 2893–2898.

10. Wu I.-C., Wu D.-C., Huang C.-C. et al. Plasma decorin predicts the presence of esophageal squamous cell carcinoma // Int. J. Cancer. 2010. 127. 2138–2146.

PECULIARITIES OF DECORIN EXPRESSION IN HETEROTOPIC ENDOMETRIUM AT TWO FORMS OF GENITAL ENDOMETRIOSIS

**Igor Olegovich MARINKIN¹, Svetlana Vladimirovna AIDAGULOVA¹,
Yuliya Sergeevna TIMOFEEVA¹, Sergei Alekseevich ARKHIPOV¹,
Vitaly Mikhailovich KULESHOV², Galina Aleksandrovna AVDIYUK²,
Svetlana Gennad'evna KUCHERENKO², Lyudmila Anatol'evna PIVEN²**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

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

To study the expression of dermatan sulfate proteoglycan decorin in two forms of genital endometriosis. Material and methods: 49 samples of surgical specimens of 14 patients with ovarian endometriosis and 3 women with adenomyosis; immunohistochemical two-step streptavidin-biotin method. The statistically significant more pronounced expression of dermatan sulfate proteoglycan decorin in the cellular elements of cytogenic stroma was demonstrated compared with samples of adenomyosis ($p < 0.0001$), and samples of endometrial cysts in women using combined oral contraceptives for 6 months before surgery. No significant differences in the expression of decorin in the endometrioid fibrous stroma of two forms of genital endometriosis were found.

Key words: ovarian endometriosis, adenomyosis, decorin, immunohistochemistry, automatic image analysis.

Marinkin I.O. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for obstetrics and gynecology, rector

Aidagulova S.V. – doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory for cellular biology and fundamental basis of reproduction, e-mail: a_sv@ngs.ru

Timofeeva Yu.S. – 6-year student of the chair for general medicine

Arkhipov S.A. – doctor of biological sciences, head of the laboratory for cytology and cell cultures

Kuleshov V.M. – doctor of medical sciences, professor of the chair for obstetrics and gynecology

Avdiyuk G.A. – candidate of medical sciences, professor assistant of the chair for obstetrics and gynecology

Kucherenko S.G. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair for obstetrics and gynecology

Piven L.A. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair for obstetrics and gynecology

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ В УСЛОВИЯХ ПРЕДГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКИ ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Игорь Олегович МАРИНКИН¹, Давид Львович НЕПОМНЯЩИХ²,
Виталий Михайлович КУЛЕШОВ¹, Наталия Александровна ИЛИЗАРОВА¹,
Татьяна Олеговна СЕМЧЕНКО¹, Светлана Владимировна АЙДАГУЛОВА¹

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

² ФГБУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С целью изучения динамики ультраструктурных изменений эпителиоцитов эндометрия в условиях предгравидарной подготовки при привычном невынашивании беременности исследованы 63 образца цуг-биоптатов эндометрия пациенток репродуктивного возраста с недостаточностью среднелютеиновой фазы цикла с помощью световой и электронной микроскопии. Установлено, что предгравидарная циклическая гормонотерапия (1 мг 17β-эстрадиола и 20 мг дидрогестерона) по сравнению с монотерапией 20 мг дидрогестерона в течение 3 мес. индуцирует внутриклеточную регенерацию и реализацию секреторного фенотипа эпителиоцитов эндометрия, соответствующего статусу рецептивности с «открытым окном имплантации».

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, рецептивность эндометрия, гормонотерапия, ультраструктура.

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) – мультифакторная патология у женщин репродуктивного возраста, лечение которой представляет большие трудности [1, 3, 4]. В большинстве случаев прерывание беременности при ПНБ обусловлено неадекватной реакцией на эндогенный прогестерон и нарушением секреторной трансформации эндометрия, что приводит к нарушению его рецептивности.

В патогенезе ПНБ большая роль отводится хроническому эндометриту, имеющему для нарушения имплантации и последующего отторжения плодного яйца не меньшее значение, чем дефицит прогестерона [11]. Слабую рецепторную чувствительность эндометрия при сохранении нормального уровня гормонов связывают с очень широкой распространенностью хронических инфекционных и воспалительных процессов, сопровождающихся высоким содержанием цитотоксичных клеток CD16+ и CD56+ и вырабаты-

ваемых ими провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, способствуют активации протромбиназы с последующими тромбозами и инфарктами плаценты [5, 8]. При исключении всех указанных причин ПНБ, а также хромосомных аномалий плода, остаются идиопатические выкидыши (15–25 %), патогенез которых не ясен, в этих случаях эмпирически применяют прогестерон [4].

Для восстановления рецептивности эндометрия при коррекции лютеиновой недостаточности при ПНБ используют гормональную терапию, а также препараты, обладающие прямым или опосредованным действием на метаболизм стероидов [12]. Однако высокий процент неудач восстановления рецептивности эндометрия и достижения фертильности при ПНБ требует патогенетической разработки новых подходов к терапии и совершенствования схем предгравидарной подготовки [9].

Маринкин И.О. – д.м.н., проф., зав. кафедрой акушерства и гинекологии, ректор

Непомнящих Д.Л. – д.м.н., проф., зав. лабораторией клинической морфологии, зам. директора по научной работе

Кулешов В.М. – д.м.н., проф., проф. кафедры акушерства и гинекологии

Илизарова Н.А. – д.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии

Семченко Т.О. – аспирант кафедры акушерства и гинекологии

Айдагулова С.В. – д.б.н., проф., зав. лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ЦНИЛ, e-mail: a_sv@ngs.ru

Цель исследования – изучить динамику ультраструктурных изменений эпителиоцитов эндометрия в условиях предгравидарной гормонотерапии при ПНБ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено комплексное морфологическое исследование цуг-биоптатов эндометрия 63 женщин репродуктивного возраста с ПНБ, эмпирически разделенных на две группы (31 и 32 пациентки в возрасте $27,2 \pm 1,2$ и $28,3 \pm 0,9$ года соответственно) в зависимости от схемы предгравидарной гормонотерапии, проводимой в течение трех менструальных циклов.

Первая схема – циклическая гормонотерапия: с 1-го по 28-й день цикла фемостон 1/10 (1 мг 17β -эстрадиола и 10 мг дидрогестерона) с дополнительным приемом с 16-го по 25-й день дидрогестерона (дюфастона) по 10 мг в сут. Важно отметить, что по сравнению с рекомендуемыми схемами [4] дозировка 17β -эстрадиола была снижена в 2 раза, что имело целью лишь немного простимулировать пролиферативную и дифференцировочную активность клеточных популяций эндометрия. Вторая схема – с 16-го по 25-й день цикла 20 мг в сут дидрогестерона (дюфастона). В обеих группах гормонотерапия проводилась на фоне циклической метаболической терапии: 3 раза в сут 100 мг витамина Е в сочетании с 0,012 г липоевой кислоты и 0,1 г пантотената кальция с 5-го по 15-й дни цикла и с 1 мг фолиевой кислоты и 0,5 г оротата калия с 16-го по 25-й дни цикла.

Цуг-биоптаты эндометрия, полученные по показаниям на 22–24 день менструального цикла до предгравидарной подготовки и по ее окончании, фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида. С помощью микроскопа Axio Scope.A1 с фотокамерой AxioCam MRC5 и программным обеспечением ZEN blue (Zeiss, Германия) исследовали парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, и полутонкие срезы, окрашенные реактивом Шиффа и толуидиновым синим. Ультратонкие срезы эпителиоцитов эндометрия контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа JEM-100S (Япония). У пациенток получено информированное согласие на проведение обследования и лечение ПНБ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

До предгравидарной гормонотерапии комплекс структурных изменений эндометрия пациенток с ПНБ в среднесекреторную стадию

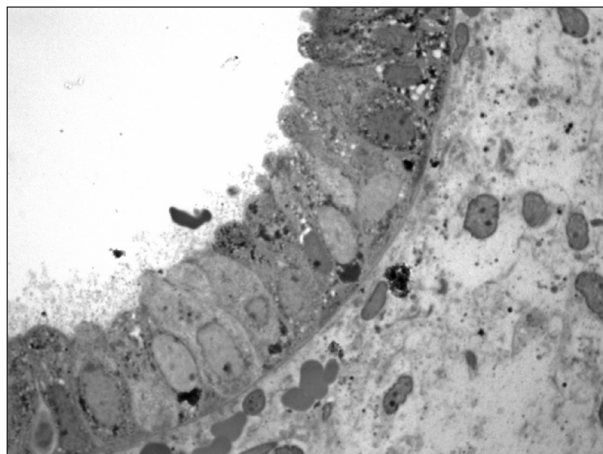


Рис. 1. Привычное невынашивание беременности. Биоптат эндометрия на 23-й день менструального цикла. Дистрофия эпителиоцитов, отсутствие пиноподий; единичные стромальные клетки. Полутонкий срез, окраска реактивом Шиффа и толуидиновым синим. Ув. 1050.

менструального цикла при светооптическом исследовании парафиновых и полутонких срезов соответствовал общепатологическим представлениям о выраженной дистрофии и атрофии. Эндометриальные железы были редуцированы в количестве, как правило, укорочены и полиморфны по степени созревания: преобладали несекретирующие, десинхронизированные с фазой менструального цикла, с дистрофией и атрофией эпителия. Подэпителиальная строма эндометрия характеризовалась слабыми признаками децидуализации клеточных элементов и наличием единичных субэпителиальных лимфоцитов (рис. 1), что не соответствовало выраженным воспалительным изменениям при хроническом эндометрите.

При электронно-микроскопическом исследовании эпителиоцитов эндометрия выявлены ультраструктурные признаки значительного снижения уровня биосинтетических процессов. Уменьшение высоты эпителиоцитов, апикальная мембрана которых не формировала пиноподии, сочеталось с резко сниженным количеством ядрышек и компонентов канальцевой системы в ядрах и сопровождалось редукцией элементов гранулярной цитоплазматической сети при отсутствии мегамитохондрий. Снижение белоксинтезирующего и энергетического потенциалов эпителиоцитов обуславливало накопление в них лишь единичных зерен гликогена.

Таким образом, ультраструктурными эквивалентами нарушения рецептивности эндометрия при ПНБ являлись недостаточно выраженные элементы белоксинтезирующего комплекса ядра и цитоплазмы, что в совокупности с малым со-

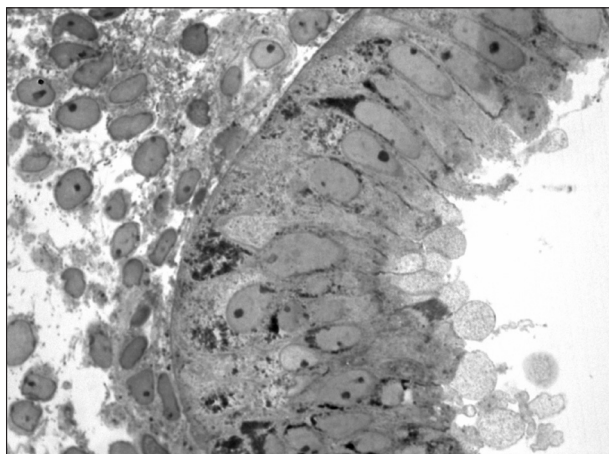


Рис. 2. Привычное невынашивание беременности после циклической гормонотерапии в течение 3-х мес. Биоптат эндометрия на 23-й день менструального цикла. Многочисленные пиноподии на апикальных полюсах эпителиоцитов. Полутонкий срез, окраска реактивом Шиффа и толуидиновым синим. Ув. 1050.

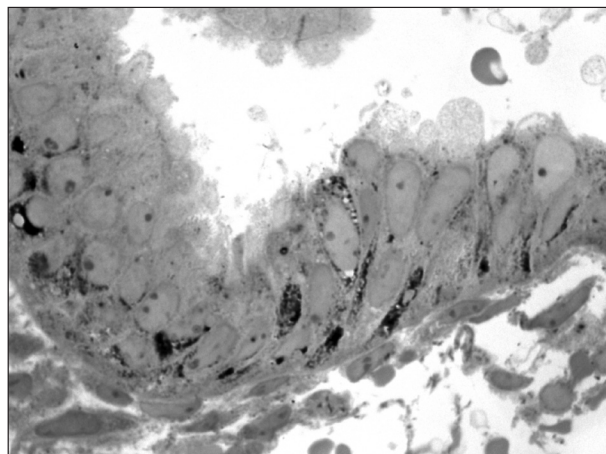


Рис. 3. Привычное невынашивание беременности после гормонотерапии дидрогестероном в течение 3-х мес. Биоптат эндометрия на 24-й день менструального цикла. Единичные пиноподии на апикальных полюсах эпителиоцитов. Полутонкий срез, окраска реактивом Шиффа и толуидиновым синим. Ув. 1050.

держанием гликогена и отсутствием мегамитохондрий свидетельствовало о недостаточности пластического и энергетического материала для обеспечения секреторной трансформации. Несответствие гормон-зависимой клеточной дифференцировки эпителиоцитов эндометрия стадии цикла у пациенток с ПНБ можно интерпретировать как системное проявление универсального синдрома регенераторно-пластической недостаточности [7], сущность которого состоит в нарушении процессов внутриклеточной регенерации и формировании пластического дефицита в различных органах и тканях, подвергающихся хроническим неблагоприятным воздействиям.

Применение 1-й схемы гормонотерапии в течение трех менструальных циклов стимулировало внутриклеточные регенераторные реакции эпителиоцитов с адекватной стадией цикла дифференцировкой и экспрессией секреторного фенотипа эндометрия (рис. 2), больше соответствующего уровню репродуктивного здоровья с «открытым окном имплантации», чем при использовании 2-й схемы (рис. 3). В эпителиоцитах эндометрия выявлены гигантские и мегамитохондрии, обеспечивающие гормон-индуцированную цитодифференцировку. В ядрах большинства клеток имелись крупные ядрышки с приуроченными к ним кластерами регулярных тубулярных структур, мембраны которых соответствовали канальцам гранулярной цитоплазматической сети с многочисленными полисомами (рис. 4); в цитоплазме диффузно и в виде супрануклеарных агрегатов локализовались крупные депозиты гликогена. Высокие полиморфные выпячивания апикальной

плазмолеммы в виде пиноподий формировались у 47–63 % эпителиоцитов (рис. 5), остальные клетки имели на апексах полиморфные микроворсинки и реснички.

В результате применения 2-й схемы предгравидарной подготовки в течение 3-х циклов отмечено усиление пролиферативной активности эпителиоцитов, соответствующее лютеиновой фазе менструального цикла – преобладали железы звездчатой и пилообразной формы с широкими просветами, складчатыми контурами, высланными призматическим эпителием с ультраструктурными признаками адекватной цитодифференцировки. Однако с учетом комплекса клинических данных данная схема в большинстве случаев не обеспечивала стимуляции необходимого для «открытия окна имплантации» уровня экспрессии пластического и энергетического потенциала эпителиоцитов эндометрия.

В норме эпителий и строма эндометрия, являющиеся быстро обновляющимися тканями, под влиянием определенного сочетания половых гормонов должны очень быстро подвергаться ремоделированию для обеспечения нормальной имплантации бластоцисты. В основе недостаточности лютеиновой фазы цикла лежит сниженный уровень экспрессии рецепторов к прогестерону как следствие неадекватного содержания эстрогенов [6]. Однако морфологическая «незрелость» эндометрия может наблюдаться даже при достаточной продукции прогестерона; в связи с этим важен не только уровень стероидов в организме, но и недостаточная реализация гормонального эффекта [8, 10].

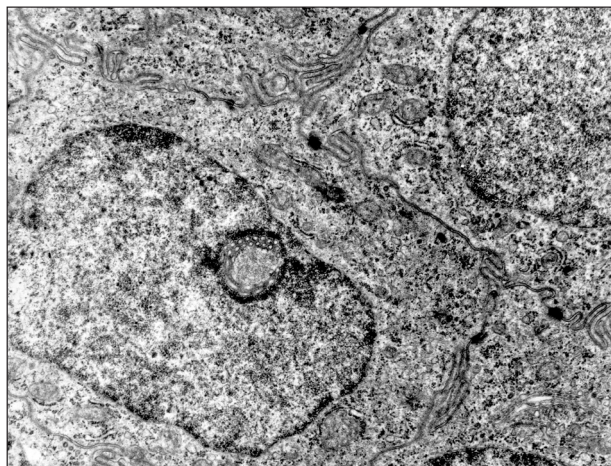


Рис. 4. Привычное невынашивание беременности после циклической гормонотерапии в течение 3-х мес. Фрагменты glandулоцитов эндометрия на 23-й день менструального цикла: в ядре ядрышко с кластерами гранулярных тубулярных структур; в цитоплазме свободные и прикрепленные полисомы. Электронограмма. Ув. 10 000.

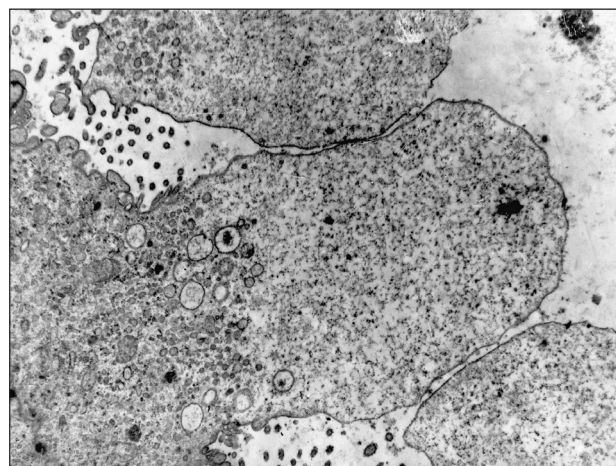


Рис. 5. Привычное невынашивание беременности после циклической гормонотерапии в течение 3-х мес. Высокие пиноподии на апикальных полюсах эпителиоцитов эндометрия на 23-й день менструального цикла: многочисленные экзосомы и везикулы. Электронограмма. Ув. 15 000.

В нашем исследовании малые дозы эстрогенов на этапе предгравидарной подготовки пациенток с ПНБ способствовали не только пролиферации, но и гормон-опосредованной дифференцировке эпителия с экспрессией рецепторов и к эстрогенам, и к прогестерону, дозировка которого нарастала к 16-му дню цикла, индуцируя секреторную трансформацию. Другими словами, циклическая гормонотерапия, обеспечивая адекватное поступление половых стероидных гормонов, последовательно индуцировала внутриклеточную регенерацию эпителиоцитов эндометрия с восстановлением необходимого уровня экспрессии рецепторного аппарата к эстрогенам и прогестерону, результатом которой явилась реализация статуса рецептивности эндометрия, соответствующей показателям репродуктивного здоровья.

Слизистые оболочки, в том числе эндометрий, играют ведущую роль в процессах адаптации; комплексные морфологические исследования слизистых оболочек по материалам эндоскопических биопсий продемонстрировали стереотипность их реагирования, что позволило сформулировать концепцию «единства реакций слизистых оболочек», нередко реализующуюся синдромом регенераторно-пластической недостаточности, базис которого – снижение процессов внутриклеточной регенерации [2]. Этот синдром может составлять фундаментальную основу для разработки принципиально новых подходов к терапии хронических заболеваний, в частности, эндометрия, с помощью средств, индуцирующих

регенераторные реакции, в противовес агрессивной антибиотикотерапии [3].

Таким образом, полученные результаты позволяют выделить новый аспект в морфогенезе патологии эндометрия при ПНБ. В комплексе взаимосвязанных патологических феноменов – эндокринные нарушения, тромбофилии, хронический эндометрит – одну из весомых позиций занимает дистрофия эндометрия, проявляющаяся снижением внутриклеточных регенераторных реакций эпителия. Ультраструктурным эквивалентом снижения рецептивности эндометрия служит редукция белоксинтезирующих ядерных и цитоплазматических органелл в эпителиоцитах, что лежит в основе несоответствия структуры лютеиновой фазы цикла со снижением секреторной активности и «закрытым окном имплантации».

Основу стратегии терапии ПНБ составила интенсификация регенераторных реакций в клеточных популяциях эндометрия, что способствовало индукции биосинтетических реакций с восстановлением рецептивности эндометрия и фертильности. Циклическая гормонотерапия в сочетании с комплексной метаболической терапией в качестве предгравидарной подготовки способствовала наступлению беременности у 16 (51,6 %) женщин 1-й группы и 13 (40,6 %) – 2-й; при этом доношенные дети с оценкой по шкале Апгар 8–9 баллов родились у 10 (32,3 %) женщин в 1-й группе и у 8 (25,0 %) – во 2-й, что иллюстрирует более высокую эффективность патогенетически обоснованной предгравидарной гормонотерапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Милованов А.П., Герасимова О.П. Клинико-морфологический контроль эффективности прегравидарного лечения женщин после неразвивающихся беременностей // Акушерство и гинекология. 2013. (5). 87–90.
2. Непомнящих Г.И. Биопсия бронхов: Морфогенез общепатологических процессов в легких. М.: Изд-во РАМН, 2005. 384 с.
3. Радзинский В.Е., Димитрова В.И., Майскова И.Ю. Неразвивающаяся беременность. Руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 200 с.
4. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. М.: Триада-Х, 2005. 303 с.
5. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммунология беременности. М.: Изд-во РАМН, 2003. 400 с.
6. Хмельницкий О.К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний. СПб.: СОТИС, 1994. 480 с.
7. Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А., Непомнящих Л.М. и др. Некоторые фундаментальные проблемы гистопатологии миокарда // Бюл. СО АМН СССР. 1982. (3). 22–29.
8. Badawy A.M., El-Gharib M.E., Zalata K. Should endometrial biopsy be a routine investigation for recurrent early-pregnancy loss? // Gynaecol. Endosc. 2002. 11. (6). 397–399.
9. Ford H.B., Schust D.J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy // Rev. Obstet. Gynecol. 2009. 2. (2). 76–83.
10. Lea R.G., Oliver S.S. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation // Reproduction. 2007. 134. (3). 389–404.
11. Prado-Drayer A., Teppa J., Sanchez P., Camero M.I. Immunophenotype of peripheral T-lymphocytes, NK cells and expression of CD69 activation marker in patients with recurrent spontaneous abortions during the mid-luteal phase // Am. J. Reprod. Immunol. 2008. 60. (1). 66–74.
12. Szekeres-Bartho J., Balasch J. Progestagen therapy for recurrent miscarriage // Hum. Reprod. Update. 2008. 14. (1). 27–35.

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF ENDOMETRIAL RECEPTIVITY IN PREGRAVID TREATMENT CONDITIONS AT RECURRENT MISCARRIAGE

Igor Olegovich MARINKIN¹, David L'vovich NEPOMNYASHCHIKH²,
Vitaly Mikhailovich KULESHOV¹, Nataliya Aleksandrovna ILIZAROVA¹,
Tatyana Olegovna SEMCHENKO¹, Svetlana Vladimirovna AIDAGULOVA¹

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

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

OBJECTIVE: To study the dynamics of ultrastructural changes of endometrial epithelial cells at the result of pregravid treatment of the recurrent miscarriage. **MATERIAL AND METHODS:** 63 samples of endometrial biopsies of women in reproductive age with a luteal phase insufficiency. Light and electron microscopy. **RESULTS AND DISCUSSION:** It has been revealed that pregravid cyclic hormone therapy (1 mg of 17 β -estradiol and 20 mg of dydrogesterone) in comparison with monotherapy by 20 mg of dydrogesterone during 3 months induced the intracellular regeneration and the implementation of the secretory phenotype of endometrial epithelial cells corresponding to the receptivity status with an «implantation open window».

Key words: recurrent pregnancy loss, endometrial receptivity, hormonal therapy, ultrastructure

Marinkin I.O. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for obstetrics and gynecology, rector
Nepomnyashchikh D.L. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory for clinical morphology, deputy director on scientific work

Kuleshov V.M. – doctor of medical sciences, professor of the chair for obstetrics and gynecology

Ilizarova N.A. – doctor of medical sciences, associate professor of the chair for obstetrics and gynecology

Semchenko T.O. – post graduate student of the chair for obstetrics and gynecology

Aidagulova S.V. – doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory for cellular biology and fundamental basis of reproduction, e-mail: a_sv@ngs.ru

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Анна Валентиновна ЯКИМОВА¹, Вячеслав Алексеевич ШКУРУПИЙ^{1,2},
Игорь Олегович МАРИНКИН¹

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

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

С целью изучения особенностей морфогенеза плаценты у беременных, страдающих туберкулезом легких, с учетом характера патологического процесса и проводимого лечения, проведено патоморфологическое исследование 173 плацент, полученных при родах в третьем триместре беременности. Пациентки были разделены на 4 группы: 104 женщины, страдавшие туберкулезом легких и получавшие противотуберкулезную терапию во время беременности, 19 пациенток с туберкулезом легких, отказавшиеся от противотуберкулезной терапии, 30 женщин без туберкулеза, чья беременность осложнилась преэклампсией, и 20 здоровых беременных. Установлено, что адаптивные реакции плаценты при преэклампсии и туберкулезе были идентичными, но различались в плацентах пациенток, получавших и не получавших противотуберкулезное лечение. Компенсированную плацентарную недостаточность мы диагностировали во всех группах пациентов, но суб- и декомпенсированная имела место только при туберкулезе и при преэклампсии. При изучении объемной плотности аксиальных капилляров терминальных ворсин наименьшая плотность отмечена у пациенток с преэклампсией – $29,4 \pm 0,5$ %, у больных туберкулезом она также была достоверно ниже, чем в контрольной группе: $29,69 \pm 0,82$ и $40,81 \pm 1,03$ % соответственно. Наиболее значительные патологические изменения (подавление ангиогенеза терминальных ворсин плаценты) мы выявили в плацентах женщин, не получавших противотуберкулезного лечения. В группе контроля отмечали высокую относительную плотность терминальных ворсин с сосудистыми мембранами ($56,2 \pm 0,8$ %), в то время как в первой, второй и третьей группах данный показатель составил $22,1 \pm 1,8$, $23,5 \pm 0,8$ и $32,4 \pm 1,0$ % соответственно. Очевидно, туберкулез легких сдерживает формирование терминальных ворсин с сосудистыми мембранами, что может негативно влиять на трофику плода, а противотуберкулезная терапия не способна нивелировать это влияние. Реакции адаптации были более выражены в первой группе и имели клеточный механизм.

Ключевые слова: туберкулез легких у беременных, плацентарная недостаточность, диссоциированное развитие, бессосудистые ворсины, тип адаптации, морфологические изменения плаценты, лечение туберкулеза у беременных.

В развивающихся странах и в определенных областях индустриально развитых стран частота туберкулеза наиболее высока среди женщин и мужчин детородного возраста [1]. В Российской Федерации максимальный уровень показателя заболеваемости туберкулезом отмечен в возрастной группе 25–34 года, т.е. среди молодых мужчин и женщин. В 2012 г. в РФ зарегистрировано 96 740 случаев туберкулеза, в среднем по стране 67,7 на 100 тысяч населения. Изучение особенностей туберкулеза при беременности, учитывая его распространенность среди населения детородного возраста, является актуальным.

Целью исследования было изучение особенностей морфогенеза плаценты у беременных, страдающих туберкулезом легких, с учетом характера патологического процесса и проводимого лечения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовано 173 плаценты женщин с доношенной беременностью, в том числе 123 плаценты пациенток с активным туберкулезом (инфильтративная форма). Для проведения морфологического исследования последа, по критерию наличия

Якимова А.В. – д.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии, e-mail: yakimova@hotmail.com

Шкурупий В.А. – д.м.н., проф., академик РАМН, зав. кафедрой патологической анатомии, директор, e-mail: sck@soram.ru

Маринкин И.О. – д.м.н., проф., зав. кафедрой акушерства и гинекологии, ректор, e-mail: rector@ngmu.ru

или отсутствия туберкулостатической терапии во время беременности, были выделены следующие группы: 1-я группа – плаценты пациенток с туберкулезом дыхательной системы, получавших терапию туберкулостатическими препаратами во время беременности ($n = 104$), 2-я группа – плаценты пациенток с туберкулезом дыхательной системы, отказавшихся от терапии туберкулостатическими препаратами во время беременности ($n = 19$). Наиболее частым осложнением беременности в обеих группах было сочетание артериальной гипертензии и протеинурии, обусловленных беременностью – преэклампсия, по этой причине в качестве группы сравнения (3-я группа) были взяты плаценты пациенток с этими осложнениями ($n = 30$). Второй группой сравнения (4-я группа) послужили плаценты 20 условно здоровых беременных женщин (без признаков преэклампсии, острых воспалительных процессов). У всех обследованных беременных возраст не превышал 27 лет: в первой группе беременных он составил $23,4 \pm 1,1$ года, во второй – $26,02 \pm 0,6$ года, в группах сравнения – $25,6 \pm 0,3$ и $23,2 \pm 0,3$ года соответственно. У большинства женщин туберкулез был диагностирован до беременности (60,42 %). Исследование выполнено с информированного согласия испытуемых, в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.) и одобрено этическим комитетом ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН.

Для морфологического исследования материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина с последующей заливкой в парафин. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином с последующим проведением обзорной световой микроскопии и морфометрическим исследованием. Подсчитывали объемную плотность (Vv) терминальных ворсин в плаценте женщин, объемную плотность трофобласта, соединительной ткани, сосудов терминальных ворсин, а также объемную плотность подтрофобластических, аксиальных, парацентральных капилляров, синцитиокапиллярных мембран терминальных ворсин, симпластических узелков, межворсинчатого пространства и межворсинчатого материнского фибриноида. Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Достоверность различий между средними величинами измеряемых параметров определяли с помощью критерия Стьюдента, для качественных параметров применяли точный критерий Фишера. Статистически значимыми принимали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Беременность закончилась родами в сроке $37,1 \pm 0,6$ недели в группе больных туберкулезом, не получавших противотуберкулезную терапию, и $38 \pm 0,6$ недели в группе женщин, получавших такую терапию во время беременности, по этому показателю группы достоверно не отличались от группы пациенток с преэклампсией, где роды произошли в сроке $38,1 \pm 1,0$ недели. Примечательно, что с группой здоровых беременных, роды у которых произошли в сроке $39,9 \pm 0,8$ недели, имелись достоверные различия, что подтвердило ранее полученные нами данные [6, 7]. Таким образом, проведенные наблюдения свидетельствуют о том, что у беременных, страдающих туберкулезом, роды происходят достоверно раньше, чем у здоровых беременных в среднем на 2 недели.

Масса последа у леченных больных туберкулезом ($487,0 \pm 6,0$ г) была статистически значимо меньше, чем у здоровых женщин ($518,1 \pm 5,4$ г, $p = 0,0005$), при этом у пациенток, не получавших туберкулостатическую терапию ($442,0 \pm 4,6$ г), она была также достоверно меньше, чем в третьей группе ($495,1 \pm 5,1$ г, $p = 0,0005$). Это согласуется с нашими более ранними результатами о выраженном отрицательном влиянии туберкулеза легких на развитие плаценты в отсутствие антибактериальной терапии [5, 7].

При морфологическом исследовании последа признаки хронической плацентарной недостаточности выявлены у всех пациенток 1, 2 и 3 групп. Характерной особенностью для группы родильниц, страдавших туберкулезом, было наличие патологической незрелости плаценты в варианте промежуточных дифференцированных ворсин, такой вариант был диагностирован в каждом пятом случае, что достоверно не отличалось от результатов исследования последа в группе с преэклампсией. В контрольной группе такой вариант не встречался. Также в большинстве случаев диагностирован вариант диссоциированного развития котиледонов, что также характерно и для последов от пациенток с преэклампсией. В контрольной группе вариант диссоциированного развития котиледонов встречается лишь в 40 % случаев. Зрелый тип плаценты диагностирован у больных туберкулезом значительно реже, чем у здоровых беременных ($p < 0,0005$), а у родильниц с преэклампсией не наблюдался ни в одном случае. Подробно результаты гистологического исследования последов приведены в табл. 1.

Во второй группе хроническая плацентарная недостаточность носила компенсированный

Таблица 1

Структура хронической плацентарной недостаточности в варианте патологической незрелости ворсин у беременных женщин, больных туберкулезом легких

Группа	Вариант промежуточных дифференцированных ворсин, n (%)	Вариант промежуточных недифференцированных ворсин, n (%)	Вариант диссоциированного развития котиледонов, n (%)	Зрелый тип плаценты, n (%)
1 группа	21 (20,2)*	0	75 (72)*	9 (8,6)*
2 группа	5 (26,3)*	1 (5,3)*	12 (65,2)*	1 (5,3)*
3 группа	6 (20)	1 (3,3)	23 (77,5)	0
4 группа	0	0	8 (40)	12 (60)

Примечание. Здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя группы 4 статистически значимо при $p = 0,0005$.

характер почти в половине случаев (около 48 % наблюдений), в первой – в 2/3 случаев. В обеих указанных группах преобладал клеточный механизм [5] адаптации: в первой группе – в 68 %, во второй – в 78,3 % случаев; наиболее редко отмечался сосудистый тип адаптации (соответственно у 12 и 8,7 % обследованных). В третьей группе компенсированный характер плацентарной недостаточности был диагностирован в 60 % наблюдений, субкомпенсированный – в 35 %. Более чем в половине случаев компенсация осуществлялась за счет клеточного механизма адаптации, в 40 % – смешанного, сосудистый тип, так же как и в первых двух группах, был редок (7,5 %). В контрольной группе морфологические признаки плацентарной недостаточности диагностированы в 80 % случаев, однако компенсированный ее характер отмечался у 75 % беременных и только в одном (5 %) случае имела место субкомпенсированная хроническая плацентарная недостаточность. Клеточный тип адаптации не был характерен для плацент обследованных 4-й группы: в них адаптивные процессы были представлены гиперплазией терминальных ворсин, дилатацией и полнокровием капилляров терминальных ворсин, формированием синцитиокапиллярных мембран. Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что в исследованных группах преобладали разные механизмы адаптации, различия между 1, 2 и 4 группами были статистически значимыми ($p = 0,005$). Из приведенного наблюдения возможен вывод о подобии адаптационных механизмов в плаценте при синдроме системного воспалительного ответа, с признаками аутоиммунного воспаления [6], который имеет место у больных туберкулезом беременных, и синдроме эндотелиальной дисфункции, характерном для преэклампсии.

Наиболее значимые результаты получены при морфометрическом исследовании плацентарной

ткани. Объемная плотность терминальных ворсин плацент больных туберкулезом легких (1 и 2 группы) была существенно меньше, чем плацент здоровых беременных (соответственно $56,0 \pm 1,8$, $52,01 \pm 2,01$ и $98,6 \pm 1,6$, %, $p = 0,001$), что свидетельствует о значительном влиянии воспалительного процесса экстрагенитальной локализации на морфогенез плаценты. У пациенток с туберкулезом также была снижена по сравнению со здоровыми женщинами объемная плотность цитотрофобласта (соответственно $23,4 \pm 1,8$, $21,1 \pm 1,9$ %, и $27,6 \pm 0,8$ %). Объемная плотность бессосудистых терминальных ворсин была наибольшей в группе пациенток, страдавших туберкулезом и не получавших соответствующей терапии (группа 2) ($15 \pm 1,2$ %, для групп 2–4 $p = 0,001$) в первой группе этот показатель составил $7,2 \pm 1,0$ % (для групп 1–4 $p = 0,025$), в третьей – $9,5 \pm 0,5$ %. Согласно данным литературы [4], нарушение ангиогенеза и увеличение объемной плотности бессосудистых ворсин плаценты характерно для инфекционного процесса любой этиологии: описано их высокое содержание при инфекционном поражении последа «немикобактериальной» этиологии – 19,7 % в плацентах жизнеспособных плодов, что близко к полученным нами данным. Результаты настоящего исследования, однако, расходятся с данными литературы об объемной плотности бессосудистых терминальных ворсин у здоровых беременных: соответственно $4,7 \pm 0,6$ и 15,7 % [4].

Наименьшая объемная плотность аксиальных капилляров терминальных ворсин отмечена у пациенток с преэклампсией ($29,4 \pm 0,5$ %), у больных туберкулезом, не получавших терапию туберкулостатическими препаратами ($29,69 \pm 0,82$ %), она также была достоверно ниже, чем в контрольной группе ($40,81 \pm 1,03$ %, $p = 0,05$). Таким образом, можно предполагать, с одной стороны, что назначение противотуберкулезных препаратов у

Таблица 2

Объемная плотность (V_v) капилляров терминальных ворсин в плацентах у беременных женщин, больных туберкулезом легких ($M \pm t$)

Группа	Подтрофобластические капилляры	Аксиальные капилляры	Парацентральные капилляры
1-я группа	24,44 ± 1,2*	29,69 ± 0,82*	45,87 ± 1,06*
4-я группа	34,59 ± 1,02	40,81 ± 1,03	24,6 ± 0,86

больных туберкулезом беременных способствует нормальному ангиогенезу плаценты, а с другой – что подавление ангиогенеза происходит непосредственно возбудителем инфекционно-воспалительного процесса или продуктами его жизнедеятельности, а является результатом развития системного воспалительного ответа, который имеет место и при преэклампсии [8]. Патологический ангиогенез выявлен и при определении объемной плотности парацентральных капилляров терминальных ворсин: в плацентах здоровых беременных она была на 20 % меньше, чем в плацентах больных туберкулезом. Объемная плотность подтрофобластических капилляров в контрольной группе была примерно на 10 % выше, чем в группах больных туберкулезом ($p = 0,0005$) (табл. 2).

Объемная плотность терминальных ворсин с сосудистыми мембранами у пациенток 1-й, 2-й и 3-й групп (соответственно 22,1 ± 1,8 23,5 ± 0,8 и 32,4 ± 1,0 %) была достоверно ниже, чем у женщин контрольной группы (56,2 ± 0,8 %, $p = 0,001$). Следовательно, туберкулез легких сдерживает их формирование, что может негативно влиять на трофику плода, а противотуберкулезная терапия, очевидно, не способна нивелировать это влияние.

Как показано в некоторых работах, при туберкулезе макроскопически обнаруживают либо крупные очаги творожистого некроза, либо множественные милиарные очажки на поверхностях плаценты, в ворсинчатом хорионе и оболочках [2]. Как правило, инфицирование плаценты происходит гематогенным путем, реже – из очага инфекции в эндометрии. В сосудах ворсин образуются тромбы или происходит облитерация просвета. При распространении инфекции из очагов в эндометрии аналогичные изменения могут обнаруживаться в оболочках плаценты [1, 4]. В результате наших исследований воспалительные изменения последа у пациенток, страдавших туберкулезом, обнаружены в 100 % случаев, однако очагов творожистого некроза в плаценте или оболочках не найдено. Эти изменения были представлены диффузным продуктивным воспалением (100 % наблюдений). Значимых разли-

чий между первой и второй группами выявлено не было. В третьей группе также были воспалительные изменения, преимущественно в виде париетального децидуита – 38 % случаев, базальный децидуит диагностирован у 27 % пациенток, острый виллузит диагностировали в 35 % случаев, острый интервиллузит встречался у 25 % пациенток. В IV группе воспалительные изменения носили острый очаговый характер, локализовались в децидуальной оболочке (очаговый децидуит) и были диагностированы у каждой шестой пациентки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При туберкулезе легких механизмы возникновения плацентарной недостаточности неспецифичны и преимущественно заключаются в нарушении васкуляризации ворсин, при этом доказано положительное влияние противотуберкулезной терапии на развитие (в большей степени – на ангиогенез) плаценты человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г. Патология последа. СПб.: Грааль, 2002. 447 с.
2. Милованов А.П. Патология системы «мать – плацента – плод». Руководство для врачей. М., 1999. 448 с.
3. Проценко Е.В., Зимина С.И., Посисеева Л.В., Перетяко Л.П. Морфологическая и доплерометрическая характеристика спиральных артерий при хронической плацентарной недостаточности // Арх. патол. 2005. 67. (1). 21–25.
4. Цинзерлинг В.А., Мельникова В.Ф. Перинатальные инфекции. Вопросы патогенеза, морфологической диагностики и клинико-морфологических сопоставлений. Руководство для врачей. СПб.: Элби-СПб, 2002. 352 с.
5. Черданцева Л.А., Якимова А.В., Надеев А.П., Шкуруний В.А. Особенности структурной организации плаценты при туберкулезе легких // Арх. патол. 2009. 71. (2). 7–9.
6. Якимова А.В., Трунов А.Н., Шваюк А.П. и др. Особенности иммунно-воспалительных процессов и перинатальные исходы при туберкулезе легких у

беременных // Хирургия. Морфология. Лимфология. 2006. 3. (6). 7–10.

7. Якимова А.В., Шкурупиий В.А. Беременность и роды у больных туберкулезом органов дыхания женщин: особенности развития и исход // Журн.

акушерства и женских болезней. 2009. 58. (4). 70–79.

8. Cochrane Collaboration Data Base. Multiple organ failure in critically ill patients // Review materials. 1994. 1–2.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN PLACENTA OF LUNG TUBERCULOSIS MOTHERS

Anna Valentinovna YAKIMOVA¹, Vyacheslav Alekseevich SHKURUPIY^{1,2}, Igor Olegovich MARINKIN¹

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091 Novosibirsk, Krasny av., 52*

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

The aim of the research was to study the features of the morphogenesis of placenta in pregnant women suffering from pulmonary tuberculosis, according to the nature of the pathological process and the treatment. Patients and methods. The investigation of 173 placentas of the third trimester's deliveries was made. There were four patient's groups: two groups consisted of pregnant women with tuberculosis: the first one – 104 women who received antituberculous therapy and second one – 19 pregnant women who had refused from treatment. The control group consisted of patients without tuberculosis but they had complication of pregnancy – preeclampsia (30), and the second control – healthy pregnant women (20). Results – It has been revealed that the mechanism of placental adaptation reactions in groups with tuberculosis and preeclampsia was the same. But it was different in the groups of patients who underwent antituberculous treatment and did not receive it. The compensated placental insufficiency has been diagnosed in all groups but subcompensated and decompensate insufficiency have been found only in the groups with tuberculosis and preeclampsia. In the study of the 3D density of axial capillaries of terminal villies the smallest density was observed in placenta of patients with preeclampsia – 29.4 ± 0.5 %, and in placenta of patients with tuberculosis, the 3D density of axial capillaries of terminal villi has also been reliably lower compared to the control group: 29.69 ± 0.82 %. In the control group it was 40.81 ± 1.03 %. The most significant pathologic changes (the inhibition of terminal villi's angiogenesis) were found in the group of patients with tuberculosis who had not been treated from it. The high relative density of terminal villi with vascular membranes – 56.2 ± 0.8 % was determined in the control group, in the first group it was 22.1 ± 1.8 %, in the second – 23.5 ± 0.8 %, in the third group – 32.4 ± 1.0 %, thus lung tuberculosis inhibits the formation of terminal villi with vascular membranes, it may negatively affect fetal trophic and tuberculostatic therapy is obviously not able to neutralize this effect. The adaptation was signed better in group of patients treated from tuberculosis during pregnancy and had cells mechanism.

Key words: pulmonary tuberculosis during pregnancy, placental insufficiency, dissociated development, avascular villi, type of adaptation, morphological changes of placenta, treatment of tuberculosis in pregnant women.

*Yakimova A.V. – doctor of medical sciences, associate professor of the chair of obstetrics and gynecology,
e-mail: yakimova@hotmail.com*

*Shkurupiy V.A. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, head of the chair of pathology,
director, e-mail: sck@soramn.ru*

*Marinkin I.O. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair of obstetrics and gynecology, rector,
e-mail: rector@ngmu.ru*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ АГРЕССИВНЫМИ НЕХОДЖКИНСКИМИ ЛИМФОМАМИ

Елена Николаевна ВОРОПАЕВА¹, Михаил Иванович ВОЕВОДА¹,
Татьяна Ивановна ПОСПЕЛОВА², Ольга Валерьевна БЕРЕЗИНА²,
Владимир Николаевич МАКСИМОВ¹

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

Цель исследования – изучить эффективность терапии больных агрессивными неходжкинскими лимфомами, получающих иммунохимиотерапию, в зависимости от генотипа rs1625895. Группу обследованных составил 41 пациент с В-клеточными неходжкинскими лимфомами высокой степени злокачественности, диагностированными в Городском гематологическом центре г. Новосибирска с 2004 по 2007 г., получавший терапию с включением препарата ритуксимаб. В общей группе ремиссия получена в 59 % случаев, 5-летняя общая выживаемость составила 36,6 %, безрецидивная – 24,4 %. В подгруппе больных с генотипом G/G rs1625895 ремиссия получена у 42,9 % человек, что статистически значимо ($p = 0,003$) ниже, чем в подгруппе больных с генотипами G/A и A/A (92,3 %). Показано наличие ассоциации генотипа G/G со статистически значимым ухудшением показателей общей (21,4 %) и безрецидивной (10,7 %) выживаемости; при генотипах G/A и A/A соответствующие показатели составили 69,2 % ($p = 0,004$) и 53,9 % ($p = 0,0006$).

Ключевые слова: агрессивные лимфомы, прогноз, терапия, выживаемость, генетический полиморфизм, ген TP53, ритуксимаб, rs1625895.

В России в 2005 г. введена программа дополнительного лекарственного обеспечения и в 2008 году – программа «7 нозологий», что позволило включить препараты CD20-антител (ритуксимаб) в протоколы лечения большинства больных В-клеточными CD20-позитивными неходжкинскими злокачественными лимфомами (НХЗЛ). Используемый с этого момента комплексный терапевтический подход, предусматривающий применение традиционных химиотерапевтических воздействий вместе с иммунотерапией, значительно улучшил результаты лечения данной категории пациентов: так, благодаря ему при диффузной В-крупноклеточной лимфоме, одном

из наиболее распространенных вариантов НХЗЛ, 5-летняя выживаемость составляет 58 %, в то время как до применения препаратов моноклональных антител – 45 % [16].

На современном этапе развития медицины основным препятствием на пути успешного лечения НХЗЛ по-прежнему является развитие в опухоли множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Требуется понимание механизмов возникновения и направленной эволюции многофакторной устойчивости опухолевых лимфоидных клеток не только к химиопрепаратам, но и к терапевтическим факторам различной природы (лучевой и иммунной терапии).

Воропаева Е.Н. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов исследования терапевтических заболеваний, e-mail: vena.81@mail.ru

Воевода М.И. – д.м.н., проф., чл.-кор. РАМН, директор, e-mail: mvovoda@ya.ru

Поспелова Т.И. – д.м.н., проф., зав. кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии, e-mail: postatgem@mail.ru

Березина О.В. – к.м.н., ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии, e-mail: ovberezina@mail.ru

Максимов В.Н. – д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярно-генетических методов исследования терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

Известно, что при неадекватном выборе самой первой программы терапии, оказавшейся недостаточно действенной, эффективность последующих протоколов будет значительно снижаться в результате возникновения в опухолевом субстрате МЛЮ.

Учитывая неуклонный рост заболеваемости и смертности от НХЗЛ, несмотря на достигнутые успехи в диагностике, разработку новых препаратов и схем лечения, возрастающие колоссальные материальные затраты в данной области, не вызывает сомнений, что в дальнейшем онкогематология вряд ли сможет существовать без анализа молекулярно-биологических особенностей организма и опухолевых клеток для успешного предсказания оптимального лечения НХЗЛ.

Ген *TP53* – ключевой регулятор постоянства генома клетки. Дефицит его функции способен вызывать МЛЮ опухолевых клеток по меньшей мере тремя способами: отменяя апоптоз, учащая мутационный процесс и повышая активность генов, определяющих те или иные механизмы лекарственной устойчивости [3]. В последовательности гена *TP53* описан полиморфизм rs1625895, который заключается в замене гуанина на аденозин в 13494 позиции 6-го интрона [13]. Viros et al. и Sauka et al. обнаружили, что у больных раком легкого гомозиготный генотип А/А полиморфизма G13494A в 6-м интроне гена *TP53* ассоциирован со значительно более высоким уровнем апоптоза лейкоцитов, чем у пациентов с гетерозиготным генотипом G/A [5, 15]. Относительно rs1625895 в литературе имеются сведения об ассоциации аллеля G и генотипа G/G с ухудшением выживаемости и эффективности терапии больных раком легкого [10], желудка [6] и опухолями головы и шеи [7]. При хроническом лимфолейкозе А/А генотип rs1625895 ассоциирован с начальными стадиями заболевания, CD38-негативным статусом и более длительным периодом до необходимости начала специфического лечения, что свидетельствует о благоприятном течении заболевания. Однако влияния данного полиморфизма на общую выживаемость не отмечено [8].

Поскольку эффект полиморфизма может иметь тканеспецифический характер и различаться в зависимости от этнической принадлежности изучаемой популяции, не представляется возможным экстраполировать результаты, полученные на других видах опухолевых заболеваний, на пациентов с НХЗЛ. Целью настоящего исследования стало изучение эффективности терапии больных агрессивными неходжкинскими лимфомами, получающих иммунохимиотерапию, в зависимости от генотипа rs1625895.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В группу обследованных вошел 41 пациент (22 мужчины и 19 женщин) с В-клеточными НХЗЛ высокой степени злокачественности, диагностированными в Городском гематологическом центре г. Новосибирска с 2004 по 2007 г. Средний возраст больных составил $43,8 \pm 14$ года (16–72 лет). Подавляющее большинство обследованных имели продвинутое стадии заболевания: 25 человек (61 %) – IV стадию, 8 человек (20 %) – III стадию, 8 человек (19 %) – II стадию лимфомы. Диагноз неходжкинской лимфомы был установлен на основании гистологического исследования биоптатов лимфоузлов с иммуногистохимической верификацией варианта опухоли с использованием широкой панели моноклональных антител к кластерам дифференцировки гемопоэтических клеток. Согласно классификации ВОЗ [14], были верифицированы следующие гистологические варианты лимфом: диффузная крупноклеточная, плеоморфная, лимфобластная, центробластная, иммунобластная, плазмобластная, анапластическая, фолликулярная 3-го цитологического типа.

Согласно критериям R-IP1, 12 больных были отнесены в группу очень хорошего и хорошего прогноза, 29 – в группу плохого прогноза. Больные в зависимости от стадии заболевания, а также прогностической группы, согласно R-IP1, в качестве терапии первой линии получили от 4 (при I–II стадии) до 6–8 (при III–IV стадии) курсов иммунохимиотерапии, включающей препарат моноклональных антител анти-CD20 ритуксимаб. В терапии использовались протоколы R-CHOP, R-CHOEP, R-ESHAP. Эффект полихимиотерапии оценивался по стандартным критериям достижения клинико-гематологической ремиссии [4]. Также применялись критерии эффективности лечения опухолевых заболеваний, принятые на совместной конференции Национального института рака США (NCI) и Американского общества клинической онкологии (ASCO) в 1996 г.: достижение ремиссии, 5-летняя общая и безрецидивная выживаемость [11].

Материалом для исследования служила замороженная при -20 °С ДНК, выделенная из мононуклеаров периферической крови больных до начала активной полихимиотерапии. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с требованиями этического комитета. Генотипирование rs1625895 осуществлялось по методике, описанной ранее [1].

Пятилетнюю выживаемость пациентов исследовали с помощью анализа цензурированных

данных с использованием функции вероятности выживания Каплана–Майера. Для сравнения кривых выживаемости использовали непараметрический логранговый критерий. Все пациенты имели законченное пятилетнее наблюдение. При расчете общей выживаемости началом мониторинга считался момент постановки диагноза, событием – смерть от любой причины. При расчете безрецидивной выживаемости началом мониторинга считался момент постановки диагноза, событием – рецидив. Для прогнозирования риска наступления события для пациентов с НХЗЛ и оценки влияния независимых предикторов на этот риск применялась модель пропорциональных рисков регрессии Кокса. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных НХЗЛ высокой степени злокачественности частота G-аллеля rs1625895 составила 82 %, A-аллеля – 18 %. Гомозиготный генотип G/G обнаружен у 68 % обследованных, гомозиготный генотип A/A – у 5 %, гетерозиготный генотип G/A – у 27 % пациентов. Ремиссия получена в 59 % случаев. Показатели 5-летней выживаемости в обследованной группе больных НХЗЛ были следующие: общая выживаемость составила 36,6 %, безрецидивная – 24,4 %. В подгруппе больных с генотипом G/G rs1625895 ремиссия получена у 42,9 % человек, что было статистически значимо ($p = 0,003$) ниже, чем в подгруппе больных с генотипами G/A и A/A (92,3 %).

Сравнительный анализ ассоциации генотипа rs1625895 у больных агрессивными НХЗЛ с

5-летней выживаемостью выявил наличие ассоциации генотипа G/G со статистически значимым ухудшением показателей общей (21,4 %) и безрецидивной (10,7 %), в то время как величины данных показателей у пациентов с генотипами G/A и A/A были статистически значимо выше и составили соответственно 69,2 % ($p = 0,004$) и 53,9 % ($p = 0,0006$) (см. рисунок).

Для оценки возможности использования генотипа rs1625895 для прогнозирования 5-летней общей и безрецидивной выживаемости была применена модель пропорциональных рисков регрессии Кокса. Установлено, что генотип rs1625895 может служить независимым предиктором как общей, так и безрецидивной 5-летней выживаемости, при генотипе G/G риск ухудшения общей и безрецидивной выживаемости соответственно в 3,3 раза ($p = 0,016$) и в 3,6 раза ($p = 0,006$) выше, чем при генотипах G/A и A/A.

rs1625895 расположен в интроне гена TP53. Хотя интронные полиморфизмы и не приводят к аминокислотным заменам в структуре кодируемого белка, хорошо известно, что интроны могут содержать регуляторные участки. К настоящему времени в них найдено значительное количество связанных с фенотипическими проявлениями полиморфизмов [2, 17]. На данный момент нет данных, что rs1625895 влияет на сплайсинг или связывание факторов транскрипции (т. е. не является сплайсинговым или регуляторным), а также служит мишенью для регуляторных микроРНК, в то же время сообщается о его влиянии на уровень экспрессии белка p53 [12]. D. Mavridou et al. отметили образование вторичной структуры одноцепочечной нити ДНК в виде шпильки во время секвенирования у лиц с гомозиготным генотипом

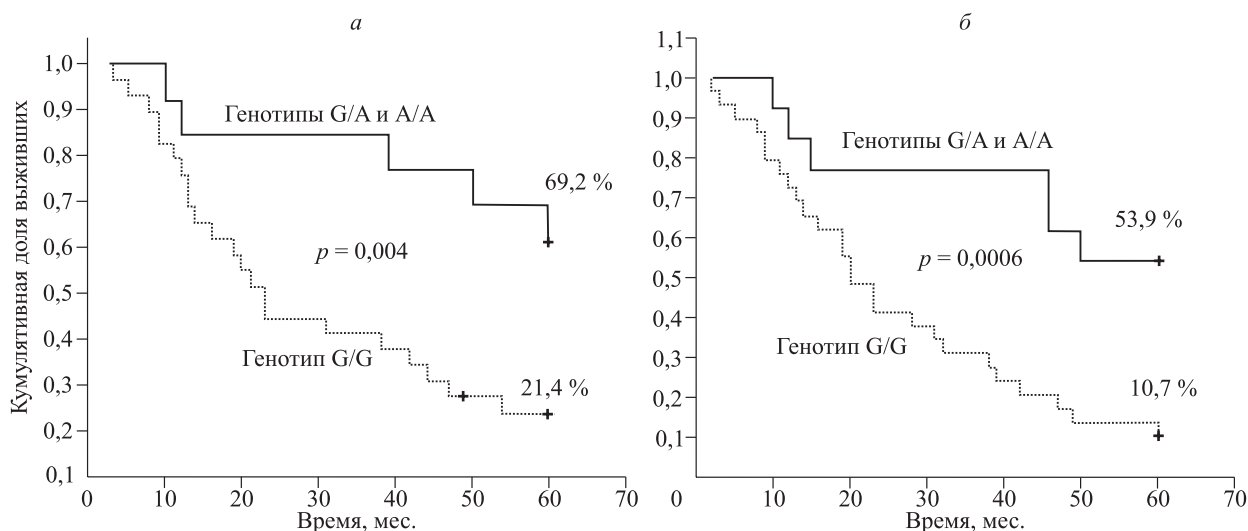


Рис. Общая (а) и безрецидивная (б) выживаемость в группе больных агрессивными НХЗЛ в зависимости от генотипа rs1625895

G/G, которая отсутствовала в случае замены гуанина на аденозин, и авторы предположили, что возможным механизмом влияния rs1625895 на функцию *p53* может быть изменение вторичной структуры пре-мРНК [9].

Поскольку полиморфизмы наследуются не изолированно, а в виде блоков, также можно предполагать, что наблюдаемый нами и другими авторами эффект ассоциации rs1625895 с эффективностью терапии опухолей связан не с изучаемым, а сцепленным с ним полиморфизмом *TP53*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генотип G/G rs1625895 ассоциирован с низкой вероятностью достижения ремиссии, а также ухудшением выживаемости больных НХЗЛ высокой степени злокачественности. Молекулярно-генетический подход, основанный на анализе rs1625895, может позволить патогенетически обоснованно выделять группу пациентов с НХЗЛ с плохим прогнозом при стандартном подходе к лечению, чтобы обсуждать возможность проведения у них более агрессивной программной иммунохимиотерапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом Правительства Новосибирской области № 23-ОН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воропаева Е.Н., Воевода М.И., Поспелова Т.И., Максимов В.Н. Интронные полиморфизмы антионкогена *TP53* у пациентов старшей возрастной группы с индолентными вариантами неходжкинских злокачественных лимфом // Успехи геронтол. 2013. 26. (2). 258–262.
2. Горшкова Е.В., Каледин В.И., Кобзев В.Ф., Меркулова Т.И. SNP в начале интрона 2 гена *K-ras* мышцы, ассоциированные с развитием рака легких, влияют на связывание с факторами транскрипции // Бюл. эксперим. биол. мед. 2006. (6). 681–684.
3. Копнин Б.П., Копнин П.Б., Хромова Н.В., Агапова Л.С. Многоликий *p53*: разнообразие форм, функций, опухолюсупрессирующих и онкогенных активностей // Гематология. 2008. 1. (1). 53–68.
4. Савченко В.Г. Программное лечение заболеваний системы крови: Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови / Ред. В.Г. Савченко. М.: Практика, 2012. 1056 с.

5. Biros E., Kohút A., Biros I. et al. A link between the *p53* germ line polymorphisms and white blood cells apoptosis in lung cancer patients // Lung Cancer. 2002. 35. (3). 231–235.
6. De Feo E., Persiani R., La Greca A. et al. A case-control study on the effect of *p53* and *p73* polymorphisms on gastric cancer risk and progression // Mutat. Res. 2009. 675. (1–2). 60–65.
7. Galli P., Cadoni G., Volante M. et al. A case-control study on the combined effects of *p53* and *p73* polymorphisms on head and neck cancer risk in an Italian population // BMC Cancer. 2009. 9. 137.
8. Kochethu G., Delgado J., Pepper C. et al. Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene *p53* may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia // Leuk. Res. 2006. 30. (9). 1113–1118.
9. Mavridou D., Gornall R., Campbell I.G. *TP53* intron 6 polymorphism and the risk of ovarian and breast cancer // Br. J. Cancer. 1998. 77. (4). 676–678.
10. Mechanic L.E., Bowman E.D., Welsh J.A. et al. Common genetic variation in *TP53* is associated with lung cancer risk and prognosis in African Americans and somatic mutations in lung tumors // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2007. 16. 214–222.
11. Outcomes of cancer treatment of technology assessment and cancer treatment guidelines // J. Clin. Oncol. 1996. 14. (3). 671–679.
12. Pangilinan F., Geiler K., Dolle J. et al. Construction of a high resolution linkage disequilibrium map to evaluate common genetic variation in *TP53* and neural tube defect risk in an Irish population // Am J. Med. Genet. A. 2008. 146A. (20). 2617–2625.
13. Peller S. A novel polymorphism in intron 6 of the human *p53* gene: a possible association with cancer predisposition and susceptibility // DNA Cell. Biol. 1995. 14. (12). 983–990.
14. Sabbatini E., Bacci F., Sagramoso C., Pileri S.A. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview // Pathologica. 2010. 102. (3). 83–87.
15. Sauka C., Kohút A., Kundrát I., Janík M. Polymorphism of gene *p53* and apoptosis in patients with malignant lung disease-our observation // Clin. Oncol. 2008. 21. (3). 98–103.
16. Sehn L.H., Berry B., Chhanabhai M. et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP // Blood. 2007. 109. (5). 1857–1861.
17. Sribudiani Y., Metzger M., Osinga J. et al. Variants in *RET* associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression // Gastroenterology. 2011. 20. (2). 572–582.

MOLECULAR-GENETIC APPROACH TO PREDICTING THE EFFECTIVENESS OF AGGRESSIVE NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS THERAPY

Elena Nikolaevna VOROPAeva², Mikhail Ivanovich VOEVODA², Tatiana Ivanovna POSPELOVA¹, Olga Valerievna BEREZINA¹, Vladimir Nikolaevich MAKSIMOV²

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

² *Institute of Internal and Preventive Medicine of SB RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

Purpose: to study the effectiveness of therapy of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma receiving immunochemotherapy, depending on the genotype of rs1625895. The survey group consists of 41 patients with high grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas diagnosed in the Novosibirsk City Hematology Center from 2004 to 2007. All patients underwent the therapy with the rituximab. In the general group of patients remission was obtained in 59 % of cases, 5-year overall survival rate was 36.6 %, disease-free – 24.4 %. In the subgroup of patients with the genotype G/G rs1625895 remission was obtained in 42.9 % of people. It was statistically significant ($p = 0.003$) lower than in the subgroup of patients with the genotype G/A and A/A – 92.3 %. The statistically significant association of genotype G/G with deterioration in the overall (21.4 %) and disease-free survival (10.7 %) vs. 69.2 % ($p = 0.004$) and 53.9 % ($p = 0.0006$) with genotype G/A and A/A respectively has been shown.

Key words: aggressive lymphoma, prognosis, therapy, survival, genetic polymorphisms, gene *TP53*, rituximab, rs1625895.

Voropaeva E.N. – candidate of medical sciences, researcher of the laboratory of molecular-genetic study methods of the therapeutic diseases, e-mail: vena.81@mail.ru

Voevoda M.I. – corresponding member of the RAMS, doctor of medical sciences, professor, director

Pospelova T.I. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for therapy, hematology and transfusiology, e-mail: postatgem@mail.ru

Berezina O.V. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for therapy, hematology and transfusiology, e-mail: ovberezina@mail.ru

Maksimov V.N. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of molecular-genetic study methods of the therapeutic diseases, e-mail: medik11@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРБИДНОСТИ В СОВРЕМЕННОЙ КЛИНИКЕ ВНУТРЕННИХ БОЛЕЗНЕЙ

Юрий Алексеевич НИКОЛАЕВ^{1,2}, Игорь Михайлович МИТРОФАНОВ¹,
Татьяна Ивановна ПОСПЕЛОВА², Нина Анатольевна ДОЛГОВА¹,
Владимир Яковлевич ПОЛЯКОВ¹

¹ ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

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

Проведен анализ динамики встречаемости транснозологической и транссистемной полиморбидности за период 2003–2011 гг. в клинике общетерапевтического профиля. Объектом исследования являлись 23310 больных (9111 мужчин и 14199 женщин), находившихся на лечении в клинике ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН. Были оценены показатели полиморбидности у мужчин и женщин как в целом, так и по трем возрастным периодам: 16–39 лет, 40–59 лет и старше 60 лет. Показано, что количество нозологических форм (транснозологическая полиморбидность) у одного больного равнялось $4,5 \pm 0,01$, а пораженных систем организма (транссистемная полиморбидность) – $3,76 \pm 0,01$. У мужчин данные показатели составили соответственно $4,88 \pm 0,02$ и $3,92 \pm 0,02$, у женщин – $5,33 \pm 0,02$ и $4,19 \pm 0,01$ (различия между мужчинами и женщинами статистически значимы). В период с 2003 по 2011 г. отмечен интенсивный рост как транснозологической, так и транссистемной полиморбидности, значения которых на одного больного достигли в среднем шести нозологических форм и превысили четыре заинтересованных физиологических системы организма. Показатель коэффициента транснозологической и транссистемной полиморбидности имеет гендерные различия: у женщин он выше, чем у мужчин. В период с 2003 по 2011 г. снижались частоты встречаемости изолированных форм заболеваний сердечно-сосудистой системы и возрастала величина их синтропии с болезнями органов пищеварения.

Ключевые слова: полиморбидность, динамика полиморбидности, пол, возраст.

В 70-е годы XX века А.Р. Feinstein ввел в научно-клиническую терминологию понятие коморбидности (comorbidity) [13]. Этот термин он характеризовал как наличие дополнительной клинической картины заболевания, которая уже существует или может появиться самостоятельно, помимо текущего заболевания, и отличается от него. В настоящее время используют два понятия: коморбидность и полиморбидность, первое – как множественное наличие заболеваний, связанных единым патогенетическим механизмом, второе – как наличие множественных заболеваний, возможно, не связанных между собой [4, 5]. Проблема полиморбидности является актуальной

для регионов Сибири и Севера [7]. Эпидемиологические исследования показали, что более трети населения имеют более чем одно заболевание [8, 15], при этом необходимо учитывать наличие двух и более независимых заболеваний, возникающих в течение жизни [1, 2]. Наряду с этим выделяется коморбидность как наличие более чем одного расстройства у человека в определенный период жизни – модель, ориентированная на дескриптивные диагностические классы, и модель коморбидности, рассматривающая относительный риск человека с одним заболеванием (расстройством) приобрести другое расстройство [11, 12].

Николаев Ю.А. – д.м.н., рук. лаборатории патогенеза соматических заболеваний, главный научный сотрудник, e-mail: nicol@soramn.ru;

Митрофанов И.М. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патогенеза соматических заболеваний, e-mail: tim@soramn.ru

Поспелова Т.И. – д.м.н., проф., зав. кафедрой терапии, гематологии и трансфизиологии ФПК и ППВ, e-mail: postatgem@mail.ru

Долгова Н.А. – главный врач клиники, e-mail: novdolgova@yandex.ru

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

Однако на сегодняшний день большинство исследований носят преимущественно мононозологический характер, что не позволяет в полной мере проанализировать факторы риска, прогнозы развития какой-либо одной нозологии, эффективно решать вопросы их профилактики и лечения [10]. При этом синтропию нозологий необходимо учитывать для проведения целенаправленной профилактики, адекватного лечения и прогнозирования осложнений [9], что, очевидно, будет требовать новых стратегий, обеспечивающих повышение медицинской безопасности населения. Поэтому необходимо располагать объективными данными о состоянии здоровья населения, особенностях формирования и проявлений сочетанной хронической неинфекционной патологии.

Целью настоящего исследования являлось изучение частоты встречаемости транснозологической и транссистемной полиморбидности в клинике общетерапевтического профиля, ее динамики за период 2003–2011 гг. и зависимости от возраста и пола.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись 23 310 больных (9111 мужчин и 14199 женщин) в возрасте от 16 до 92 лет, находившихся на лечении в клинике ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН с 2003 по 2011 г. Средний возраст у мужчин был равен $51,2 \pm 0,2$ года, у женщин – $53,8 \pm 0,1$ года. Работа выполнена в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации врачей, проводящих медико-биологические исследования с участием людей (в пересмотре 41-й Всемирной медицинской ассамблеи, 1989 г.). Для исследования использовался архивный метод, включавший анализ всех выявленных в ходе клинического обследования диагнозов у каждого больного, нозологических форм, групп и классов МКБ-10, независимо от того, был ли данный диагноз основным или сопутствующим. Степень соматической отягощенности больных определяли по индексу полиморбидности: число заболеваний/один больной [4]. Транснозологическую полиморбидность оценивали по среднему количеству нозологий, соответствующих трехзначной рубрификации Международной классификации болезней (МКБ-10), а транссистемная полиморбидность – по количеству задействованных классов МКБ-10 у одного больного. Учитывались следующие классы МКБ: Класс I Инфекционные и паразитарные болезни (шифры МКБ-10: A00-B99); Класс II Новообразования (C00-D48); Класс III Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовле-

кающие иммунный механизм (D50-D89); Класс IV Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00-E90); Класс V Психические расстройства и расстройства поведения (F00-F99); Класс VI Болезни нервной системы (G00-G99); Класс IX Болезни системы кровообращения (I00-I99); Класс X Болезни органов дыхания (J00-J99); Класс XI Болезни органов пищеварения (K00-K93); Класс XII Болезни кожи и подкожной клетчатки (L00-L99); Класс XIII Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00-M99); Класс XIV Болезни мочеполовой системы (N00-N99).

Для анализа динамики полиморбидности выделили три группы пациентов: находившиеся на обследовании и лечении в 2003–2005 гг. (7141 человек), в 2006–2008 гг. (7990 человек) и в 2009–2011 гг. (8179 человек).

Проверка гипотезы о нормальности исследованных показателей, проведенная методом сравнения мер центральной тенденции (средней арифметической величины, медианы и моды) и с использованием критерия Колмогорова – Смирнова, позволила использовать для анализа параметрические выборочные оценки, *t*-критерий Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением с использованием критерия Ньюмена–Кейлса. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где *m* – ошибка средней арифметической величины *M*. Уровень значимости был принят равным 0,05 ($\alpha = 0,05$ или $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего у 23 310 обследованных больных выявлено 121 097 нозологических форм и 95 350 классов. Количество нозологических форм (транснозологическая полиморбидность) у одного больного равнялось $4,5 \pm 0,01$, пораженных систем организма (транссистемная полиморбидность) – $3,76 \pm 0,01$. У мужчин данные показатели составили соответственно $4,88 \pm 0,02$ и $3,92 \pm 0,02$, у женщин – $5,33 \pm 0,02$ и $4,19 \pm 0,01$ (различия между мужчинами и женщинами статистически значимы). Полученные результаты указывают на значимость полиморбидности в клинике внутренних болезней.

В дальнейшем при проведении анализа решались две задачи: 1) сравнение показателей полиморбидности у мужчин и женщин; 2) сравнительный анализ динамики показателей полиморбидности в указанных группах больных с учетом их возраста и пола.

Значения коэффициента транснозологической полиморбидности у женщин были достовер-

Таблица 1

Динамика транснозологической полиморбидности у мужчин и женщин в разных возрастных группах

Годы госпитализации	Возраст, лет	Мужчины	Женщины
2003–2005	16–39	3,56 ± 0,06	3,28 ± 0,05 ⁺
	40–59	4,42 ± 0,05	5,27 ± 0,05 ⁺⁺
	60 и старше	4,32 ± 0,07	5,04 ± 0,05 ⁺⁺
	В целом	4,19 ± 0,03	4,82 ± 0,03 ⁺⁺
2006–2008	16–39	3,86 ± 0,06*	3,97 ± 0,05**
	40–59	4,93 ± 0,05**	5,35 ± 0,05 ⁺⁺
	60 и старше	5,82 ± 0,06**	6,04 ± 0,06** ^{+,}
	В целом	4,97 ± 0,03**	5,34 ± 0,03** ^{+,++}
2009–2011	16–39	4,04 ± 0,09**	3,88 ± 0,08**
	40–59	5,45 ± 0,06** ^{##}	5,71 ± 0,05 ^{##,+}
	60 и старше	6,28 ± 0,07** ^{##}	6,61 ± 0,06** ^{##,+}
	В целом	5,49 ± 0,04** ^{##}	5,83 ± 0,04** ^{##,++}

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей (один знак – при $p < 0,05$, два знака – при $p < 0,0001$): * – в период 2003–2005 гг., # – в период 2006–2008 гг., + – мужчин.

Таблица 2

Динамика транссистемной полиморбидности у мужчин и женщин в разных возрастных группах

Годы госпитализации	Возраст, лет	Мужчины	Женщины
2003–2005	16–39	3,28 ± 0,05	3,17 ± 0,05
	40–59	3,77 ± 0,04	4,36 ± 0,03 ⁺⁺
	60 и старше	3,42 ± 0,05	3,84 ± 0,04 ⁺⁺
	В целом	3,56 ± 0,03	3,96 ± 0,02 ⁺⁺
2006–2008	16–39	3,49 ± 0,05*	3,74 ± 0,05** ^{+,}
	40–59	4,11 ± 0,03**	4,36 ± 0,03 ⁺⁺
	60 и старше	4,25 ± 0,4**	4,31 ± 0,03**
	В целом	4,03 ± 0,02** ^{##}	4,23 ± 0,02** ^{+,++}
2009–2011	16–39	3,64 ± 0,06** ^{##}	3,65 ± 0,06**
	40–59	4,22 ± 0,04** ^{##}	4,50 ± 0,03* ^{##,++}
	60 и старше	4,43 ± 0,04** ^{##}	4,48 ± 0,03** ^{##}
	В целом	4,19 ± 0,03** ^{##}	4,37 ± 0,02** ^{##,++}

но больше на 6–15 %, чем у мужчин, во все периоды. Аналогичные результаты были отмечены и при анализе гендерных особенностей значений коэффициента транссистемной полиморбидности. Очевидно, повышенное количество нозологических форм и пораженных физиологических систем организма у женщин по сравнению с мужчинами можно объяснить не только большей отягощенностью соматическими заболеваниями, но и более внимательным отношением женщин к своему здоровью. Анализ динамики транснозологической и транссистемной полиморбидности

в изучаемые периоды времени выявил ее достоверный рост (табл. 1, 2).

При исследовании зависимости динамики транснозологической и транссистемной полиморбидности от возраста пациентов установлено, что как у женщин (на 8–15 %), так и у мужчин (на 18–21 %) величина коэффициента транснозологической полиморбидности достоверно возрастала в 2006–2008 и 2009–2011 гг. по сравнению с периодом 2003–2005 гг. во всех возрастных группах. Гендерные различия транснозологической полиморбидности в периоды 2006–2008

и 2009–2011 гг. характеризовались наличием достоверно большей величины коэффициента полиморбидности у женщин, чем у мужчин, за исключением возрастной группы 16–39 лет, когда данные показатели были примерно одинаковыми у лиц обоего пола.

Изучение динамики транссистемной полиморбидности в изучаемые периоды времени в зависимости от возраста пациентов показало, что у женщин величина коэффициента транссистемной полиморбидности (см. табл. 2) в целом была достоверно выше, чем у мужчин. При этом она статистически значимо возрастала в 2006–2008 и 2009–2011 гг. по сравнению с периодом 2003–2005 гг. во всех возрастных группах лиц женского (на 15–17 %) и мужского (на 6–10 %) пола. Гендерные различия транссистемной полиморбидности характеризовались наличием значимо большей величины коэффициента полиморбидности у женщин практически всех возрастных групп по сравнению с мужчинами, за исключением лиц 60 лет и старше в периоды 2006–2008 и 2009–2011 гг.

Особое значение в формировании полиморбидности имеют нарушения сердечно-сосудистой системы, которые не только естественным образом реализуются в форме кардиологической патологии, но и определяют дальнейшее развитие болезней других физиологических систем организма человека. Метаболический синдром служит общепризнанным проявлением интегрированных нарушений функционирования сердечно-сосудистой системы и органов пищеварения [6], поэтому нами проведен анализ частоты встречаемости и динамики изолированных форм заболеваний сердечно-сосудистой системы и их сочетаний с болезнями органов пищеварения. Установлено, что в изучаемый период времени (рис. 1) частота изолированных заболеваний сердечно-сосудистой системы снижалась как у мужчин, так у женщин. Наряду с этим значимо увеличивалась доля сочетанных заболеваний сердечно-сосудистой системы и органов пищеварения (рис. 2).

Рост показателей полиморбидности делает данную проблему актуальной для современной клиники внутренних болезней. Можно было бы предположить, что увеличение полиморбидности связано с применением современных методов диагностики, однако проведенное нами исследование было осуществлено в одной клинике, при участии одних и тех же врачей, без изменений диагностической базы. Кроме того, активное внедрение фондами медицинского страхования медико-экономических стандартов, напротив, способствовало использованию врачами моно-

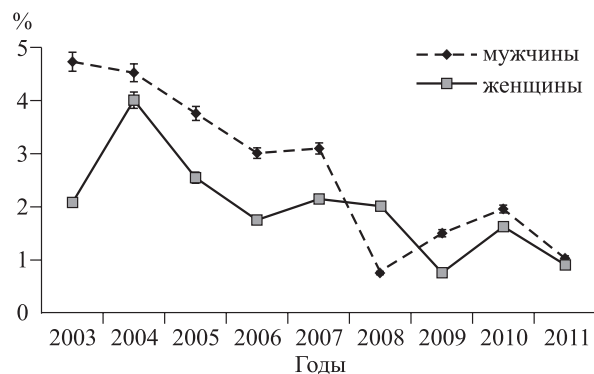


Рис. 1. Частота встречаемости изолированных форм заболеваний сердечно-сосудистой системы и органов пищеварения в период с 2003 по 2011 г. (% от больных с сердечно-сосудистой патологией)

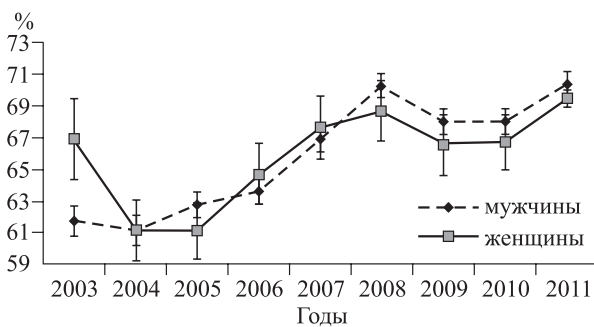


Рис. 2. Частота встречаемости сочетанных заболеваний сердечно-сосудистой системы и органов пищеварения в период с 2003 по 2011 г. (% от больных с сердечно-сосудистой патологией)

нозологической стратегии ведения больных, поэтому полученные результаты отражают объективную клиническую реальность, которая характеризуется высокими показателями полиморбидности и их интенсивным увеличением.

В настоящее время при широком понимании полиморбидности как сосуществования в определенный период времени нескольких заболеваний можно достичь определенных успехов в решении проблемы возникновения хронических неинфекционных заболеваний, преодолевая узкие мононозологические представления о функционировании всего организма [4, 5]. Профилактика хронических неинфекционных заболеваний, в том числе полиморбидной патологии, может быть более эффективной при многофакторном подходе [3]. У пациентов с поликоморбидными состояниями раньше, чем у больных с мононозологическими того же класса, ухудшается прогноз развития заболевания и снижается качество жизни [14], возникают очевидные сложности в медикаментозной терапии. В связи с этим необходима разработка оптимальной стратегии ведения па-

циентов с сочетанными нозологиями. Подобный подход позволит отойти от мононозологической стратегии помощи больным в терапевтической клинике, которая наиболее ярко выявилась при внедрении медико-экономических стандартов, что противоречит традициям отечественной терапевтической школы, заложенным М.Я. Мудровым, Г.А. Захарьиным, С.П. Боткиным: «лечить не болезнь, а больного».

ВЫВОДЫ

1. В период с 2003 по 2011 г. отмечен интенсивный рост как транснозологической, так и транссистемной полиморбидности, значения которых на одного больного достигли в среднем шести нозологических форм и превысили четыре заинтересованных физиологических системы организма.

2. Показатель коэффициента транснозологической и транссистемной полиморбидности имеет гендерные различия: у женщин он выше, чем у мужчин.

3. В период с 2003 по 2011 г. снижалась частота встречаемости изолированных форм заболеваний сердечно-сосудистой системы и возрастала величина их синтропии с болезнями органов пищеварения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белялов Ф.И. Лечение внутренних болезней в условиях коморбидности. 2-е изд. Иркутск, 2010.

2. Белялов Ф.И. Коморбидность. 2011. <http://therapy.irkutsk.ru/edcomorbid.htm>.

3. Ивашова С.С. Распространенность факторов риска неинфекционных заболеваний в неорганизованной популяции промышленного города в условиях Севера. Возможности коррекции // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009. (5). 133а–133.

4. Лазебник Л.Б. Старение и полиморбидность // Консилиум Медикум. 2005. 12. http://old.consilium-medicum.com/media/consilium/05_12/993.shtml.

5. Лазебник Л.Б. Полиморбидность и старение // Новости медицины и фармации. 2007. (1). <http://www.mif-ua.com/archive/article/3531>.

6. Митрофанов И.М., Селятицкая В.Г., Николаев Ю.А., Лутов Ю.В. Распространенность метаболического синдрома в организованной популяции // Клинич. мед. 2012. 90. (11). 47–50.

7. Митрофанов И.М., Николаев Ю.А., Долгова Н.А., Поспелова Т.И. Региональные особенности полиморбидности в современной клинике внутренних болезней // Клинич. мед. 2013. 91. (6). 26–29.

8. Николаев Ю.А., Шкурупий В.А., Митрофанов И.М., Поляков В.Я. Динамика распространенности сочетанных хронических неинфекционных заболеваний у трудящихся г. Мирного Республики Саха (Якутия) // Бюл. СО РАМН. 2012. 32. (5). 69–74.

9. Смирнова Л.Е. К проблеме коморбидности язвенно-эрозивных поражений гастродуоденальной зоны и артериальной гипертонии // Клинич. мед. 2003. (3). 9–15.

10. Bhaskaran K., Hajat S., Haines A. et al. Short term effects of temperature on risk of myocardial infarction in England and Wales: time series regression analysis of the Myocardial Ischemia National Audit Project (MINAP) registry // BMJ. 2010. (341). 3823.

11. Boyd J.H., Burke J.D. Exclusion criteria of DSM-III: a study of co-occurrence of hierarchy-free syndromes // Arch. Gen. Psychiatry. 1984. 41. 983–989.

12. Caughey G.E., Vitry A.I., Gilbert A.L., Roughton E.E. Prevalence of comorbidity of chronic diseases in Australia // BMC Public Health. 2008. 8. 221.

13. Feinstein A.R. Pre-therapeutic classification of co-morbidity in chronic disease // J. Chronic Dis. 1970. 23. (7). 455–468.

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

15. Schellevis F.G., van der Velden J., van der Lisdonk E. et al. Comorbidity of chronic diseases in general practice // J. Clin. Epidemiol. 1993. 46. 469–473.

FEATURES OF MODERN POLYMORBIDITY INTERNAL MEDICINE

**Yurii Alekseevich NIKOLAEV^{1,2}, Igor Mikhailovich MITROFANOV¹,
Tatyana Ivanovna POSPELOVA², Nina Anatol'evna DOLGOVA¹,
Vladimir Yakovlevich POLYAKOV¹**

¹ *Scientific Center for Clinical and Experimental Medicine of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

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

Abstract. The analysis of the occurrence dynamics of trans-nosologic and trans-system polymorbidity in the general therapeutic clinic over a period of 2003–2011 years has been carried out. 23310 patients (9111 males and 14199 females) underwent medical treatment in the Clinic of Scientific Center for Clinical and Experimental Medicine of SB RAMS were the object of the study. Polymorbidity indicators in men and women were assessed. The estimate was carried out both in the whole category of patients and in three age periods: 16-39 years, 40-59 years and above 60 years. It has been shown that the average number of nosological forms (trans-nosologic polymorbidity) of the patients was equal to $4,5 \pm 0,01$, and the cases of system pathology (trans-system polymorbidity) – $3,76 \pm 0,01$. In men, these indicators were $4,88 \pm 0,02$ and $3,92 \pm 0,02$, and in women $5,33 \pm 0,02$ and $4,19 \pm 0,01$ – respectively were significantly higher than in male persons. In the period from 2003 to 2011 years rapid increase both in trans-nosologic and trans-system polymorbidity was revealed, the value of which per patient on average six clinical entities have reached and exceeded four concerned the physiological systems. Coefficient of trans-nosologic and trans-system polymorbidity has gender differences. In women, it has a higher value compared to men. In the period from 2003 to 2011 the incidence of isolated forms of cardio-vascular system reduced and the value of their syntropy with the diseases of the digestive system increased.

Key words: polymorbidity, gender, age, dynamics of polymorbidity.

Nikolaev Yu.A. – doctor of medical sciences, head of the laboratory for pathogenesis of somatic diseases, chief researcher, e-mail: nicol@soramn.ru

Mitrofanov I.M. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory for pathogenesis of somatic diseases, chief researcher, e-mail: mim@soramn.ru

Pospelova T.I. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for therapy, hematology and transphysiology, e-mail: postatgem@mail.ru

Dolgova N.A. – head physician

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

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ У БОЛЬНЫХ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА С ЗУБЦОМ Q В СОЧЕТАНИИ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И БЕЗ НЕГО

Татьяна Александровна МАЛЬКОВА¹, Наталья Геннадьевна ЛОЖКИНА¹,
Юлия Игоревна РАГИНО², Андрей Дмитриевич КУИМОВ¹, Михаил Иванович ВОЕВОДА²

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

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

У 102 больных инфарктом миокарда с зубцом Q изучались маркеры воспаления в остром, подостром периодах заболевания и через 6 месяцев в зависимости от наличия или отсутствия метаболического синдрома. Полученные данные позволяют рассматривать СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8 как показатели острой воспалительной реакции, а ИЛ1-β и ФНО-α – как показатели хронического воспаления. Большинство маркеров имели более высокие концентрации при наличии метаболического синдрома.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, маркеры воспаления, метаболический синдром.

Учитывая широкое распространение острого инфаркта миокарда среди населения, высокую частоту тяжелых осложнений и смертельных исходов, существует необходимость не только разработки новых методов диагностики и лечения, но и исследования состояний, ускоряющих атерогенез, влияющих на течение заболевания и его исход.

Одним из наиболее ярких примеров комбинации факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний является метаболический синдром (МС). Актуальность выявления МС прежде всего обусловлена его высокой распространенностью – до 20 % в общей популяции, а в определенных социальных группах (курильщики, любители «fast food», гиподинамия и т. д.) до 50 % и более [11]. Это состояние является обратимым, что принципиально важно в предотвращении развития ишемической болезни сердца (ИБС), инфаркта миокарда (ИМ), сахарного диабета, артериальной гипертензии [8].

Показатель летальности в остром периоде ИМ у больных с МС в 2 раза выше, чем у пациен-

тов, не имеющих достаточного для диагностики МС сочетания факторов риска. Характерна более высокая частота развития сердечной недостаточности (класс по шкале Killip > II) и кардиогенного шока [9]. Наличие МС у больных с острым коронарным синдромом (ОКС) приводит к увеличению относительного и абсолютного риска развития внезапной сердечной смерти, рецидивирующего ИМ, возвратной ишемии миокарда на 34 и 5 % соответственно [9].

В патогенезе возникновения сосудистых осложнений при метаболическом синдроме большая роль отводится воспалительным реакциям, способствующим разрушению капсулы атеросклеротической бляшки [3, 12]. Развитие инфаркта миокарда влечет за собой возникновение системной и локальной воспалительной реакции, активацию острофазовых белков, в частности компонентов системы комплемента, С-реактивного белка (СРБ), орозомукоида, антитрипсина, калликреина, кининов [2]. К устойчивым маркерам хронического воспаления и сердечно-сосудистого

Малькова Т.А. – аспирант кафедры факультетской терапии лечебного факультета,
e-mail: murzina1984@mail.ru

Ложкина Н.Г. – к.м.н., ассистент кафедры факультетской терапии лечебного факультета,
e-mail: lozhkina.n@mail.ru

Рагино Ю.И. – д.м.н., проф., зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: ragino@mail.ru

Куимов А.Д. – д.м.н., проф. кафедры факультетской терапии лечебного факультета,
e-mail: terapia@mail.ru

Воевода М.И. – д.м.н., проф., чл.-кор. РАМН, директор, e-mail: mvovoda@ya.ru

риска относят СРБ, выработка которого регулируется цитокинами ИЛ-6, ФНО- α и др. В настоящее время идет активный поиск новых биологических соединений, содержание которых могло бы определить прогноз сосудистых катастроф. Ранее было установлено, что ряд цитокинов, медиаторов межклеточных коммуникаций на местном и системном уровнях, могут быть отнесены к подобным веществам [5, 7]. Установлено участие цитокинов в регуляции жизненно важных физиологических функций сердечно-сосудистой системы, таких как пролиферация, дифференцировка и миграция клеток, их жизнеспособность и метаболические процессы. Однако имеющиеся в литературе сведения о роли про- и противовоспалительных цитокинов, включая ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α , в прогнозе течения МС и ИБС достаточно противоречивы и требуют дальнейших исследований.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В основу работы положены результаты комплексного исследования 102 больных ИМ с зубцом Q (Q-ИМ) (средний возраст $58,8 \pm 8,5$ года), госпитализированных по поводу ОКС в течение первых 24 часов от начала заболевания в инфарктное отделение МБУЗ Городская клиническая больница № 1 г. Новосибирска с 2009 по 2011 г. и подписавших информированное согласие (одобрение Этического комитета ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, протокол № 31 от 17.02.2011). Диагноз острого ИМ во всех случаях установлен и верифицирован в соответствии со стандартами диагностики ESC/ACCF/АНА (2007). Все больные были разделены на две группы: с метаболическим синдромом (64 человека) и без него (38 человек). Критериями диагностики МС служила редакция определения МС, представленная в 2007 г. на национальном конгрессе кардиологов Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК). Помимо общеклинических и биохимических методов исследования определяли содержание в сыворотке крови С-реактивного белка, ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8. Все лабораторные исследования выполнены на базе лаборатории клинических, биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН. Концентрацию биомаркеров воспаления оценивали методом иммуноферментного анализа с помощью реактивов фирм «BIOSOURCE» (Бельгия) и «BIOMERICA» (Австрия).

При статистической обработке результатов исследования рассчитывали общепринятые пока-

затели описательной статистики: среднеарифметическую величину (M) и ошибку среднего (m), данные представлены в виде $M \pm m$. Для сравнения двух независимых выборок применяли параметрические критерии (Стьюдента), статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованиях лиц с МС доказано, что для них характерно повышение уровня такого маркера воспаления, как СРБ. ИЛ-6, секретирующийся адипоцитами, стимулирует продукцию СРБ гепатоцитами. Содержание циркулирующего ИЛ-6 и СРБ коррелирует напрямую с количеством висцерального жира.

Согласно рекомендациям ВНОК 2009 г., нормальным показателем СРБ принято считать $< 2,0$ мг/л. В исследуемых группах у мужчин содержание СРБ при поступлении и в подострую стадию превышало нормальные значения: в группе без МС – $7,8 \pm 1,6$ мг/л, в группе с МС – $8,3 \pm 2,4$ мг/л. Однако существенной разницы между группами выявлено не было ($p > 0,05$), хотя теоретически предполагалось, что для МС характерно вялотекущее хроническое воспаление, маркером которого и служит СРБ [1]. Разницы между мужчинами с МС и без МС через 6 мес. на фоне проводимого лечения также выявлено не было, но наблюдалась нормализация уровня СРБ в обеих группах (соответственно $2,9 \pm 0,8$ и $3,0 \pm 0,7$ мг/дл). Данный факт может говорить о том, что СРБ является не только показателем выраженности острого Q-ИМ, но и маркером его течения.

У женщин с Q-ИМ также наблюдалась нормализация содержания СРБ ($p < 0,05$ по сравнению с исходными величинами) на фоне терапии по истечении 6 мес. после перенесенного ИМ: до $3,4 \pm 1,7$ мг/л в группе без МС и до $2,9 \pm 0,8$ мг/л в группе с МС, статистических различий между группами не зарегистрировано. Зафиксирована существенная разница в содержании СРБ у женщин в остром и подостром периоде Q-ИМ в зависимости от наличия или отсутствия МС: соответственно $5,6 \pm 2,1$ и $5,9 \pm 1,7$ мг/л в группе без МС, $12,3 \pm 3,4$ и $8,7 \pm 1,9$ мг/л в группе с МС ($p < 0,05$). Наличие МС у женщин значительно увеличивало концентрацию СРБ в острую и подострую стадии Q-ИМ, что, вероятно, говорит о более интенсивном воспалительном процессе у данной категории пациентов.

Таким образом, зарегистрировано повышенное содержание СРБ в острую и подострую стадии Q-ИМ у мужчин и женщин с МС и у мужчин без МС. Воспаление является одновременно

ключевым звеном патогенеза метаболического синдрома и его маркером [3]. Опубликованы данные о существовании протективного противовоспалительного фенотипа лиц с висцеральным ожирением, гиперлипидемией и другими факторами высокого риска коронарной болезни, имеющих нормальные коронарные сосуды. Оказалось, что для этих людей характерен низкий уровень провоспалительных цитокинов и СРБ в плазме крови [9]. Вместе с тем отмечается нормализация уровня СРБ через 6 мес. после ИМ у пациентов всех групп. Беря во внимание полученные данные, можно сделать вывод, что СРБ является независимым маркером Q-ИМ, что подтверждает данные литературы. Кроме того, его содержание значительно снижается на фоне проводимой терапии, которая включает аспирин, дезагреганты, статины у всех больных, что говорит об эффективности трехкомпонентной терапии у пациентов как без МС, так и с МС.

Помимо СРБ, маркером хронического субклинического воспаления является ИЛ-6, продуцируемый под влиянием стресса и регулируемый уровнем катехоламинов по принципу положительной обратной связи. По данным литературы, одним из механизмов увеличения концентрации ИЛ-6 является его активный синтез в ответ на повреждение миокарда [1, 3]. На одном из этапов экспрессии ИЛ-6 подавляет синтез других цитокинов, проявляя при этом противовоспалительные свойства [15].

Учитывая, что за условную норму принимают содержание ИЛ-6 в крови $< 5,0$ пг/мл, в крови у пациентов Q-ИМ в острый период зафиксирован повышенный его уровень: у мужчин без МС и с МС $21,7 \pm 7,7$ и $16,7 \pm 7,8$ пг/мл соответственно (без достоверных различий), у женщин – $7,1 \pm 5,6$ и $33,2 \pm 16,4$ пг/мл соответственно ($p > 0,05$). В подострую стадию Q-ИМ наблюдалось снижение концентрации ИЛ-6 у пациентов всех исследуемых групп практически до нормальных значений: у мужчин без МС и с МС $7,3 \pm 1,6$ и $6,7 \pm 1,4$ пг/мл соответственно (без достоверных различий между группами), у женщин – $3,5 \pm 1,4$ и $7,1 \pm 4,8$ пг/мл соответственно ($p > 0,05$). Разница между показателями в острую стадию Q-ИМ и подострую стадию во всех случаях была достоверной ($p < 0,05$), что говорит об ИЛ-6 как о маркере острой стадии Q-ИМ. Через 6 мес. на фоне терапии у пациентов Q-ИМ зафиксировано дальнейшее понижение уровня ИЛ-6 до нормальных значений: у мужчин без МС и с МС до $4,2 \pm 1,5$ и $3,2 \pm 0,9$ пг/мл соответственно, у женщин – до $1,9 \pm 0,5$ и $3,1 \pm 1,5$ пг/мл соответственно. Разница между показателями в подострую стадию и

через 6 мес. наблюдений статистически значима ($p < 0,05$).

Итак, зафиксировано повышенное содержание ИЛ-6 в крови у пациентов с Q-ИМ в острую стадию (1–3 сутки) вне зависимости от наличия или отсутствия МС. Предположительно, это увеличение свидетельствует о системной воспалительной реакции, протекающей на фоне ИМ. Судя по разнице показателей, такая реакция наиболее интенсивно протекает у женщин, страдающих МС. На фоне терапии, проводимой в стационаре, к подострой стадии Q-ИМ (21–30 сутки) наблюдается достоверное снижение концентрации ИЛ-6 у всех пациентов и нормализация показателя у женщин без МС. Через 6 мес. содержание ИЛ-6 продолжает уменьшаться во всех исследуемых группах. Такая тенденция может объясняться дальнейшим снижением и нормализацией уровня воспаления в отдаленный период.

Относительно содержания ФНО- α при остром ИМ в литературе имеются противоречивые сведения: в некоторых публикациях демонстрируется его повышение [13], в то же время есть указания на снижение величины данного показателя при тяжелом и осложненном течении ИМ, что можно объяснить участием цитокина в апоптозе и некрозе кардиомиоцитов [9]. Продукция ФНО- α в очаге некроза сердечной мышцы усиливает выработку кислородных радикалов, пероксинитрита, которые, в свою очередь, резко снижают сократительную способность миокарда [14].

В нашем исследовании содержание ФНО- α в крови всех пациентов в острый период Q-ИМ превышало условную норму $< 2,0$ пг/мл и составило у мужчин без МС $2,7 \pm 0,4$ пг/мл, с МС – $2,6 \pm 0,2$ пг/мл, у женщин без МС $2,8 \pm 0,8$ пг/мл, с МС – $3,1 \pm 0,5$ пг/мл. Достоверных различий между группами установлено не было. В подострый период Q-ИМ наблюдалась некоторая тенденция к снижению уровня ФНО- α : у мужчин без МС до $2,2 \pm 0,3$ пг/мл, у женщин без МС до $1,6 \pm 0,8$ пг/мл, у женщин с МС до $2,5 \pm 0,3$ пг/мл (без достоверных различий между группами). У мужчин с МС наблюдалось некоторое повышение концентрации ФНО- α в подострую стадию (до $3,4 \pm 0,8$ пг/мл), которое, однако, не являлось статистически значимым. Через 6 мес. наблюдений у пациентов с Q-ИМ содержание ФНО- α в крови изменялось по-разному: у мужчин без МС оно увеличилось, превысив наблюдаемое в подострый, но не в острый период, и составило $2,5 \pm 0,3$ пг/мл, у женщин без МС наблюдалась аналогичная картина ($2,3 \pm 1,1$ пг/мл). У мужчин с МС содержание ФНО- α в отдаленный период составило $3,7 \pm 0,7$ пг/мл, у женщин с МС – $3,3 \pm 0,6$ пг/мл. Примечательно, что до-

стоверных различий между группами и в разные периоды наблюдений выявлено не было.

Отсутствие достоверных различий концентрации ФНО- α в различные периоды течения Q-ИМ, вероятно, связано с тем, что цитокин, синтезируемый в жировой ткани, реализует свои эффекты в местах синтеза, и его концентрация в крови менее показательна, чем концентрация в тканях. Другим объяснением может являться то, что ФНО- α перманентно продуцируется висцеральной жировой тканью, вне зависимости от клинических событий. Косвенным подтверждением может служить более высокое его содержание у пациентов с МС обоого пола во все периоды ОИМ.

Кроме вышеперечисленных цитокинов анализировалась концентрация в крови ИЛ-8, который синтезируется моноцитами, макрофагами, тканевыми лимфоцитами, нейтрофилами, фибробластами. Являясь хемоаттрактантом, ИЛ-8 способствует инфильтрации тканей нейтрофилами и лимфоцитами и вызывает дестабилизацию атеросклеротической бляшки [10].

Содержание ИЛ-8 в остром периоде Q-ИМ было выше условной нормы $< 10,0$ пг/мл у всех обследованных и составляло у мужчин без МС $34,5 \pm 9,6$ пг/мл, с МС – $23,9 \pm 8,6$ пг/мл, у женщин без МС $40,7 \pm 15,2$ пг/мл, с МС – $15,4 \pm 5,6$ пг/мл. Различий между группами выявлено не было. В подострый период концентрация ИЛ-8 несколько снизилась во всех группах, кроме группы женщин без МС, и достигла у мужчин без МС $9,8 \pm 2,8$ пг/мл, с МС – $16,9 \pm 7,6$ пг/мл, у женщин без МС $21,7 \pm 8,9$ пг/мл, с МС – $9,5 \pm 8,8$ пг/мл. Однако различий между группами в этот период выявлено не было, так же как и существенной разницы по сравнению с острым периодом. Через 6 мес. наблюдения концентрация ИЛ-8 существенно ($p < 0,05$ относительно острого периода) снизилась: у мужчин без МС до $1,9 \pm 0,5$ пг/мл, с МС – до $3,4 \pm 2,0$ пг/мл, у женщин без МС до $3,4 \pm 0,8$ пг/мл, с МС – до $4,4 \pm 2,1$ пг/мл. Различий между группами в данный период не выявлено.

Таким образом, в наших наблюдениях выявлено, что концентрация ИЛ-8 в крови в острый период Q-ИМ во всех группах выше условной нормы и имеет тенденцию к снижению в подострый период, причем у женщин величина показателя снижается медленнее, чем у мужчин. На 6-й мес. наблюдений содержание цитокина нормализуется, что характеризует ИЛ-8 как интерлейкин, характерный для острого периода ИМ.

Большое значение в атерогенезе придается ИЛ-1 β . По данным литературы, он участвует в нескольких механизмах: увеличивает адгезию

лейкоцитов к сосудистому эндотелию, вызывает инфильтрацию сосудистой стенки воспалительными клетками, пролиферацию гладкомышечных клеток, стимулирует прокоагулянтную активность эндотелия [10].

У всех обследованных нами групп пациентов концентрация ИЛ-1 β в острый и подострый периоды Q-ИМ была примерно одинаковой и составляла соответственно у мужчин без МС $2,0 \pm 0,5$ пг/мл и $1,7 \pm 0,5$ пг/мл, с МС – $1,3 \pm 0,3$ и $1,5 \pm 0,3$ пг/мл, у женщин без МС $1,7 \pm 0,8$ и $1,7 \pm 1,4$ пг/мл и с МС – $1,7 \pm 0,3$ и $1,7 \pm 0,3$ пг/мл. Через 6 мес. наблюдений замечено достоверное снижение концентрации ИЛ-1 β : у мужчин без МС до $0,8 \pm 0,5$ пг/мл, с МС – до $0,5 \pm 0,3$ пг/мл, у женщин с МС $0,6 \pm 0,03$ пг/мл, без МС – $2,5 \pm 1,6$ пг/мл, при этом группы статистически значимо не различались.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что ИЛ-1 β не является маркером Q-ИМ в острый и подострый периоды, его концентрация не выходит за пределы условной нормы $< 2,0$ пг/мл. Уменьшение концентрации цитокина в отдаленный период наблюдений пациентов, перенесших Q-ИМ, может свидетельствовать об эффективности патогенетической терапии. По данным литературы, нарушение коронарного кровотока с ишемией миокарда ведет к повышению уровня ИЛ-1 β в крови, а комплексная терапия ИБС, улучшающая кровоснабжение и метаболизм сердечной мышцы, способствует его снижению [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных данных, можно считать маркерами острой воспалительной реакции при Q-ИМ такие иммунологические показатели, как СРБ, ИЛ-6, ИЛ-8. В острую стадию процесса все три показателя реагируют увеличением концентрации у пациентов как с МС, так и без него. В подострую стадию и в отдаленный период наблюдения у лиц, перенесших Q-ИМ, наблюдается постепенное достоверное снижение концентрации данных маркеров в обеих наблюдаемых группах. Таким образом, ни один из определяемых маркеров воспаления у пациентов, имеющих метаболические нарушения, по сравнению с пациентами без МС, не реагирует каким-либо специфическим образом на развитие Q-ИМ.

В то же время ФНО- α и ИЛ-1 β в большей степени являются показателями хронической воспалительной реакции у больных ИБС и не реагируют статистически значимо в острую и подострую стадии Q-ИМ как при наличии МС, так и без него. В отдаленный период выявлено статистически

значимое снижение концентрации ИЛ-1 β у пациентов и с МС, и без него, что предположительно связано с эффективностью проводимой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чукаева И.И., Орлова Н.В., Евдокимов Ф.А. Изучение влияния воспаления на прогноз острой кардиоваскулярной патологии. Пути коррекции // Рос. кардиол. журн. 2009. (5). 30–34.

2. Демидова Т.Ю., Аметов А.С., Пархоменко Е.С. Ожирение – основа метаболического синдрома // Лечащий врач. 2002. (5). 28–31.

3. Лифшиц Г.И., Николаев К.Ю., Отева Э.А., Николаева А.А. Ишемическая болезнь сердца и компоненты метаболического синдрома X (семейное исследование) // Терапевт. арх. 2000. 72. (12). 10–13.

4. Карпов Ю.А., Сорокин Е.В., Фомичева О.А. Воспаление и атеросклероз: состояние проблемы и нерешенные вопросы // Сердце. 2003. 2. (4). 190–192.

5. Мазуров В.В., Столов С.В., Линецкая Н.Э. Динамика различных уровней провоспалительных цитокинов в зависимости от различных форм ИБС // Клинич. мед. 1999. (11). 23–27.

6. Мамедов М.Н. Метаболический синдром – больше, чем сочетание факторов риска: принципы диагностики и лечения. М.: Верваг фарма, 2006. 7–42.

7. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления. Новосибирск: Наука, 2001. 422 с.

8. Ольбинская Л.И., Игнатенко В.Б., Маркин С.В. Фактор некроза опухолей в плазме крови

и морфофункциональные параметры сердца у больных с хронической сердечной недостаточностью, осложнившей течение ишемической болезни сердца. Динамика под влиянием лечения // Терапевт. арх. 2003. 75. (2). 54–58.

9. Помогалова О.Г. Клинико-патогенетические особенности течения крупноочагового инфаркта миокарда при метаболическом синдроме: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2008.

10. Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Волков А.М., Воевода М.И. Факторы и механизмы нестабильной атеросклеротической бляшки. Новосибирск: Наука, 2008. 88 с.

11. Шубина А.Т., Демидова И.Ю., Карпов Ю.А. Метаболический синдром X: предпосылки к развитию артериальной гипертензии и атеросклероза // Клинич. фармакол. терапия. 2001. 10. (4). 44–47.

12. Bazzoni F., Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families // N. Engl. Med. 1996. 334. 1717–1725.

13. Das U.N. Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction // Mol. Cell. Biochem. 2000. 215. 145–152.

14. Kingwell B.A. Nitric oxide mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease // FASEB J. 2000. 14. (12). 1685–1696.

15. O'Donnell V.B., Freeman B.A. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease // Circ. Res. 2001. 88. 12–21.

INFLAMMATORY RESPONSE IN PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION WITH Q WAVES AND WITH/ WITHOUT METABOLIC SYNDROME

Tatyana Aleksandrovna MALKOVA¹, Natalia Gennad'evna LOZHKINA¹, Julia Igorevna RAGINO², Andrey Dmitrievich KUIMOV¹, Mikhail Ivanovich VOEVODA²

*1Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

*2Institute of Internal Medicine and Preventive Medicine of SB RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

Summary: 102 patients with Q wave – myocardial infarction were studied on markers of inflammation in acute, sub-acute period and in 6 months of disease, associated with the presence or absence of metabolic syndrome. The data allow us to consider CRP, IL-6, IL-8 as indicators of the acute inflammatory response, and IL1- β and TNF- α as indicators of chronic inflammation. The majority of markers have higher concentrations in the presence of metabolic syndrome.

Key words: myocardial infarction, markers of inflammation, metabolic syndrome.

Malkova T.A. – postgraduate student, e-mail: murzina1984@mail.ru

Lozhkina N.G. – candidate of medical sciences, associate professor, e-mail: lozhkina.n @ mail.ru

Ragino J.I. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of clinical biochemical and hormonal studies of therapeutic diseases, e-mail: ragino@mail.ru

Kuimov A.D. – doctor of medical sciences, professor, e-mail: terapia@mail.ru

Voevoda M.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, director, e-mail: mvoevoda@ya.ru

АКТИВНОСТЬ МЕСТНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ПАТОГЕНЕЗЕ БЕСПЛОДИЯ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СФЕРЫ

Александр Николаевич ТРУНОВ¹, Игорь Олегович МАРИНКИН²,
Виталий Михайлович КУЛЕШОВ², Ольга Михайловна ГОРБЕНКО¹,
Аля Петровна ШВАЮК¹, Ольга Олеговна ОБУХОВА¹,
Денис Евгеньевич ВАУЛИН², Лилия Алексеевна ТРУНОВА¹

¹ ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

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

С целью изучения активности местного воспалительного процесса и иммунного реагирования у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на фоне хронических воспалительных заболеваний репродуктивной сферы в стадии клинической ремиссии определено содержание ФНО- α , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, МСР-1, интерферона- γ , аутоантител к антигенам нативной ДНК, циркулирующих иммунных комплексов в перитонеальной жидкости. Установлено, что в механизмах развития бесплодия, возникшего на фоне воспалительных процессов репродуктивной сферы, значимую роль играет активация местного воспалительного процесса, о чем свидетельствует достоверное повышение в перитонеальной жидкости пациенток концентраций биологических субстанций, обладающих провоспалительной активностью (ФНО- α , ИЛ-6, МСР-1), маркера клеточной деструкции аутоантител к антигенам нативной ДНК, индукторов иммунного реагирования (ИЛ-4 и интерферон- γ) и интегрального показателя активации гуморального звена иммунной системы (ЦИК). Установленная активность местного иммуновоспалительного процесса при клинической ремиссии воспалительного процесса репродуктивной сферы является значимым фактором возникновения и развития бесплодия.

Ключевые слова: бесплодие, хроническое воспаление, иммунное реагирование, цитокины.

В настоящее время развитие репродуктивных технологий позволило решить многие проблемы, существующие в акушерстве и гинекологии. Однако приходится констатировать, что в современных условиях распространенность и частота встречаемости бесплодия не имеют тенденции к снижению [9, 13, 16, 19, 20]. Проведенный анализ литературы, а также данные, полученные в собственных исследованиях, позволили сделать заключение о том, что в патогенезе женского бесплодия, невынашивания беременности и других осложнений процессов гестации значимую роль играет высокая распространенность инфекцион-

но-воспалительных заболеваний органов репродуктивной сферы у женщин детородного возраста [6–8, 11, 17, 18].

В настоящее время достаточно полно изучена роль иммунных нарушений в патогенезе острых и обострений хронических инфекционно-воспалительных заболеваний репродуктивной сферы у женщин, показана активность иммуновоспалительного процесса, наличие дисбаланса медиаторов межклеточных взаимоотношений цитокинов, а также его влияние на нарушение синтеза ряда половых гормонов, играющих значимую роль в процессах репродукции. При этом необходимо

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

Маринкин И.О. – д.м.н., проф., зав. кафедрой акушерства и гинекологии, e-mail: rectorngmu@yandex.ru

Кулешов В.М. – д.м.н., проф., проф. кафедры акушерства и гинекологии, e-mail: kuleshov_ym@mail.ru

Горбенко О.М. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: trunov1963@yandex.ru

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

Обухова О.О. – д.м.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: trio188@yandex.ru

Ваулин Д.Е. – врач-акушер-гинеколог, аспирант кафедры акушерства и гинекологии, e-mail: kuleshov_ym@mail.ru

Трунова Л.А. – д.м.н., проф., чл.-кор. РАМН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии репродукции, e-mail: trunov1963@yandex.ru

отметить, что при физиологическом течении беременности, начиная с ранних сроков, отмечается преобладание цитокинов, определяющих развитие иммунного ответа по пути, опосредованному лимфоцитами Т-хелпер-2, которые, блокируя реакции клеточного иммунитета, способствуют инвазии трофобласта, развитию беременности, а вызываемое длительным дисбалансом цитокинов нарушение иммуоэндокринной регуляции при хроническом воспалении органов малого таза приводит к возникновению бесплодия [1–5, 10, 12, 13, 15].

В то же время в период зачатия у основной части женщин воспалительные заболевания репродуктивной сферы находятся в стадии клинической ремиссии, в этот период они не предъявляют жалоб и не обращаются за медицинской помощью. Указанное приводит к тому, что данные об иммуоэндокринных нарушениях и активности воспаления в этой стадии патологического процесса, которая во многом определяют дальнейшее развитие заболевания и влияет на процессы гестации, представлены единичными работами и требуют углубленного изучения для понимания их роли в возможном формировании бесплодия [6, 7, 18].

Все вышеизложенное определяет научно-практическую значимость исследований, посвященных углубленному изучению иммуопатогенеза хронических воспалительных заболеваний урогенитальной сферы в стадии клинической ремиссии у женщин репродуктивного возраста с бесплодием, и позволило сформулировать цель настоящего исследования – изучить активность местного воспалительного процесса и иммунного реагирования у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на фоне хронических воспалительных заболеваний репродуктивной сферы в стадии клинической ремиссии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 65 женщин репродуктивного возраста. Основную группу составили 50 пациенток в возрасте 23–36 лет с верифицированным диагнозом бесплодия трубно-перитонеального генеза на фоне хронических воспалительных заболеваний органов малого таза в стадии клинической ремиссии, у которых во время плановой хирургической лапароскопии с целью коррекции причин бесплодия был проведен забор перитонеальной жидкости. Длительность бесплодия в группе составила от 4 до 13 лет.

В группу сравнения вошли 15 женщин репродуктивного возраста (25–37 лет), у которых во время диагностической лапароскопии с целью

исключения женского фактора бесплодия также был проведен забор перитонеальной жидкости. Критерием включения в контрольную группу было отсутствие у пациенток в анамнезе хронических инфекционно-воспалительных заболеваний урогенитальной сферы, признаков хронических воспалительных заболеваний придатков матки при лапароскопии и выраженное снижение фертильности мужа.

У всех пациенток было получено информированное согласие на использование данных обследования в научных целях и согласие этического комитета на проведение исследования. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.).

Определение концентраций цитокинов ФНО- α , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, интерферона- γ выполняли с использованием коммерческих тест-систем ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) по инструкции производителя. Содержание MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) и аутоантител к антигенам нативной ДНК (ААТ к АГ нДНК) измеряли с использованием коммерческих тест-систем производства Вектор-Бест (Кольцово) по инструкции производителя. Определение содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) проводили методом жидкостной преципитации в 4 % полиэтиленгликоле-6000 на 0,01М боратном буфере (рН 8,4). Все измерения выполняли в перитонеальной жидкости. Результаты иммуоферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре «Униплан» при длине волны 450 нм.

Полученные цифровые данные были подвергнуты математическому анализу, вычисляли среднее арифметическое значение (M) и ошибку среднего арифметического значения (m). Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, в связанных попарно выборках – с помощью критерия Вилкоксона. Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$. Статистически значимым считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем достоверной вероятности 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные клинического и общелабораторного обследования позволили установить, что у пациенток основной группы с бесплодием на фоне клинической ремиссии хронических инфекционно-воспалительных заболеваний органов репродуктивной сферы отсутствовали субъективные жалобы, повышенная температура тела; количе-

Таблица

Содержание изучаемых показателей
в перитонеальной жидкости пациенток
обследованных групп ($M \pm t$)

Показатель (содержание)	Группа сравнения, $n = 15$	Основная группа, $n = 50$
ФНО- α , пг/мл	13,7 \pm 1,1	23,6 \pm 0,9*
ИЛ-4, пг/мл	15,7 \pm 0,8	23,7 \pm 1,6*
ИЛ-6, пг/мл	19,3 \pm 1,3	68,1 \pm 10,9*
ИЛ-10, пг/мл	18,5 \pm 2,6	23,3 \pm 3,1
Интерферон- γ , пг/мл	20,8 \pm 1,9	94,2 \pm 8,1*
МСР1, пг/мл	148,2 \pm 3,1	394,6 \pm 62,1*
Аутоантитела к АГ нДНК, МЕ/мл	6,4 \pm 0,9*	13,7 \pm 1,7*
ЦИК, усл. ед.	17,9 \pm 1,5*	37,2 \pm 3,4*

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

ство лейкоцитов, формула крови и СОЭ не выходили за пределы нормативных значений.

В перитонеальной жидкости пациенток основной группы выявлено достоверное, в 1,72 раза, увеличение содержания провоспалительного цитокина ФНО- α (см. таблицу). Высокая концентрация этого цитокина наблюдается при многих осложнениях физиологического течения беременности, что позволяет рассматривать его как неблагоприятный фактор для процессов зачатия и гестации. Кроме того, полученные данные подтверждают сделанное выше заключение о том, что при ремиссии патологического процесса определяется активность воспалительного процесса.

Концентрация интерферона- γ в перитонеальной жидкости пациенток основной группы была достоверно, в 4,52 раза, выше, чем у женщин группы сравнения. Интерферон- γ – важнейший эндогенный иммуностимулятор, необходимый для развития специфического иммунного реагирования, нарастание его синтеза связано с активацией Т-хелпер-1-пути иммунного реагирования и развитием воспаления. Увеличение содержания интерферона- γ характерно для многих осложнений физиологического течения беременности, что также рассматривается как неблагоприятный фактор для процессов зачатия и гестации. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что при ремиссии патологического процесса определяется активация индуцибельной фазы иммунного реагирования в ответ на антигенную стимуляцию.

Определение содержания в перитонеальной жидкости индуктора гуморального звена иммунной системы ИЛ-4, активация которого характерна для инфекций бактериальной этиологии, у

обследованных пациенток основной группы выявило его достоверное, в 1,51 раза, возрастание относительно значений изучаемого показателя в группе сравнения ($p < 0,05$). Выявленную закономерность можно расценивать как реакцию иммунной системы, направленную на стимуляцию синтеза антител и развитие гуморального иммунного ответа в ответ на персистенцию возбудителей патологического процесса из очага хронического воспаления.

При определении в перитонеальной жидкости концентрации ИЛ-6 – провоспалительного цитокина, участвующего в активации синтеза специфических антител во второй фазе иммунного ответа и процессах хронизации, в том числе и при инфекционно-воспалительных заболеваниях бактериальной этиологии, обнаружено ее достоверное, в 3,5 раза, повышение у обследованных пациенток основной группы относительно значений изучаемого показателя в группе сравнения ($p < 0,05$).

По концентрации в перитонеальной жидкости ИЛ-10, цитокина, обладающего противовоспалительными и иммуносупрессорными свойствами, пациентки обследованных групп не различались.

Несомненный интерес представляют данные, полученные при определении содержания в перитонеальной жидкости МСР-1, являющегося мощным хемотаксическим и активирующим белком для клеток макрофагально-моноцитарного ряда: у пациенток основной группы оно было достоверно, в 2,6 раза, выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). Выявленную закономерность можно расценивать как факт, подтверждающий предположение о наличии активности местного воспалительного процесса у пациенток основной группы, вероятно, в ответ на постоянную персистенцию этиологического фактора из очага хронического воспаления.

При определении в перитонеальной жидкости пациенток концентрации ААТ к АГ нДНК, универсального маркера, отражающего выраженность клеточной деструкции и аутоиммунного реагирования и появляющегося в циркуляции при разрушении клеточных мембран и освобождении ядерного вещества, обнаружено ее достоверное увеличение (в 2,1 раза) у обследованных пациенток основной группы относительно величины изучаемого показателя в группе сравнения ($p < 0,05$).

ЦИК отводится значимая роль в поддержании иммунного гомеостаза при инфекционно-воспалительных заболеваниях, особенно вызываемых бактериальной микрофлорой. В результате проведенного исследования установлено, что в перитонеальной жидкости пациенток основной группы

содержание ЦИК достоверно, в 2,1 раза, превышает значения показателя контрольной группы ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что, несмотря на отсутствие клинических проявлений хронического воспаления и нормативных значений общелабораторных анализов, у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на фоне хронического воспалительного процесса органов малого таза в стадии клинической ремиссии выявляется активность местного деструктивно-воспалительного процесса. Указанное подтверждается достоверным повышением в перитонеальной жидкости пациенток основной группы концентраций биологически активных веществ, являющихся маркерами активности воспаления (провоспалительные цитокины ФНО- α , ИЛ-6, MCP-1) и клеточной деструкции (ААТ к АГ нДНК). Развитие воспалительного процесса у обследованных пациенток основной группы сопровождается активацией иммунного ответа на постоянную антигенную стимуляцию из очага хронического воспаления, о чем свидетельствует достоверное увеличение в перитонеальной жидкости содержания индукторов гуморального и клеточного иммунитета (интерферон- γ , ИЛ-4), а также интегрального показателя активации гуморального иммунного ответа – циркулирующих иммунных комплексов. Выявленные нарушения являются значимым фактором возникновения и развития бесплодия, поскольку наличие очага хронического воспаления в органах репродуктивной системы создает неблагоприятный для возникновения и развития беременности баланс цитокинов и способно вызвать структурно-функциональные нарушения в репродуктивной системе женщин с развитием иммуноэндокринных нарушений [2–4, 7, 10, 14, 15, 18].

Полученные данные позволяют считать, что при проведении лечебных мероприятий у женщин с бесплодием на фоне хронических воспалительных заболеваний репродуктивной сферы необходимы разработка и использование патогенетически обоснованных методов лечения, включая рациональную санацию с использованием методов иммунокоррекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каграманова Ж.А., Сускова В.С., Гусева Т.С. и др. Клинико-иммунологическое обоснование иммунотерапии больных с острыми воспалительными заболеваниями придатков матки // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2006. (5). 29–33.
2. Радзинский В.Е., Запертова Е.Ю. Прогестеронобусловленные изменения провоспалительных цитокинов при привычном невынашивании беременности // Рус. мед. журн. 2004. (13). 25–28.
3. Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Крошкина Н.В. и др. Роль ранних нарушений продукции цитокинов в формировании патологии беременности // Рос. иммунол. журн. 2007. (3–4). 258–265.
4. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммунология беременности. М., 2003. 400 с.
5. Трунов А.Н., Ефремов А.В., Трунова Л.А. Принципы патогенетически обоснованной диагностики при иммуномодулирующей терапии хронических инфекционно-воспалительных заболеваний // Аллергол. иммунол. 2002. (1). 117–122.
6. Трунова Л.А., Горбенко О.М., Шваюк А.П. и др. Активность иммунновоспалительного процесса у женщин репродуктивного возраста с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями придатков матки в стадии клинической ремиссии // Бюл. СО РАМН. 2008. (1). 80–83.
7. Трунова Л.А., Горбенко О.М., Шваюк А.П. и др. Особенности иммунного реагирования у девушек пубертатного возраста с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза в стадии ремиссии // Int. J. Immunorehabilitat. 2010. (2). 93–96.
8. Фролов М.В., Халим Х. Оценка репродуктивной функции женщин при острых и хронических воспалительных заболеваниях придатков матки // Вестн. Воронежск. гос. технич. ун-та. 2006. (7). 21–26.
9. Устинов Т.А., Артымук Н.В., Власов В.В., Пыжов А.Ю. Бесплодие в Кемеровской области // Мать и дитя в Кузбассе. 2010. (1). 37–39.
10. Das C., Kumar V.S., Gupta S., Kumar S. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells // J. Reprod. Immunol. 2002. 53. (1–2). 257–268.
11. Genc M.R., Ford C.E. The clinical use of inflammatory markers during pregnancy // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2010. 22. (2). 116–121.
12. Lee S.A., Tsai H.T., Ou H.C. et al. Plasma interleukin-1beta, -6, -8 and tumor necrosis factor-alpha as highly informative markers of pelvic inflammatory disease // Clin. Chem. Lab. Med. 2008. 46. (7). 997–1003.
13. Milewski R., Milewska A.J., Czerniecki J. et al. Analysis of the demographic profile of patients treated for infertility using assisted reproductive techniques in 2005–2010 // Ginekol. Pol. 2013. 84. (7). 609–614.
14. Ng S.C., Gilman-Sachs A., Thaker P. Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy // Am. J. Reprod. Immunol. 2002. 48. (2). 77–86.
15. Romero R., Gotsch F., Pineles B., Kusanovic J.P. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive

physiology, obstetrical complications, and fetal injury // Nutr. Rev. 2007. 65. (12). 194–202.

16. Rouchou B. Consequences of infertility in developing countries // Perspect. Public Health. 2013. 133. (3). 174–179.

17. Smith M., Hagerty K.A., Skipper B., Bocklage T. Chronic endometritis: a combined histopathologic and clinical review of cases from 2002 to 2007 // Int. J. Gynecol. Pathol. 2010. 29. (1). 44–50.

18. Trunov A., Obukhova O., Gorbenko O. et al. Cytokines, estradiol and progesterone in the plasma of

women of reproductive age with pelvic inflammatory disease in remission // Adv. Biosci. Biotechnol. 2013. 4. (6). 727–730.

19. Van Oostrum N., De Sutter P., Meys J., Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis // Hum. Reprod. 2013. 28. (7). 1809–1815.

20. Ziller V., Hadji P., Thielscher C. et al. Prevalence of female subfertility in German gynecological practices // Gynecol. Endocrinol. 2013. 29. (8). 767–770.

ACTIVITY OF THE LOCAL INFLAMMATORY PROCESSES IN THE PATHOGENESIS OF THE INFERTILITY IN WOMEN WITH CHRONIC INFLAMMATION OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM

Aleksandr Nikolaevich TRUNOV², Igor Olegovich MARINKIN¹, Vitali Mikhailovich KULESHOV¹,
Olga Mikhailovna GORBENKO², Alja Petrovna SHVAYUK², Olga Olegovna OBUKHOVA²,
Denis Evgenovich VAULIN¹, Lilia Alekseevna TRUNOVA²

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

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

The aim of the study was to investigate the activity of a local inflammatory process and the immune response in women of reproductive age with infertility and chronic inflammatory diseases of reproductive areas in clinical remission. The content of TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , MCP-1, circulating immune complexes in the peritoneal fluid was determined. It has been revealed that in the mechanisms of infertility arising amid chronic inflammatory disease of reproductive sphere important role plays activation the local inflammatory process, as evidenced by the significant increase in the concentrations of biological substances with pro-inflammatory activity (TNF- α , IL-6, MCP-1), inducers of an immune response (IL-4 and IFN- γ), markers of cellular destruction, autoantibodies to antigens of native DNA and levels of the integral index of activation of humoral immune system - circulating immune complexes in peritoneal fluid. The activation of the local immuno-inflammatory process in clinical remission of chronic inflammatory disease of reproductive sphere is a significant factor in the emergence and development of infertility.

Key words: Infertility, chronic inflammation, immune response, cytokines.

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

Marinkin I.O. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair of obstetrics and gynecology, e-mail: rectorngmu@yandex.ru

Kuleshov V.M. – doctor of medical sciences, professor of the chair of obstetrics and gynecology, e-mail: kuleshov_vm@mail.ru

Gorbenko O.M. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail: trunov1963@yandex.ru

Shvayuk A.P. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail: trunov1963@yandex.ru

Obukhova O.O. – doctor of medical sciences, leading researcher, e-mail: trio188@yandex.ru

Vaulin D.E. – obstetrician-gynecologist, postgraduate student of the chair for obstetrics and gynecology, e-mail: kuleshov_vm@mail.ru

Trunova L.A. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, chief researcher of the laboratory of immunology of reproduction, e-mail: trunov1963@yandex.ru

ДЕФОРМИРУЮЩАЯ ДОРСОПАТИЯ У ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАНИЕМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, ДИСЛИПИДЕМИИ, ОЖИРЕНИЯ: ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ

Нина Анатольевна ДОЛГОВА¹, Вячеслав Алексеевич ШКУРУПИЙ^{1,2},
Анна Валентиновна ЯКИМОВА², Наталья Петровна ДОБРОВОЛЬСКАЯ¹

¹ ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

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

Деформирующая дорсопатия, диагностируемая более чем у 45 % населения в развитых странах, нередко возникает у пациентов с метаболическим синдромом. В связи с этим представляется актуальной адекватная терапия сочетания этих патологических состояний. В исследовании приняли участие 73 пациента в возрасте старше 55 лет с остеохондрозом позвоночника в стадии обострения в сочетании с метаболическим синдромом, случайным образом разделенные на 2 группы: 46 человек составили основную группу и 27 – группу сравнения. Пациентам основной группы с целью лечения вертеброгенной дорсопатии, купирования дорсалгии назначали комплексный препарат (бромелаин 450 FIP, трипсин 1440 FIP, рутозид 100 мг) и общепринятое лечение (лечебно-охранительный режим, диета, хондропротекторы, миорелаксанты, диклофенак натрия), пациентам группы сравнения – только общепринятое лечение. Оценку болевого и астенического синдрома проводили однократно до начала лечения и ежедневно во время лечения. До лечения и через 12 дней после его начала оценивали общий анализ крови, липидный спектр, содержание глюкозы, белков острой фазы, состояние системы гемостаза. Установлено, что применение системной энзимотерапии в лечении коморбидных состояний: дорсопатии, артериальной гипертензии в сочетании с дислипидемией и нарушениями углеводного обмена позволяет не только уменьшить проявления воспалительного процесса, но и осуществить профилактику тромбообразования, соответственно, снижая риск фатальных осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: коморбидные состояния, дорсопатия, метаболический синдром, дислипидемия, энзимотерапия.

Дорсопатии, основное проявление заболеваний опорно-двигательного аппарата, представляют собой широко распространенный вид патологии, которую диагностируют более чем у 45 % населения в развитых странах [1]. В соответствии с Международной классификацией болезней (МКБ-10) дорсопатии подразделяются на деформирующие дорсопатии, спондилопатии, другие дорсопатии (дегенерации межпозвоночных дисков, симпаталгические синдромы). Среди деформирующих дорсопатий наиболее часто встречается остеохондроз позвоночника, проявляющийся дорсалгией, приводящей к снижению физической активности пациентов, качества их жизни. Дорсалгия, даже как отдельный симптом, без учета причин, его вызывающих, отрицательно влияет

на качество жизни 15–25 % взрослого населения нашей страны [1]. Нередко дорсопатия возникает у пациентов с коморбидной патологией: ожирением, в частности абдоминальным, атерогенной дислипидемией и нарушением углеводного обмена, артериальной гипертензией – симптомокомплексом, известным как метаболический синдром. Единой концепции метаболического синдрома для лиц мужского и женского пола не существует, поскольку формирование метаболического синдрома у мужчин находится в прямой зависимости от выраженности абдоминального ожирения, а у женщин такая зависимость появляется только с наступлением менопаузы и гипострогенемии. Для данного коморбидного состояния характерно патогенетически обусловленное

Долгова Н.А. – главный врач, e-mail: novdolgova@yandex.ru

Шкурупий В.А. – д.м.н., проф., академик РАМН, зав. кафедрой патологической анатомии, директор, e-mail: sck@soramp.ru

Якимова А.В. – д.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии, e-mail: yakimova@hotmail.com

Добровольская Н.П. – зав. отделением

усугубление проявлений каждого из заболеваний, повышение риска cerebro- и сердечно-сосудистых катастроф. В связи с этим представляется актуальной адекватная терапия сочетания этих патологических состояний.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 73 пациента в возрасте старше 55 лет с остеохондрозом позвоночника в стадии обострения в сочетании с метаболическим синдромом, случайным образом разделенные на 2 группы: 46 человек составили основную группу (группа 1) и 27 – группу сравнения (группа 2). Средний возраст пациентов основной группы составил $57,0 \pm 4,1$ года, пациентов группы сравнения – $59,0 \pm 3,2$ года. Все пациенты имели ожирение: индекс массы тела пациентов основной группы в среднем составил $34,9 \pm 2,9$, в группе сравнения – $35,3 \pm 2,1$.

Из исследования были исключены пациенты, у которых остеохондроз позвоночника сочетался с любой соматической патологией в стадии декомпенсации, отказавшиеся от участия и, с целью исключения полипрагмазии, получавшие более четырех базовых препаратов на момент поступления в стационар.

Пациентам основной группы с целью лечения деформирующей дорсопатии, купирования дорсалгии назначали комплексный энзимный препарат (состав: бромелаин 450 FIP, трипсин 1440 FIP, рутозид 100 мг) по 2 таблетки 3 раза в день *per os* за 30–40 мин до еды, одновременно проводили общепринятое лечение (лечебно-охранительный режим, диета, физиотерапия, рефлексотерапия, хондропротекторы, миорелаксанты, нестероидные противовоспалительные препараты (диклофенак натрия)). В группе сравнения назначали только общепринятое лечение.

Оценку болевого и астенического синдрома выполняли однократно до начала лечения и ежедневно во время лечения. До лечения и через 12 дней после его начала проводили обследование, включавшее в себя общий анализ крови,

определение липидного спектра, сахара крови, состояния системы гемостаза (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), отношение АЧТВ пациента/АЧТВ контроля, международное нормализованное отношение, содержание протромбина по Квику, тромбиновое время, тромбиновое отношение, содержание растворимых фибрин-мономерных комплексов, антитромбина III, Хагеман-зависимая фибринолитическая активность), концентрации белков острой фазы.

Клинически эффективность лечения оценивали по шкале боли ВАШ. Подсчитывали средние значения (M) и ошибку среднего (m) для изучаемых параметров в группах до и после проведенной терапии и оценивали статистическую значимость различий показателей в основной группе до и после лечения и между группами путем вычисления критерия равенства дисперсий Ливиня и критерия Стьюдента. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уменьшение болевого синдрома в результате лечения было отмечено в обеих группах (табл. 1), что свидетельствует об одинаковой эффективности диклофенака натрия и комплексного энзимного препарата системного действия при лечении деформирующей дорсопатии в стадии обострения у пациентов с метаболическим синдромом. Полученные данные согласуются с опубликованными в научной литературе сведениями об эффективности системной энзимотерапии при лечении заболеваний опорно-двигательной системы – реактивного артрита, ревматоидного артрита и др. [2]. Примененный нами препарат системной энзимотерапии за счет входящих в его состав ферментов обладает противовоспалительным (бромелаин), противоотечным (бромелаин, трипсин), фибринолитическим (трипсин), иммуномодулирующим (бромелаин, трипсин) и вторично-анальгезирующим действием. В организме ферменты вступают во взаимодействие с $\alpha 2$ -макроглобулином по типу конкурентного ингибирования, и протеоли-

Таблица 1

Результаты исследования выраженности болевого синдрома пациентов до и после лечения ($M \pm m$)

Показатель	Группа обследованных			
	1 (основная)		2 (сравнения)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Выраженность болевого синдрома, баллы	$6,4 \pm 0,2$	$1,67 \pm 0,13^{***}$	$6,47 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,26^{***}$

Примечание. Здесь и табл. 2, 3 обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей до лечения (* – $p < 0,02$, ** – $p < 0,001$, *** – $p < 0,0001$) и пациентов 1-й группы (# – $p < 0,02$).

тические реакции в дальнейшем осуществляются комплексом фермент – α 2-макроглобулин [5]. Протеиназы в комплексе с α 2-макроглобулином способны расщеплять медиаторы воспаления, что является одним из механизмов анальгетического, противоотечного и противовоспалительного действия ферментов [8]. Вторичное анальгетическое действие энзимов проявляется и за счет косвенного влияния в виде уменьшения отека тканей и сдавления нервных окончаний, а также устранения ишемии вследствие нормализации микроциркуляции [2, 3, 6]. В результате этого болевой синдром регрессирует.

Малозначительные побочные эффекты терапии (метеоризм, послабление стула, неприятные ощущения в мезогастральной области) имели место в обеих группах – 3 случая в основной группе и 4 – в группе сравнения. Аллергических реакций не отмечено.

При клиническом исследовании крови статистически значимых различий до лечения между группами отмечено не было. После проведенного лечения в группе сравнения не происходило статистически значимых изменений изучаемых показателей, тогда как у пациентов, дополнительно получавших энзимотерапию, было отмечено снижение относительного числа нейтрофильных лейкоцитов в периферической крови, а общее количество лейкоцитов после лечения было статистически значимо меньше, чем в периферической крови пациентов, получавших только стандартное лечение сочетанной патологии (табл. 2). Такое изменение лейкоцитарной формулы, возможно, свидетельствует о более быстром регрессе воспалительного процесса у пациентов основной группы.

При биохимическом исследовании крови пациентов группы сравнения к 12 суткам отмечено увеличение содержания С-реактивного белка (с $4,53 \pm 0,19$ до $5,38 \pm 0,24$ ед.) ($p = 0,01$), которое было статистически значимо ($p = 0,0001$) выше, чем в основной группе. У пациентов ос-

новной группы значимой динамики уровня С-реактивного белка крови не было (до лечения – $4,20 \pm 0,24$, после – $4,21 \pm 0,09$ ед.) ($p = 0,9$). Это наблюдение может свидетельствовать о более оптимальном развитии воспалительного процесса в основной группе пациентов, чем у пациентов группы сравнения, и подтверждает ранее опубликованные нами данные о положительном влиянии энзимотерапии на течение воспалительного процесса [6]. Наши результаты согласуются с результатами исследований, приведенными в литературе: системная энзимотерапия положительно влияет на четыре основных механизма воспаления при дорсопатии (высвобождение медиаторов воспаления, модуляцию действия молекул адгезии, редукцию иммунных комплексов, активацию фибринолиза). Под действием протеолитических ферментов происходит улучшение реологических свойств крови и микроциркуляции, снижение отека тканей, активация фагоцитоза, элиминация тканевого детрита из очага воспаления [1, 2, 7].

При динамическом наблюдении не выявлено значимого изменения, по сравнению с исходным уровнем, количества тромбоцитов периферической крови. Однако у пациентов основной группы в отличие от лиц группы сравнения имело место уменьшение агрегации тромбоцитов с $103,2 \pm 2,0$ до $90,0 \pm 1,4$ % ($p = 0,0001$). Этот эффект, вероятно, следует отнести за счет влияния сложносоставного энзимного препарата, который, как было показано в работах других исследователей, снижает вязкость крови и риск образования тромбов в сосудах, способствует лизису уже образовавшихся тромбов [4].

При исследовании иных показателей гемостаза в основной группе пациентов статистически значимых изменений в результате лечения выявлено не было.

В группе сравнения значимых изменений показателей липидного спектра в результате лечения не произошло, в то время как в основной группе уменьшился общий уровень холестерина

Таблица 2

Результаты общего анализа крови пациентов до и после лечения ($M \pm t$)

Показатель	Группа обследованных			
	1 (основная)		2 (сравнения)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Содержание эритроцитов, $\times 10^{12}/л$	$4,87 \pm 0,09$	$4,81 \pm 0,07$	$4,97 \pm 0,16$	$4,98 \pm 0,10$
Гематокрит, %	$40,3 \pm 1,0$	$40,8 \pm 0,6$	$43,0 \pm 1,2$	$42 \pm 0,7$
Содержание тромбоцитов, $\times 10^9/л$	272 ± 9	259 ± 14	217 ± 12	232 ± 12
Содержание лейкоцитов, $\times 10^9/л$	$6,8 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,7$	$8,2 \pm 0,7\#$
Содержание нейтрофилов, %	$58,8 \pm 1,4$	$53,0 \pm 1,7^*$	$55,6 \pm 2,0$	$61,8 \pm 3,0\#$

Таблица 3

Результаты исследования показателей липидного спектра пациентов до и после лечения ($M \pm m$)

Показатель	Группа обследованных			
	1 (основная)		2 (сравнения)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Содержание общего холестерина, ммоль/л	6,44 ± 0,20	5,37 ± 0,21**	5,67 ± 0,27	6,0 ± 0,14#
Содержание α-холестерина, ммоль/л	1,29 ± 0,06	1,19 ± 0,06	1,19 ± 0,10	1,18 ± 0,10
Содержание холестерина липопротеинов низкой плотности, ммоль/л	3,9 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Содержание триглицеридов, ммоль/л	2,73 ± 0,24	2,64 ± 0,38	2,46 ± 0,20	2,04 ± 0,10
Коэффициент атерогенности, усл. ед.	4,05 ± 0,36	3,99 ± 0,28	4,49 ± 0,80	3,75 ± 0,30

(табл. 3), что можно расценить как значимое влияние энзимотерапии: как известно из литературы [4], дислипидемия вносит существенный вклад в функциональную гиперактивность тромбоцитов, при гиперхолестеринемии имеет место патологическое усиление выделения тромбоксана А₂ с повышением агрегационной активности тромбоцитов. Это связано с наличием на поверхности тромбоцитов рецепторов к аполипопротеинам В и Е. С другой стороны, липопротеины высокой плотности снижают продукцию тромбоксана, ингибируя агрегацию тромбоцитов, за счет связывания со специфическими рецепторами [4]. Следовательно, при метаболическом синдроме у пациентов старшего возраста повышается риск развития мозгового инсульта и инфаркта миокарда.

ВЫВОД

Применение системной энзимотерапии в лечении коморбидных состояний (дорсопатии, артериальной гипертензии в сочетании с дислипидемией и нарушениями углеводного обмена) позволяет не только уменьшить проявления воспалительного процесса, но и осуществить профилактику тромбообразования, соответственно снижая риск фатальных осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронай Н.Г., Доронина О.Б. Применение системной энзимотерапии при дорсопатии у па-

циентов с недифференцированной дисплазией соединительной ткани // Бюл. сибирской мед. 2008. (Прил. 1). 196–199.

2. Зборовский А.Б., Стажаров М.Ю., Мозговая Е.Э. Системная энзимотерапия в лечении ревматических заболеваний // Научно-практич. ревматол. 2003. (1). 64–69.

3. Палехов А.В., Минаев С.В. Организационно-методические аспекты паллиативной помощи онкологическим больным в Ставропольском крае // Паллиативная медицина и реабилитация. 2000. (4). 53–54.

4. Ретина М.А., Корзо Т.М., Зинина Т.А., Рискевич С.И. Коррекция нарушений сосудисто-тромбоцитарного гемостаза в пери- и постменопаузе с помощью препарата Флогэнзим // Журн. акушерства и женских болезней. 1999. 58. (3). 25–29.

5. Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения / Ред. К.Н. Веремеенко, В.Н. Коваленко. Киев: Морион, 2000. 320 с.

6. Якимова А.В., Иевлев-Дунтау А.П., Липский К.А. и др. Влияние полиферментного препарата «вобэнзим» на активность деструктивно-воспалительного процесса при комплексной терапии туберкулеза легких // Туберкулез и болезни легких. 2010. (6). 47–52.

7. Kleine M.W., Pabst H. Die Wirkung einer oralen Enzymtherapie auf experimentell erzeugte Hämatome // Forum Prakt. Allgemeinärztes. 1988. 27. 42.

8. LaMarre J., Wollenberg G., Gonias S. et al. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated α₂-macroglobulin // Lab. Invest. 1991. 65. 3–14.

DEFORMING DORSOPATHY IN PATIENTS WITH THE COMBINATION OF ARTERIAL HYPERTENSION, DYSLIPIDEMIA, OBESITY: POSSIBLE SOLUTIONS OF THE PROBLEM

**Nina Anatol'evna DOLGOVA¹, Vyacheslav Alekseevich SHKURUPI^{1,2},
Anna Valentinovna YAKIMOVA², Nataliya Petrovna DOBROVOLSKAYA¹**

¹ *Scientific Centre of Clinical and Experimental Medicine of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

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

Resume. Deforming dorsopathy diagnosed in more than 45 % of the population in developed countries is a widespread specie of the musculoskeletal system pathology. In this regard, the adequate therapy for combinations of these pathological conditions is relevant. Material and methods. The study involved 73 patients aged over 55 years with spinal osteochondrosis in the acute stage in combination with metabolic syndrome, which were at random divided into two groups: 46 people formed the core group (group 1) and 27 — the comparison group (group 2). To patients of the main group with the purpose of treatment of vertebrogenic dorsopatya, edema and dorsalgia, a complex enzyme medicine (composition: bromelain 450 FIP, trypsin 1440 FIP, rutoside 100 mg), 2 tablets 3 times a day per os for 30–40 minutes before meals was prescribed. Simultaneously appointed generally accepted (standard) treatment (health-protective mode, diet, physiotherapy, chondroprotectors, muscle relaxants, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (diclofenac sodium), while the comparison group was only standard treatment of dorsopatya. Evaluation of pain and asthenia was conducted once before start of treatment and every day during treatment. Before treatment and after 12 days of it the study was conducted, which included an assessment of the clinical analysis of blood, blood's lipids level, glucose's level, a condition of hemostasis system, the concentration levels of acute phase proteins. Conclusion. It has been revealed that the application of enzymes in the treatment of comorbid conditions: dorsopathia, combined with hypertension and dyslipidemia and impaired glucose metabolism makes possible not only to reduce manifestations of inflammation, but to reduce the risk of thrombosis and accordingly reducing the risk of fatal complications of cardiovascular diseases.

Key words: comorbid conditions, dorsopathy, enzymes, metabolic syndrome, dyslipidemia.

Dolgova N.A. – chief doctor, e-mail: novdolgova@yandex.ru

Shkurupiy V.A. – doctor of medical sciences, professor, academician of the RAMS, head of the chair of pathology, director, e-mail: sck@soramn.ru

Yakimova A.V. – doctor of medical sciences, associate professor of the chair of obstetrics and gynecology, e-mail: yakimova@hotmail.com

Dobrovolskaya N.P. – chief of the department

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ЭКСПРЕССИЯ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ТРОМБОФИЛИИ

Александр Петрович НАДЕЕВ¹, Алла Николаевна ДРОБИНСКАЯ²,
Валентина Александровна ЖУКОВА¹, Михаил Александрович КАРПОВ¹,
Михаил Андреевич ТРАВИН¹, Лилия Александровна ЧЕРДАНЦЕВА³

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

² ГБУЗ НСО Городская клиническая больница № 1
630047, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6

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

С целью изучения патоморфологических изменений в плаценте и экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста в клетках терминальных ворсин при наследственной тромбофилии исследовали образцы плацент от 37 женщин, разделенных на 3 группы: 13 беременных с верифицированной наследственной тромбофилией (35,3 %), 14 беременных с наследственной тромбофилией и признаками воспаления в плаценте (базальный децидуит, интервиллезит, плацентит) (37,84 %) и 10 беременных с нормально развивавшейся беременностью (контрольная группа). При наследственной тромбофилии в плаценте были выявлены морфологические проявления развития хронической плацентарной недостаточности в форме патологической незрелости с преобладанием промежуточных дифференцированных ворсин и диссоциированного созревания котиледонов, с выраженной редукцией терминальных специализированных ворсин. Уменьшение количества капилляров в терминальных ворсинах было обусловлено снижением экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста в клетках терминальных ворсин.

Ключевые слова: наследственная тромбофилия, плацента, сосудистый эндотелиальный фактор роста, терминальные ворсины.

Тромбофилия – приобретенное или наследственное патологическое состояние, характеризующееся повышением свертывания крови и склонностью к тромбозам и тромбоэмболиям [12]. Частота наследственной тромбофилии у женщин составляет 10–12 %, а при привычном невынашивании беременности достигает 48 % [2, 9]. При наследственной, генетически детерминированной тромбофилии выявлена мутация гена *G1691A* фактора V Лейдена (гетерозиготными носителями являются 3–5 % европейского населения), мутация протромбина (*G20210A*) (гетерозиготными носителями являются 1–3 %

европейского населения, в популяции жителей г. Новосибирска – 7 % [12]), гипергомоцистемии в сочетании с дефектом фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) (мутация *C677T*), тромбогенные генетические полиморфизмы [1, 2, 12].

При тромбофилии нарушения маточно-плацентарно-плодового кровотока проявляются тромбозами сосудов, инфарктами плаценты, хронической плацентарной недостаточностью (ХПН) и могут быть причиной самопроизвольного прерывания беременности, рождения маловесных детей, задержки внутриутробного развития

Надеев А.П. – д.м.н., проф. кафедры патологической анатомии, e-mail: nadeevngma@mail.ru

Дробинская А.Н. – к.м.н., зам. главного врача

Жукова В.А. – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии

Карпов М.А. – к.м.н., старший преподаватель кафедры патологической анатомии

Травин М.А. – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии, e-mail: mtravin@mail.ru

Черданцева Л.А. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний

плода [20], внутриутробной гибели плода, преждевременной отслойки плаценты, а также акушерских осложнений – кровотечений и тяжелой преэклампсии [2, 6, 9, 10, 16–19]. Наследственные тромбофилии способствуют развитию у женщин аутоиммунных нарушений, в том числе антифосфолипидного синдрома, являющегося проявлением приобретенной тромбофилии [4, 12].

Важная роль плаценты в функционировании биологической системы «мать – плацента – плод» обуславливает интерес к изучению этого органа при наследственной тромбофилии. Показано, что при приобретенной тромбофилии в плаценте на ранних сроках беременности формируются морфологические изменения, характеризующиеся повреждением эндотелия сосудов и синцитиотрофобласта, разобщением цито- и синцитиотрофобласта, микродефектами синцитиотрофобласта ворсин с закрывающими их фибриновыми слепками, задержкой децидуализации стромы эндометрия, неполной гестационной перестройкой спиральных артерий вследствие недостаточности первой волны интравазальной трофобластической инвазии [9]. В более поздние сроки беременности формируется ХПН с задержкой созревания и преждевременным старением незрелой плаценты, тромбы в сосудах, инфаркты, псевдоинфаркты, гематомы в плаценте, избыточное отложение в интервиллезном пространстве и базальной пластинке фибриноида [5].

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) играет важную роль в становлении и функционировании репродуктивной системы «мать – плацента – плод», так как стимулирует эмбриональный и плацентарный васкулогенез и ангиогенез [22], участвуя, в том числе, в формировании терминальных ворсин. В первом триместре беременности в синцитиотрофобласте и стромальных макрофагах регистрируется высокий уровень экспрессии VEGF с его снижением к исходу беременности. Показано, что экспрессия VEGF на поздних сроках беременности определяется в структурах плаценты, которые граничат с межворсинчатым пространством: синцитиотрофобласт, синцитиальные почки, свободные симпласты, цитотрофобласт клеточных островков, базальной пластинки, эндотелий крупных сосудов [8, 21]. Однако исследования, посвященные морфологическим изменениям в плаценте, роли VEGF в формировании ХПН при наследственных тромбофилиях, немногочисленны.

В этой связи целью исследования было изучение патоморфологических изменений в плаценте и экспрессии VEGF в клетках терминальных ворсин при наследственной тромбофилии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования были взяты образцы плацент от 37 женщин, разделенных на 3 группы: 1-ю группу составили 13 беременных с верифицированной наследственной тромбофилией (35,3 %) в возрасте $29,67 \pm 1,11$ года, родами при сроке гестации $40,0 \pm 0,11$ недели, массой новорожденных $3284,54 \pm 80,63$ г; во 2-ю группу, учитывая, что ранее было показано частое сочетание наследственной тромбофилии и инфекционного поражения плаценты [9], способствующей прогрессирующему течению тромбофилии, вошли 14 беременных с наследственной тромбофилией и признаками воспалительных проявлений в плаценте (базальный децидуит, интервиллезит, плацентит) (37,84 %), возрастом $27,7 \pm 0,89$ года, родами при сроке гестации $38,9 \pm 0,87$ недели, массой новорожденных $3385,0 \pm 183,39$ г; в 3-ю (контрольную) группу были включены 10 женщин с нормально развивавшейся беременностью, возрастом $28,2 \pm 1,77$ года, самопроизвольными родами при сроке гестации 40,0 недель, массой новорожденных $3302,0 \pm 56,42$ г.

У женщин 1-й и 2-й групп наследственная тромбофилия была диагностирована во время беременности и представлена следующими вариантами: гомозиготная мутация в гене фактора VII, гетеро- и гомозиготная мутация MTHFR, гомозиготная мутация в V факторе Лейдена, гетерозиготные мутации генов ферментов фолатного цикла метионинсинтетазы и цистататион-β-синтетазы, а также мутация ингибитора активатора плазминогена (PAI-I), фактора XII, VIII. Количество выявленных дефектов гемостаза у беременных женщин представлено одним дефектом в 64,5 %, двумя и более дефектами – в 35,4 % случаев.

Плаценты доставляли в течение 12 ч после родов из родильного дома для патоморфологического исследования. Образцы плаценты из центральной части плацентарного диска фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезжировали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином, по ван Гизону, ШИК-реактивом [11]. В плаценте подсчитывали с помощью окулярной сетки объемную плотность (Vv) типов ворсин, стромы и трофобластического эпителия терминальных ворсин, а также количество капилляров, приходящихся на 1 терминальную ворсину. Для выявления экспрессии VEGF в структурах плаценты использовали кроличьи поликлональные антитела (Spring Bioscience, США). Подсчитывали в 100 эндотелиальных и стромальных клетках терминальных ворсин экспрессию VEGF, реакцию

считали положительной при окрашивании цитоплазмы клетки в коричневый цвет.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$ [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В плаценте у женщин 1-й и 2-й групп в интервиллезном пространстве отмечали обширные очаги образования фибриноида с замуровыванием групп ворсин и образованием псевдоинфарктов. Во всех плацентах обнаружены очаги обызвествления в псевдоинфарктах, синцитиальных почках, клеточных островках, септах; выявлены интервиллезные гематомы разной степени давности, а также кровоизлияния в децидуальной базальной пластинке.

При наследственной тромбофилии (1-я и 2-я группы) в плаценте во всех наблюдениях констатирована ХПН в форме патологической незрелости ворсин в варианте преобладания промежуточных дифференцированных ворсин и диссоциированного созревания котиледонов.

Компенсаторные процессы были в основном представлены синцитиальными почками, а капилляры в терминальных ворсинах были узкими и синусоидально расширенными, расположенными как под эпителием ворсин, так и в их центре. При исследовании типов ворсин объемная плотность терминальных ворсин, преобладающих в плаценте у женщин 3-й контрольной группы, при наследственной тромбофилии (1-я группа) и сочетании наследственной тромбофилии с воспалением (2-я группа) была существенно меньшей (в 3 и в 2 раза соответственно), со значительным увеличением доли ворсин, замурованных в фибриноид и выключенных в этой связи из обменных процессов в плаценте (табл. 1).

В терминальных ворсинах, обеспечивающих основной обмен между организмом матери и плода [7], количество капилляров в терминальных ворсинах в плацентах беременных 1-й и 2-й групп было меньше, чем у женщин 3-й (контрольной) группы, в 3 раза (табл. 2). При исследовании VEGF выявлена его экспрессия в децидуальных клетках, синцитиотрофобласте, стромальных клетках, эндотелиоцитах капилляров терминальных ворсин (см. рисунок). В эпителиоцитах синцитиотрофобласта терминальных ворсин экспрессия VEGF была отмечена во всех исследованных группах в 100 % наблюдений. Однако в

Таблица 1

Объемная плотность (V_v) типов ворсин в плаценте при наследственной тромбофилии ($M \pm m$)

Тип ворсин	Группа исследования		
	3-я (контрольная) группа	1-я группа (наследственная тромбофилия)	2-я группа (тромбофилия с воспалением)
Стволовые ворсины	14,63 ± 1,66	9,96 ± 1,80	8,72 ± 1,58*
Промежуточные дифференцированные	6,99 ± 1,40	64,24 ± 2,59*	57,00 ± 2,81*
Терминальные	77,77 ± 1,74	22,36 ± 1,78*	29,24 ± 2,68*
Ворсины, замурованные в фибриноид	0,58 ± 0,26	3,42 ± 0,87*	5,01 ± 1,23*

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – отличие от величины соответствующего показателя группы 1 статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 2

Структурная организация терминальных ворсин в плаценте при наследственной тромбофилии ($M \pm m$)

Параметр	Группа исследования		
	3-я (контрольная) группа	1-я группа (наследственная тромбофилия)	2-я группа (тромбофилия с воспалением)
Строма ворсин (V_v)	63,8 ± 1,25	67,6 ± 1,15	68,8 ± 0,96*
Трофобластический эпителий (V_v)	36,2 ± 1,25	32,4 ± 1,15*	31,2 ± 0,96*
Количество капилляров в 1 терминальной ворсине	6,6 ± 0,24	2,0 ± 0,19*	1,74 ± 0,17*
Экспрессия VEGF в эндотелиоцитах и стромальных клетках терминальных ворсин, %	66,4 ± 0,24	40,5 ± 1,25*	24,2 ± 1,71*

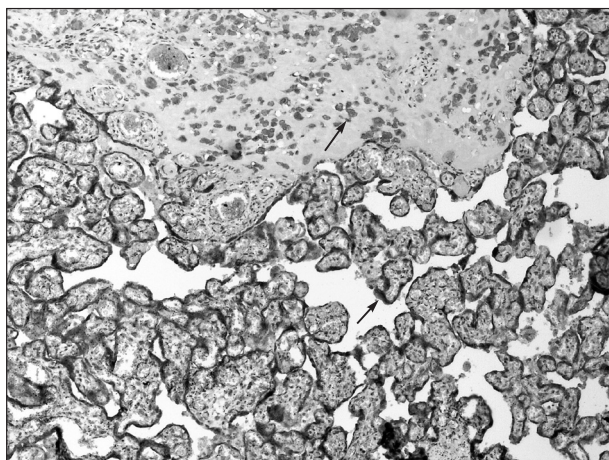


Рис. Экспрессия VEGF в децидуальных клетках, трофобластическом эпителии терминальных ворсин плаценты (показано стрелками) в 1-й группе. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами с докраской гематоксилином. Увел. 100

строме терминальных ворсин (эндотелиальных и стромальных клетках) (см. табл. 2) плацент женщин 1-й и 2-й групп VEGF экспрессировался в меньшей степени, чем у беременных контрольной группы, в 1,6 и в 2,7 раза соответственно. Более выраженное снижение экспрессии VEGF и уменьшение количества сосудов в терминальных ворсинах женщин 2-й группы сопровождалось увеличением доли стромы в них (см. табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что тромбогенное действие при наследственных тромбофилиях обусловлено повреждением эндотелиоцитов при повышенном содержании гомоцистеина, активацией факторов V и VII, усилением агрегации тромбоцитов вследствие снижения синтеза оксида азота и др. [1]. Учитывая, что гомоцистеин может проходить через плаценту и провоцировать развитие врожденных пороков развития у плода [15], вероятно, что он оказывал деструктивное действие и на трофобластический эпителий с последующим запуском процессов свертывания крови, избыточного образования фибриноида в межворсинчатом пространстве, способствуя формированию ХПН. В случаях Лейденской мутации фактора V с развитием резистентности к активированному протеину С и созданием условий для гиперактивации протромбокиназного комплекса, мутации гена протромбина с двукратным повышением уровня протромбина и запуском коагуляционного каскада основным морфологическим проявлением в плаценте явился тромбоз, формирование ХПН, в том числе с задержкой внутриутробного раз-

вития плода, отслойкой нормально расположенной плаценты. При дефекте PAI-1 повышаются резистентность к фибринолизу и стабилизация фибринового сгустка, что приводит к увеличению доли межворсинчатого фибриноида. Кроме того, продукция PAI-1 возрастает под действием С-реактивного белка в условиях системного воспалительного ответа, в том числе при инфекционном поражении плаценты [12].

Вероятно, что повреждающее действие повышенного содержания гомоцистеина ведет также к деструкции структур плаценты: задержке созревания ворсин, их незрелости и склерозу мелких ворсин с редукцией капиллярного русла и ишемией плаценты с формированием ХПН [7, 13]. Ишемизации плаценты способствует и нарушение гестационной перестройки спиральных артерий вследствие задержки I и II волны интравазальной трофобластической инвазии, наблюдаемой при тромбофилии, а также способность гомоцистеина стимулировать пролиферацию гладкомышечных клеток [1]. В свою очередь, редукция капиллярного русла в терминальных ворсинах была обусловлена снижением экспрессии VEGF в эндотелиоцитах сосудов и стромальных клетках. Более выраженное уменьшение количества капилляров в терминальных ворсинах плаценты женщин 2-й группы было связано, вероятно, с инфекционными агентами, вызвавшими воспалительный процесс в плаценте и оказывающими цитопатическое действие, поскольку показано, что при ряде инфекций (например, цитомегаловирусной инфекции) снижается синтез VEGF [23]. Кроме того, при наследственной тромбофилии уменьшается пролиферативная активность трофобластического эпителия с усилением экспрессии противоапоптотического белка bcl-2, и выраженность этих процессов увеличивается при возрастании количества мутаций у беременных [14]. Это ведет, видимо, к развитию задержки созревания ворсин и формированию патологической незрелости плаценты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При наследственной тромбофилии в плаценте выявлено уменьшение количества капилляров в терминальных ворсинах, вероятно, связанное со снижением экспрессии VEGF в эндотелиоцитах и клетках стромы терминальных ворсин. В свою очередь, гипоксическое состояние, возникающее вследствие редукции капиллярного русла, сопровождалось нарушением созревания ворсин с развитием ХПН в виде патологической их незрелости с преобладанием промежуточных дифференцированных ворсин и диссоциированного созревания котиледонов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., 2001. 296 с.
2. Бицадзе В.О., Макацария А.Д., Хизроева Д.Х. и др. Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложненной беременности // Практич. мед. 2012. (9). 24–31.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1999. 459 с.
4. Долженко Т.А., Милованов А.П., Давтян Е.Л. Морфологическая диагностика и патогенез неразвивающейся беременности при антифосфолипидном синдроме // Арх. патол. 2005. (2). 9–3.
5. Жукова В.А., Надеев А.П., Дробинская А.Н. и др. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование маточно-плацентарной области при тромбофилии // Вестн. НГУ. Сер. Биол. клинич. мед. 2012. 10. (2). 151–159.
6. Макацария А.Д., Бицадзе В.О. Тромбофилические состояния в акушерской практике. М., 2001. 219–285.
7. Милованов А.П. Патология системы мать – плацента – плод. М., 1999. 447 с.
8. Милованов А.П., Сидорова И.С., Солоницын А.Н., Боровкова Е.И. Иммуногистохимическая оценка распределения фактора роста эндотелия сосудов в плаценте, плацентарном ложе матки при нормальной беременности и у женщин с преэклампсией // Арх. патол. 2008. (3). 12–15.
9. Милованов А.П., Серова О.Ф. Причины и дифференцированное лечение раннего невынашивания беременности. М., 2011. 216 с.
10. Момот А.П., Тараненко И.А., Цывкина Л.П. Эволюция представлений о тромбофилии и ее роли в проблемах репродукции человека // Акушерство и гинекология. 2013. (2). 4–9.
11. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника. М., 1996. 544 с.
12. Серов В.Н., Пасман Н.М., Стуров В.Г., Дробинская А.Н. Наследственные и приобретенные тромбофилические состояния в акушерско-гинекологической практике. Руководство для врачей. Новосибирск, 2011. 180 с.
13. Серов В.Н., Тютюнник В.Л., Михайлова О.И. Современные представления о лечении плацентарной недостаточности // Рус. мед. журн. 2011. (3). 3–5.
14. Стрижаков А.Н., Волощук И.Н., Тимохина Е.В. и др. Клиническое значение тромбофилии в развитии апоптоза и пролиферации при плацентарной недостаточности // Вопр. гинекол. акушерства перинатол. 2010. 9. (4). 5–12.
15. Сухих Г.Т., Доброхотова Ю.Э., Файзуллин Л.З. Роль гипергомоцистеинемии в генезе неразвивающейся беременности и начавшегося выкидыша // Рус. мед. журн. 2005. 13. (17). 1110–1113.
16. Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Агаркова Т.А. и др. Анализ роли наследственной тромбофилии в развитии осложненного течения беременности // Фундам. исследования. 2012. (10). 337–344.
17. Baksu A., Taskin M., Goker N. et al. Plasma homocysteine in late pregnancies complicated with preeclampsia and in newborns // Am. J. Perinatol. 2006. 23. (1). 31–35.
18. Chou A.K., Hasieh S.C., Su Y.N. et al. Neonatal and pregnancy outcome in primare antiphospholipid syndrom a 10-year experience in one medical center // Pediatr. Neonatol. 2009. 50. (4). 143–146.
19. Costa S.L., Proctor L., Dood J.M. et al. Screening for placental insufficiency in high-risk pregnancies isearlier better // Placenta. 2008. 29. (12). 1034–1040.
20. Neerhof M.G., Thaete L.G. The fetal response to chronic placental insufficiency // Semin. Perinatol. 2008. 32. 201–205.
21. Pavlov O.V., Sheveleva T.S., Selkov S.A. In vitro expression of vascular endothelial growth factor and its receptors by placental macrophages. // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. 153. (2). 222–225.
22. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases // J. Biochem. 2013. 153. (1). 13–19.
23. Tabata T., Pettitt M., Fang-Hoover J. et al. Cytomegalovirus impairs cytotrophoblast-induced lymphangiogenesis and vascular remodeling in an in vivo human placentation model // Am. J. Pathol. 2012. 181. (5). 1540–1559.

PATHOLOGICAL CHANGES AND EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN THE PLACENTA IN INHERITED THROMBOPHILIA

**Aleksandr Petrovich NADEEV¹, Alla Nikolaevna DROBINSKAYA²,
Valentina Aleksandrovna ZHUKOVA¹, Mikhail Aleksandrovich KARPOV¹,
Michail Andreevich TRAVIN¹, Liliya Aleksandrovna CHERDANTSEVA³**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

² *Municipal Clinical Hospital № 1
630047, Novosibirsk, Zalesski str., 6*

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

Summary. The aim was to study the pathological changes in the placenta and VEGF expression in the cells of acroteric villus in case of inherited thrombophilia. For the study, samples were taken from 37 placentas of women, divided into 3 groups: the group 1 comprised 13 pregnant women with verified inherited thrombophilia (35.3 %); the group 2 included 14 pregnant women with inherited thrombophilia and signs of inflammatory manifestations in the placenta (basal deciduitis, intervillitis, placentitis) (37.84 %); the third (control) group included 10 pregnant women with normal pregnancy. Morphological manifestations of chronic placental insufficiency in the form of pathological immaturity with a predominance of differentiated intermediate villi and dissociated maturation cotyledons with a substantial reduction of the specialized terminal villi have been revealed in placenta at hereditary thrombophilia. Decrease in the number of capillaries in the terminal villi was due to reduced expression of vascular endothelial growth factor in cells of terminal villi.

Key words: hereditary thrombophilia , placenta, vascular endothelial growth factor , terminal villi.

Nadeev A.P. – doctor of medical sciences, professor of the department for pathology, e-mail: nadeevngma@mail.ru

Drobinskaya A.N. – candidate of medical sciences, deputy chief

Zhukova V.A. – candidate of medical sciences, assistant professor of the department for pathology

Karpov M.A. – candidate of medical sciences, assistant of the department for pathology

*Travin M.A. – candidate of medical sciences, senior assistant professor of the department for pathology,
e-mail: mtravin@mail.ru*

Cherdantseva L.A. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratories for pathology

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *GPC5*, *CASQ2*, *NOS1AP*, *GPD1L* С ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТЬЮ В РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Владимир Николаевич МАКСИМОВ^{1,2}, Анастасия Андреевна ИВАНОВА¹, Павел Сергеевич ОРЛОВ^{1,3}, Динара Евгеньевна ИВАНОЩУК^{1,3}, Сергей Владимирович САВЧЕНКО^{2,4}, Михаил Иванович ВОЕВОДА^{1,3}

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

⁴ ГУЗ Новосибирское областное бюро судебно-медицинской экспертизы,
630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 134

Цель исследования – изучение ассоциации rs3864180 гена *GPC5*, rs3010396 гена *CASQ2*, rs10918859 гена *NOS1AP*, rs9862154 региона гена *GPD1L* с внезапной сердечной смертью в русской популяции. Материал и методы. Группа лиц, умерших внезапной сердечной смертью ($n = 352$), контрольная группа, подобранная по полу и возрасту ($n = 195$), группа подростков ($n = 297$). По частотам генотипов и аллелей rs10918859 гена *NOS1AP*, rs9862154 региона гена *GPD1L* не найдено статистически значимых различий между группами. По частотам генотипов rs3864180 гена *GPC5*, rs3010396 гена *CASQ2* обнаружены статистически значимые различия между группой мужчин, умерших внезапной сердечной смертью, и контрольной группой (отношение шансов ОШ = 0,4, 95 % доверительный интервал ДИ 0,2–0,8, $p = 0,020$; ОШ = 0,4, 95 % ДИ 0,2–0,7, $p = 0,006$ соответственно). rs3864180 гена *GPC5* и rs3010396 гена *CASQ2* ассоциированы с внезапной сердечной смертью у мужчин в русской популяции.

Ключевые слова: внезапная сердечная смерть, однонуклеотидный полиморфизм, *GPC5*, *CASQ2*, *NOS1AP*, *GPD1L*.

Внезапная сердечная смерть (ВСС) по определению ВОЗ – внезапное прекращение сердечной деятельности вследствие сердечно-сосудистых причин у лиц с известной или неизвестной ранее кардиальной патологией, наступившее в течение одного часа с момента возникновения первых угрожающих симптомов. При этом чаще всего до наступления летального исхода состояние больных оценивается окружающими как стабильное, не вызывающее опасений, что и обуславливает высокую смертность таких пациентов даже при своевременно начатых реанимационных мероприятиях.

По данным ВОЗ на 2010 г., 56 % всех случаев смерти населения в Российской Федерации приходится на сердечно-сосудистые заболевания, из которых 10 % составляет ВСС [7]. В России ВСС практически в 2 раза превышает смертность от таких социально значимых заболеваний, как злокачественные новообразования бронхов, трахеи и легких, и в 5 раз – от злокачественных новообразований молочной железы [7]. Риск возникновения ВСС у мужчин в 3 раза выше, чем у женщин. Возрастной риск ВСС совпадает с таковым при ИБС, которая является наиболее частым субстратом для развития ВСС [5, 12, 13]. Таким обра-

Максимов В.Н. – д.м.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

Иванова А.А. – ординатор, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Орлов П.С. – младший научный сотрудник, e-mail: orlovpavel86@gmail.com

Иванощук Д.Е. – младший научный сотрудник, e-mail: dinara2084@mail.ru

Савченко С.В. – д.м.н., проф. кафедры судебной медицины

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

зом, чаще всего ВСС умирают мужчины, причем большая часть из них находится в трудоспособном возрасте, что делает ВСС значимой социальной-экономической проблемой.

Но в современной как российской, так и зарубежной медицине достоверных и информативных методов диагностики предрасположенности к ВСС не существует. В мире активно изучается вклад молекулярно-генетических маркеров (мутаций и полиморфизмов генов) в развитие данной нозологии. Найденные генетические маркеры могут быть эффективно использованы для установления причины смерти в случае, когда она остается невыясненной после судебно-медицинского исследования, а также для диагностики предрасположенности к ВСС у лиц с наличием факторов риска и отягощенной наследственностью по данной нозологии.

В последних зарубежных исследованиях, в том числе полногеномных, показана ассоциация ВСС с рядом однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов *GPC5*, *CASQ2*, *NOS1AP*, *GPDIL* на фоне ИБС [4, 16].

Ген *GPC5* (13q31.3) кодирует белок глипикан 5, член семейства гепарансульфатных протеогликанов [6]. Ассоциация rs3864180 с ВСС на фоне ИБС была впервые найдена в ходе полногеномного исследования, проведенного на базе популяционного проекта ВСС Oregon-SUDS (Oregon Sudden Unexpected Death Study, США) [4]. Ранее ни один полиморфизм гена не был описан как молекулярно-генетический маркер развития какой-либо сердечно-сосудистой патологии.

Согласно результатам поэтапного исследования, выполненного на базе того же популяционного проекта Oregon-SUDS в 2011 г., показана ассоциация ряда ОНП генов *CASQ2*, *NOS1AP*, *GPDIL* с ВСС на фоне ИБС [16]. В исследование включено 1424 ОНП 18 генов, проверенных на причастность к ВСС, положительная ассоциация выявлена для 36 ОНП, которые в дальнейшем были проверены в независимых исследованиях «случай – контроль». В итоге статистически значимая ассоциация с ВСС показана только для 6 ОНП: rs17500488, rs3010396, rs7366407 гена *CASQ2*; rs12084280, rs1091885 гена *NOS1AP*, rs9862154, расположенного на расстоянии 26 тысяч пар оснований (Кб) от гена *GPDIL*. Ранее данные ОНП этих генов не рассматривались в отношении развития ВСС, тогда как другие полиморфизмы и мутации генов *CASQ2*, *NOS1AP*, *GPDIL* найдены ассоциированными с состояниями, лежащими в основе развития ВСС.

Ген *CASQ2* (1p11-p13.3) кодирует протеин, являющийся главным кальцийсвязывающим белком терминальной цистерны саркоплазматического

ретикула сердечной мускулатуры [12]. Ранее известные мутации гена (del, R33Q, D307H) ассоциированы с развитием желудочковой тахикардии, которая в 8 % случаев становится непосредственным предиктором ВСС [10, 14, 15].

Ген *NOS1AP* (1q23.3) кодирует адаптерный белок NO-синтазы, который регулирует активацию нейрональной NO-синтазы. На мышах показано, что нейрональная NO-синтаза изменяет сердечную сократимость, играет роль в сердечной деполяризации [9]. В Роттердамском популяционном исследовании выявлена ассоциация аллеля G rs10494366 с удлинением интервала QT на 3,8 мс, аллеля G rs10918594 с удлинением интервала QT на 3,6 мс, но не установлено статистически значимой ассоциации между ОНП гена *NOS1AP* и ВСС [3].

Ген *GPDIL* (3p22.3) кодирует глицерол-3-фосфатдегидрогеназу. Известные полиморфизмы гена ассоциированы с риском развития синдрома Бругада, который в ряде случаев также является причиной развития ВСС [11].

Обнаруженная в зарубежных исследованиях связь полиморфизмов генов *CASQ2*, *NOS1AP*, *GPDIL*, *GPC5* с ВСС требует обязательной проверки в исследованиях дизайна «случай – контроль» с целью подтверждения наличия ассоциации с ВСС в конкретных популяционных группах и изучения особенностей вовлечения ОНП в развитие данной нозологии. Ранее в России исследований ассоциации полиморфизмов данных генов с ВСС проведено не было.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Группа ВСС сформирована с использованием критериев ВОЗ, в период с 1999 по 2012 г. Аутопсийный материал (352 образца) был набран у внезапно умерших жителей Октябрьского района г. Новосибирска, подвергшихся судебно-медицинскому исследованию. Средний возраст умерших – 53,2 ± 8,7 года. Доля мужчин в группе ВСС составляла 70,9 %, женщин – 29,1 %. С учетом ограниченной информации о времени развития летального исхода в исследуемую группу включены случаи смерти, развившиеся в течение одного часа или при отсутствии свидетелей смерти в течение не более 24 часов и расцененных по данным аутопсии как смерть сердечного генеза. В группу не включались умершие с морфологическими изменениями, характерными для инфаркта миокарда, кардиомиопатий.

Группа контроля (здоровые лица, жители того же района города, $n = 195$) была подобрана по полу и возрасту из банка ДНК, сформированного во время проведения между-

народных исследований НАPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe) и MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in Cardiovascular disease). Мужчины составили 64,5 %, женщины 35,5 %, средний возраст – $53,5 \pm 8,3$ года. Группа подростков, учащихся общеобразовательных школ Октябрьского района г. Новосибирска (14–17 лет, средний возраст $15,5 \pm 0,9$ года, $n = 297$), сформирована в 2003 г. в ходе проведенного ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН одномоментного популяционного исследования школьников. Мальчики составили 83,0 %, девочки – 17,0 %.

ДНК выделяли методом фенолхлороформной экстракции из аутопсийного материала (ткани миокарда) и крови лиц, включенных в контрольные группы [2]. Выбор ОНП определялся последними известными данными о связи этих полиморфизмов с внезапной сердечной смертью в зарубежных исследованиях. Для проверки ассоциации с ВСС в русской популяции были отобраны полиморфизмы rs3864180 гена *GPC5*, rs3010396 гена *CASQ2*, rs10918859 гена *NOS1AP*, rs9862154 региона гена *GPDIL*. Детекцию полиморфизма rs3864180 гена *GPC5* проводили методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Генотипирование по полиморфизмам rs3010396 гена *CASQ2*, rs10918859 гена *NOS1AP*, rs9862154 региона гена *GPDIL* выполнено методом ПЦР в реальном времени на приборе AB 7900HT с использованием TaqMan зондов (Applied Biosystems, США).

При статистической обработке результатов определены частоты генотипов и аллелей, изучаемых ОНП в группе с ВСС и в контрольных группах, с использованием критерия χ^2 оценено соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга в контрольной группе. Сравнение групп по частотам генотипов и аллелей выполняли с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону. В случае четырехпольных таблиц применяли точный двусторонний критерий Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. Относительный риск ВСС по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов с использованием точного двустороннего критерия Фишера и критерия χ^2 по Пирсону. Далее в контрольной группе проводили анализ различий по ряду показателей у носителей разных генотипов (уровень систолического, диастолического, пульсового давления, частота сердечных сокращений, уровень общего холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов, индекс атерогенности, уровень глюкозы). Нормальность распределения значений показателей проверяли с помощью те-

ста Колмогорова–Смирнова для одной выборки. В случае ненормального распределения значений использовали Н-тест Крускала–Уоллиса для двух и более выборок и U-тест Манна–Уитни для двух независимых выборок.

При разделении групп по возрасту был выбран возраст 50 лет. Возраст старше 50 лет является одним из факторов риска развития ИБС, которая является наиболее частым субстратом для развития ВСС. Таким образом, были условно разделены случаи ВСС, в основе которых, скорее всего, лежит ИБС, и случаи ВСС с другой патофизиологической основой. Группа подростков включена в исследование с целью обнаружения возможной возрастной динамики частот генотипов и аллелей изучаемых полиморфизмов генов. Такой факт описан нами ранее для rs2228314 гена *SREBF2* [1].

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты генотипов всех изучаемых полиморфизмов в контрольных группах находятся в равновесии Харди–Вайнберга (см. таблицу).

По частотам генотипов полиморфизма rs3864180 гена *GPC5* найдены статистически значимые различия между группой мужчин, умерших ВСС в возрасте старше 50 лет, и группой контроля аналогичного пола и возраста ($p = 0,048$), частота встречаемости генотипа GG в группе мужчин, умерших ВСС, в 0,4 раза меньше, чем в группе контроля (95 % ДИ 0,2–0,8; $p = 0,020$) (рис. 1). В ходе полногеномного исследования по поиску генетических маркеров ВСС, проведенного на базе популяционного проекта Oregon-SUDS, найдена ассоциация между rs3864180 гена *GPC5* и частотой ВСС [4]. В этом исследовании в группу ВСС были включены мужчины и женщины европеоидной расы, умершие ВСС и имеющие в анамнезе ИБС, в том числе инфаркт миокарда. Контрольная группа была подобрана по полу и возрасту, при этом лица, включенные в контрольную группу, также имели признаки ИБС. 75 % лиц группы ВСС и 90 % лиц контрольной группы были старше 50 лет. В результате исследования выбраны приоритетные ОНП, которые могли быть генетическими маркерами ВСС, их частоты проверены на лицах европеоидной и негроидной расы с ВСС из популяционных исследований ARIC (the Atherosclerosis Risk in Communities Study) и CHS (the Cardiovascular Health Study). Полученная статистически значимая ассоциация ОНП с ВСС, как и наблюдаемое уменьшение ин-

Таблица

Частоты генотипов в исследуемых группах

Ген	ОНП	Генотип	Контрольная группа		ВСС		Группа подростков	
			<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>GPC5</i>	rs3864180	GG	23	13,2	45	13,2	39	13,4
		AG	89	51,1	172	50,4	130	44,8
		AA	62	35,6	124	36,4	121	41,8
<i>CASQ2</i>	rs3010396	AA	52	26,7	81	20,9	79	26,6
		AG	99	50,8	173	44,7	148	49,8
		GG	44	22,5	95	24,5	70	23,6
<i>NOS1AP</i>	rs10918859	AA	10	5,2	20	5,2	20	6,8
		AG	67	34,7	143	37,0	107	36,5
		GG	116	60,1	189	48,8	166	56,7
<i>GPD1L</i>	rs9862154	CC	132	68,1	238	69,0	198	67,3
		CG	53	27,3	94	27,2	82	27,9
		GG	9	4,6	13	3,8	14	4,8

тервала QT, были более выраженными у женщин, лиц без инфаркта миокарда в анамнезе, моложе 70 лет и без сопутствующего сахарного диабета. Полиморфизм rs3864180 локализован в интронной области гена *GPC5*, предполагается, что он входит в один блок сцепления с полиморфизмом в экзоне гена *GPC5* либо выполняет регулирующую функцию [4]. Согласно нашим результатам, гомозиготный генотип GG обладает протективным эффектом в отношении развития ВСС у мужчин старше 50 лет, что не противоречит данным ARIC и CHS. Других исследований данного ОНП в мире проведено не было.

В результате поэтапного исследования, проведенного на базе того же популяционного проекта Oregon-SUDS, статистически значимая ассоциация с ВСС показана для следующих ОНП:

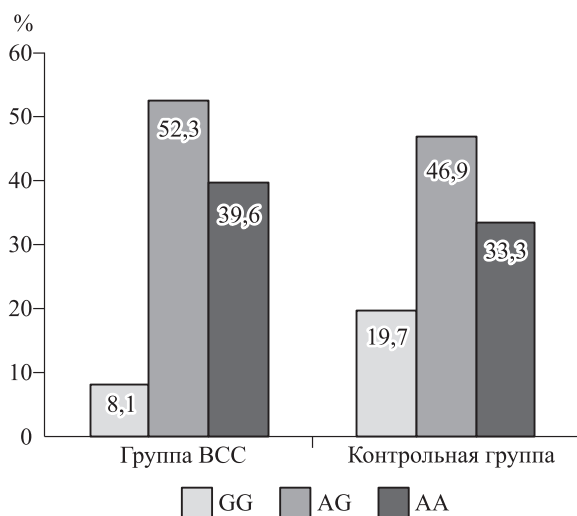


Рис. 1. Частоты генотипов rs3864180 в группе мужчин старше 50 лет

rs3010396 гена *CASQ2*, rs1091885 гена *NOS1AP*, rs9862154, расположенного на расстоянии 26 Кб от гена *GPD1L*. В группу ВСС и контрольную группу были включены лица с наличием ИБС в анамнезе. Возрастной и половой динамики частот генотипов изученных ОНП исследование не содержит, так же как и выделенных аллелей и генотипов риска [16]. В последнем мировом исследовании «случай – контроль», проведенном на китайской популяции, показана положительная связь rs10918859 гена *NOS1AP* с ИБС у мужчин, отмечено, что у китайцев выше, чем у европейцев, частота аллеля А [7]. Других российских или зарубежных исследований выбранных нами полиморфизмов в доступной мировой литературе не найдено. Ассоциация полиморфизмов rs10918859 гена *NOS1AP*, так же как и rs9862154 региона гена *GPD1L* с ВСС, нами не подтверждена. Отсутствие ассоциации данных ОНП с ВСС может быть связано с генетическими особенностями русской популяции, но требует дополнительной проверки. Согласно результатам настоящего исследования, группа мужчин, умерших ВСС в возрасте до 50 лет, и контрольная группа статистически значимо различаются по частотам генотипов rs3010396 гена *CASQ2* ($p = 0,015$). Отношение шансов обнаружить носителя генотипа AG в группе ВСС в 0,4 раза меньше, чем в контрольной группе (95 % ДИ 0,2–0,7, $p = 0,006$), что свидетельствует о протективном эффекте этого генотипа в отношении ВСС у мужчин в возрасте до 50 лет (рис. 2). Также найдены статистически значимые различия по частотам генотипов данного ОНП в группе женщин, умерших ВСС, и группе девочек-подростков ($p = 0,017$). Генотип GG полиморфизма в 3,2 раза чаще встречается в

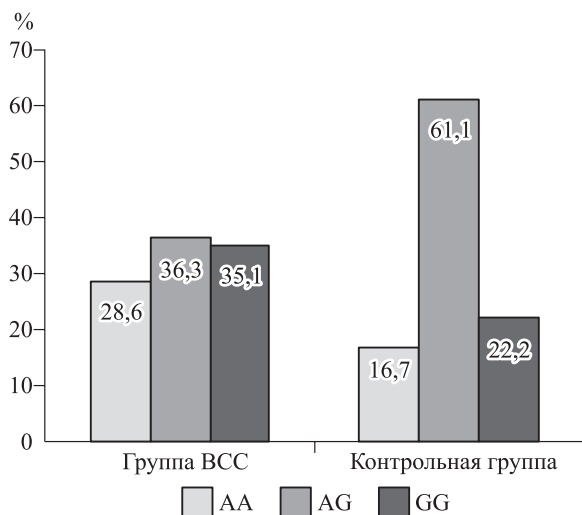


Рис. 2. Частоты генотипов rs3010396 в группе мужчин моложе 50 лет

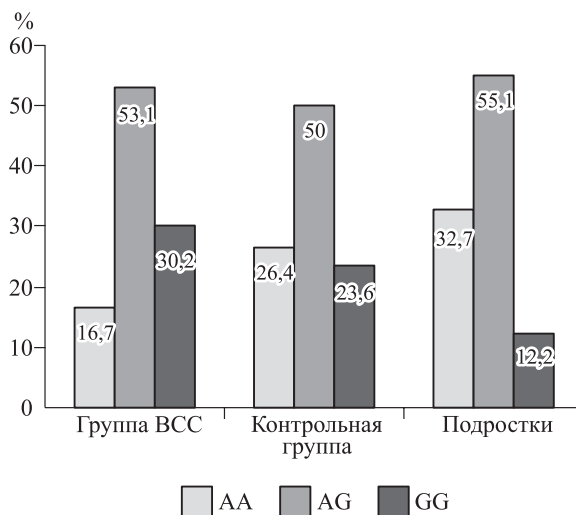


Рис. 3. Частоты генотипов rs3010396 в группе женщин

группе женщин, умерших ВСС, по сравнению с группой девочек-подростков (95 % ДИ 1,2–8,1, $p = 0,023$) (рис. 3). Доля носителей генотипа GG в группе подростков меньше, чем в контрольной, но различие не достигает уровня статистической значимости.

При сравнении значений систолического, диастолического, пульсового давления, частоты сердечных сокращений, уровня общего холестерина ЛПНП, триглицеридов, индекса атерогенности, уровня глюкозы крови у носителей разных генотипов rs10918859 гена *NOS1AP* в контрольной группе найдены статистически значимые различия по содержанию глюкозы в крови ($p = 0,03$, тест Крускала–Уоллиса). У носителей генотипа GG достоверно выше концентрация глюкозы в крови, чем у носителей других генотипов ($p = 0,024$, тест Манна–Уитни).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в русской популяции проведено исследование ассоциации полиморфизмов rs3864180 гена *GPC5*, rs3010396 гена *CASQ2*, rs10918859 гена *NOS1AP*, rs9862154 региона гена *GPD1L* с ВСС. У мужчин старше 50 лет с ВСС ассоциирован rs3864180 гена *GPC5*, у мужчин младше 50 лет – rs3010396 гена *CASQ2*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность академику Юрию Петровичу Никитину и профессору Софье Константиновне Малютиной за предоставленную возможность сформировать контрольную группу на материале когорт НАРПЕЕ и

MONICA, а также д.м.н. Диане Вахтанговне Денисовой за предоставленную возможность сформировать группу подростков.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-01448а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Максимов В.Н., Куликов И.В., Устинов С.Н. и др. Ассоциация полиморфизма гена *SREBF2* с внезапной сердечной смертью // Бюл. СО РАМН. 2011. (5). 14–18.
- Смит К., Калко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК // Анализ генома / Ред. К. Дейвис; пер. с англ. М.: Мир, 1990. 58–94.
- Aarnoudse A., Newton-Cheh C., de Bakker P. et al. Common NOS1AP variants are associated with a prolonged QTc interval in the Rotterdam Study// Circulation. 2007. (116). 10–16.
- Arking D.E., Reinier K., Post W. et al. Genome-wide association study identifies GPC5 as a novel genetic locus protective against sudden cardiac arrest // PLoS One. 2010. 3. (5). e9879.
- Chugh S., Reinier K., Teodorescu C. et al. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research // Prog. Cardiovasc. Dis. 2008. 51. (3). 213–228.
- De Cat B., David G. Developmental roles of the glypicans // Semin. Cell Dev. Biol. 2001. 12. 117–125.
- European detailed mortality database (DMDB). World Health Organization. Regional office for Europe. <http://data.euro.who.int/dmdb/>
- Huang Y., Lian J., Huang R.S. et al. Positive association between rs10918859 of the NOS1AP gene and coronary heart disease in male Han Chinese // Genet. Test. Mol. Biomarkers. 2013. 1. (17). 25–29.
- Kao W., Arking D., Post W. Genetic variations in nitric oxide synthase 1 adaptor protein are associated

with sudden cardiac death in US white community-based populations // *Circulation*. 2009. 119. (7). 940–951.

10. Lahat H., Pras E., Olender T. et al. Missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. 69. (6). 1378–1384.

11. Norstrand D.W., Valdivia C.R., Tester D.J. et al. Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome // *Circulation*. 2007. 116. 2253–2259.

12. Rodriguez-Calvo M., Brion M., Allegue C. et al. Molecular genetics of sudden cardiac death // *Forensic Sci. Int.* 2008. (182). 1–12.

13. Sovari A., Kocheril A., Baas A. Sudden cardiac death // *Medscape J. Med.* 2011. 13. 1–10.

14. Terentyev D., Kubalova Z., Valle G. et al. Modulation of SR Ca release by luminal Ca and calsequestrin in cardiac myocytes: effects of CASQ2 mutations linked to Sudden Cardiac Death // *Biophys. J.* 2008. 95. 2037–2048.

15. Turakhia M., Tseng Z.H. Sudden cardiac death: epidemiology, mechanisms, and therapy // *Curr. Probl. Cardiol.* 2007. (32). 501–546.

16. Westaway S.K., Reinier K., Huertas-Vazquez A. et al. Common variants in CASQ2, GPD1L, and NOS1AP are significantly associated with risk of sudden death in patients with coronary artery disease // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4. (4). 397–402.

ASSOCIATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF GENE *GPC5*, *CASQ2*, *NOS1AP*, *GPD1L* WITH SUDDEN CARDIAC DEATH IN RUSSIAN POPULATION

Vladimir Nikolaevich MAKSIMOV^{1,2}, Anastasiya Andreevna IVANOVA¹, Pavel Sergeevich ORLOV^{1,3}, Dinara Yevgenyevna IVANOSHCHUK^{1,3}, Sergey Vladimirovich SAVCHENKO^{2,4}, Mihail Ivanovich VOEVODA^{1,3}

¹ Institute of Internal and Preventive 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 Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630090, Novosibirsk, Academic Lavrentev av., 10

⁴ Novosibirsk Regional Bureau of Forensic Medicine
Novosibirsk, 630087, Nemirovich-Danchenko str., 134

Study objective. To investigate the association of rs3864180 gene *GPC5*, rs3010396 gene *CASQ2*, rs10918859 gene *NOS1AP*, rs9862154 gene *GPD1L* region with sudden cardiac death in the Russian population. Material and methods. A group of individuals who died of sudden cardiac death ($n = 352$), the control group matched by age and sex ($n = 195$), a group of teenagers ($n = 297$). The statistically significant differences between the groups were not found by the frequencies of genotypes and alleles of rs10918859 gene *NOS1AP*, rs9862154 gene *GPD1L* region. The statistically significant differences between the group of men who died of sudden cardiac death and the control group (OR = 0.4, 95 % CI 0.2–0.8, $p = 0.020$; OR = 0.4, 95 % CI 0.2–0.7, $p = 0.006$, respectively) were revealed by the frequencies of genotypes of rs3864180 gene *GPC5*, rs3010396 gene *CASQ2*. rs3864180 gene *GPC5* and rs3010396 gene *CASQ2* are associated with sudden cardiac death in men in the Russian population.

Key words: sudden cardiac death, single nucleotide polymorphism, *GPC5*, *CASQ2*, *NOS1AP*, *GPD1L*.

Maksimov V.N. – doctor of medical sciences, head of laboratory for molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: medik11@mail.ru

Ivanova A.A. – attending physician, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Orlov P.S. – junior researcher, e-mail: dinara2084@mail.ru

Ivanoshchuk D.Y. – junior researcher, e-mail: dinara2084@mail.ru

Savchenko S.V. – doctor of medical sciences, professor of forensic medicine

Voevoda M.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, director, e-mail: mvoevoda@ya.ru

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФОЛАТНОГО ОБМЕНА И ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ СЕРДЦА

Владимир Николаевич МАКСИМОВ^{1,3}, Инна Владимировна ПОЛЯКОВА²,
Юлия Владимировна МАКСИМОВА³, Оксана Николаевна КОВАЛЬ¹,
Михаил Иванович ВОЕВОДА^{1,4}

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

² ФГБУ Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава
России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

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

⁴ ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

Цель исследования – поиск ассоциаций полиморфизмов в генах фолатного обмена с врожденными пороками сердца и данными клинических и параклинических методов исследований. Материал и методы. Дети с врожденными пороками сердца (ВПС), поступившие для хирургического лечения в клинику (225 мальчиков и 225 девочек). В качестве контроля для определения популяционных частот генотипов полиморфизмов *MTHFR* (C677T), *MTRR* (A66G), *RFC1* (A80G), *MTR* (A2756G) были взяты 156 человек из популяционной выборки жителей Новосибирска в возрасте 25–34 года. Результаты и обсуждение. По частотам генотипов (ОНП) генов *MTHFR* (C677T), *MTRR* (A66G), *RFC1* (A80G) значимых различий между группами не обнаружено. По частотам генотипов полиморфизма A2756G гена *MTR* в группе контроля и группе детей с ВПС имеются значимые отличия ($p = 0,04$). Гомозиготы по аллелю 677Т гена *MTHFR* чаще встречаются при тетраде Фалло и других сочетанных ВПС как у мальчиков, так и у девочек. Нарушения проводимости по ЭКГ до операции у мальчиков-носителей генотипа 677СС гена *MTHFR* выявляются в 2,7 раза реже, чем у мальчиков-носителей двух других генотипов (отношение шансов 0,37; 95 % доверительный интервал 0,16–0,86; $p = 0,009$). Частота носителей генотипа 677ТТ в 2 раза выше в группе детей, у которых восстановление сердечной деятельности после окклюзии происходило через атриовентрикулярную блокаду или через фибрилляцию, по сравнению с группой со спонтанным восстановлением сердечной деятельности ($p = 0,01$).

Ключевые слова: врожденные пороки сердца, однонуклеотидные полиморфизмы, популяционная частота, ассоциативное исследование, *MTHFR* (C677T), *MTRR* (A66G), *RFC1* (A80G), *MTR* (A2756G).

Одной из наиболее актуальных задач современной медико-биологической науки является поиск локусов генома, формирующих предрасположенность к мультифакториальным заболеваниям. Изучение генетического компонента подверженности включает идентификацию локусов, повышающих риск развития патологического фенотипа, определение числа функциональных

аллелей для каждого из локусов, относительной частоты каждого аллеля в популяции и оценку влияния генотипических характеристик на возраст проявления, темпы прогрессирования, восприимчивость к различным лечебным воздействиям и исходы заболевания. Значительное число генетических локусов, ассоциируемых с риском развития и патогенетическими особенно-

Максимов В.Н. – д.м.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

Полякова И.В. – врач-анестезиолог-реаниматолог, e-mail: liska-pol@mail.ru

Максимова Ю.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой медицинской генетики и биологии, e-mail: 164706@mail.ru

Коваль О.Н. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: oxen-ok@mail.ru

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

стями мультифакториальных заболеваний, в настоящее время идентифицированы в рамках стратегии «генов-кандидатов». Обнаружение локусов генома, ответственных за формирование наследственной предрасположенности к болезням, приобретает основополагающее значение для определения ключевых звеньев их патогенеза, для раннего выявления подверженных лиц и проведения целенаправленной первичной профилактики, для выбора мишеней с целью поиска новых лекарственных средств, для индивидуализации лечебных режимов и разработки новых диагностических подходов. Поиск генов-кандидатов для распространенных сердечно-сосудистых заболеваний является актуальной научной проблемой, имеющей большое практическое и социальное значение.

Врожденные пороки сердца (ВПС) — одна из основных причин смерти детей первого года жизни. Встречается более 90 вариантов ВПС и множество их сочетаний. Частота ВПС составляет 30 % от всех пороков развития. Около 90 % ВПС относятся к категории мультифакториальных [3].

Первоначально была выявлена связь уровня фолиевой кислоты в организме беременных с частотой пороков нервной трубки у плода, затем показана ассоциация уровня фолиевой кислоты в организме беременных с хромосомной патологией у плода. Когда в широких масштабах начали применять фолиевую кислоту для периконцепционной профилактики пороков нервной трубки у плода, то оказалось, что снижается и частота врожденных пороков сердца, хотя и в меньшей степени [1, 2, 5]. При молекулярно-генетических исследованиях генов, участвующих в метаболизме фолатов (ген 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы *MTHFR* (C677T), ген редуктазы метионинсинтазы *MTRR* (A66G), ген транспортера фолатов *RFC1* (A80G), ген метионинсинтазы *MTR* (A2756G)), сначала обнаружили ассоциацию их полиморфизма с дефектами нервной трубки и синдромом Дауна, а потом уже с ВПС.

MTHFR — ключевой фермент в метаболизме фолатов и гомоцистеина. Вскоре после клонирования и секвенирования последовательности гена *MTHFR* были обнаружены мутации и однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), ассоциированные с повышением уровня гомоцистеина в крови и моче. Одним из первых описанных ОНП был C677T (Ala222Val), который кодирует термолabile фермент со сниженной активностью [12]. Это самая частая генетическая причина гипергомоцистеинемии [6]. Нарушение метаболизма гомоцистеина, обусловленное этим полиморфизмом, ассоциировано с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, де-

фектов нервной трубки у плода и некоторых форм рака. Авторы обзора под говорящим названием «Molecular genetics of *MTHFR*: polymorphisms are not all benign» упоминают 40 мутаций и 60 полиморфизмов [7]. А на момент написания настоящей статьи в базе dbSNP уже имеется 524 ОНП. Естественно, ассоциация с ВПС наиболее изучена для ОНП C677T гена *MTHFR* [13]. G.M. Shaw и соавторы выявили связь полиморфизма A80G гена *RFC1* с частотой ВПС и периконцепционной профилактикой фолиевой кислотой [11]. Цель настоящего исследования — поиск ассоциаций ОНП в генах фолатного обмена с ВПС в целом, с отдельными их видами, с данными клинических методов исследований, с состоянием пациентов (по ряду параметров) до операции, во время и после нее.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследуемую выборку включались дети с разными видами изолированных ВПС (без синдромальной патологии), поступившие для хирургического лечения в клинику Новосибирского НИИ патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина (225 мальчиков и 225 девочек). На первом этапе набирались дети европеоидного происхождения с широким спектром ВПС, но потом набор был ограничен тремя видами ВПС: дефект межпредсердной перегородки (ДМПП), дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП), тетрада Фалло. Средний возраст детей составлял $5,1 \pm 0,2$ года. Сформировать контрольную группу в рамках дизайна случай-контроль не представлялось возможным по целому ряду причин (здоровые дети, соответствующие по полу, возрасту, информированное согласие родителей и т.д.). Поэтому в качестве контроля для определения частот генотипов и аллелей изучаемых полиморфизмов генов-кандидатов были взяты 156 человек из популяционной выборки жителей Новосибирска в возрасте 25–34 года (78 мужчин и 78 женщин). Популяционная выборка жителей г. Новосибирска была сформирована НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН при работе по международному проекту ВОЗ «MONICA» (Мониторинг заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний) [8]. В связи с тем, что в контрольной группе не было обнаружено различий между мужчинами и женщинами по частотам генотипов и аллелей изучаемых ОНП, в последующем при анализе разделение по полу не проводилось. Выделение ДНК из крови осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции [4]. Изучали полиморфизм следующих генов (по опубликованным методикам): ген 5,10-метилен-

тетрагидрофолатредуктазы *MTHFR* (С677Т), ген редуктазы метионинсинтазы *MTRR* (А66G), ген транспортера фолатов *RFC1* (А80G), ген метионинсинтазы *MTR* (А2756G) [10].

Первым этапом статистического анализа определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых ОНП в группе больных ВПС и в контрольной группе, потом оценивали соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга в контрольной группе (по критерию χ^2). Сравнение уровня таких показателей, как рост, масса тела, индекс массы тела, артериальное давление (систолическое, диастолическое, пульсовое), частота сердечных сокращений и др., у носителей разных генотипов проводили после проверки нормальности распределения этих признаков по тесту Колмогорова–Смирнова. Если признак отвечал критериям нормального распределения, то использовали однофакторный дисперсионный анализ. Достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли с помощью *t*-теста для двух независимых выборок. В случае, если изучаемый признак не удовлетворял критериям нормального распределения, сравнение уровня этого признака у носителей разных генотипов проводили с помощью теста Крускала–Уоллиса, достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли с помощью теста Манна–Уитни для двух независимых выборок. Ассоциацию ОНП с ВПС проверяли с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону. В случае четырехпольных таблиц для сравнения выборок по частотам генотипов и аллелей применяли точный двусторонний

критерий Фишера. Относительный риск заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов (ОШ). Сравняли частоты аллелей и генотипов в группе с ВПС в целом, при разделении по полу, по отдельным видам пороков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты генотипов изучаемых полиморфизмов в контрольной группе соответствуют равновесию Харди–Вайнберга. По частотам генотипов полиморфизма А2756G гена *MTR* в группе контроля и группе детей с ВПС имеются значимые отличия ($p = 0,04$). Носители генотипа 2756GG в 2 раза реже встречаются у детей с ВПС, чем в контроле. У мальчиков с ВПС частота генотипа 2756GG меньше, чем у девочек с ВПС (табл. 1).

Гомозиготы по аллелю 677Т гена *MTHFR* несколько чаще, чем в контроле, встречаются при тетраде Фалло и других сочетанных ВПС как у мальчиков, так и у девочек (табл. 2) по сравнению с контролем (различия не достигают уровня статистической значимости). При изолированных ВПС, таких как ДМПП и ДМЖП, частота генотипа 677ТТ у мальчиков не отличается от популяционной или даже несколько ниже нее. При ДМПП частота генотипа 677ТТ у девочек в 4 раза выше, чем у мальчиков, при ДМЖП – наоборот, а при тетраде Фалло частоты генотипа 677ТТ идентичны у мальчиков и девочек. Все это показывает насколько важно сформировать фенотипически однородные группы. Только в этом случае можно будет делать выводы о наличии/отсутствии ассоциации конкретного ОНП с однозначно иден-

Таблица 1

Частоты генотипов полиморфизма С677Т гена *MTHFR*, А66G гена *MTRR*, А80G гена *RFC1*, А2756G гена *MTR* в популяции г. Новосибирска и в группе с ВПС

Ген	Генотип	Контроль		Все дети с ВПС		Мальчики с ВПС		Девочки с ВПС	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>MTHFR</i>	677CC	73	46,9	175	48,2	92	50,5	83	45,9
	677CT	71	45,7	154	42,4	74	40,7	80	44,2
	677TT	12	7,4	34	9,4	16	8,8	18	9,9
<i>MTRR</i>	66GG	59	38,3	127	34,6	62	33,5	65	35,7
	66GA	74	48,1	199	54,2	101	54,6	98	53,8
	66AA	21	13,6	41	11,2	22	11,9	19	10,4
<i>MTR</i>	2756AA	96	63,2	207	57,2	103	56,9	104	57,5
	2756AG	45	29,6	142	39,2	74	40,9	68	37,5
	2756GG	11	7,2	13	3,6	4	2,2	9	5,0
<i>RFC1</i>	80AA	37	23,7	76	21,3	44	24,4	32	18,1
	80AG	82	52,6	177	49,6	86	47,8	91	51,4
	80GG	37	23,7	104	29,1	50	27,8	54	30,5

Таблица 2

Частоты генотипов полиморфизма С677Т гена *MTHFR*, А66G гена *MTRR*, А80G гена *RFC1*, А2756G гена *MTR* у мальчиков и девочек с разными видами ВПС

Генотип	ДМПП		ДМПП и др.		ДМЖП		ДМЖП и др.		Тетрада Фалло	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Мальчики										
<i>MTHFR</i> 677CC	18	56,3	6	31,6	27	55,1	13	44,8	28	52,8
<i>MTHFR</i> 677CT	13	40,6	10	52,6	19	38,8	13	44,8	19	35,8
<i>MTHFR</i> 677TT	1	3,1	3	15,8	3	6,1	3	10,3	6	11,3
Девочки										
<i>MTHFR</i> 677CC	24	48,0	5	35,7	23	47,9	12	40,0	19	48,7
<i>MTHFR</i> 677CT	20	40,0	7	50,0	23	47,9	14	46,7	16	41,0
<i>MTHFR</i> 677TT	6	12,0	2	14,3	2	4,2	4	13,3	4	10,3
Мальчики										
<i>MTRR</i> 66AA	12	36,4	6	31,6	14	28,6	12	41,4	18	32,7
<i>MTRR</i> 66AG	15	45,5	11	57,9	25	51,0	16	55,2	34	61,8
<i>MTRR</i> 66GG	6	18,2	2	10,5	10	20,4	1	3,4	3	5,5
Девочки										
<i>MTRR</i> 66AA	22	43,1	4	30,8	18	37,5	11	35,5	10	25,6
<i>MTRR</i> 66AG	26	51,0	9	69,2	24	50,0	15	48,4	24	61,5
<i>MTRR</i> 66GG	3	5,9			6	12,5	5	16,1	5	12,8
Мальчики										
<i>MTR</i> 2756AA	19	59,4	12	66,7	27	55,1	17	58,6	28	52,8
<i>MTR</i> 2756AG	12	37,5	6	33,3	21	42,9	11	37,9	24	45,3
<i>MTR</i> 2756GG	1	3,1			1	2,0	1	3,4	1	1,9
Девочки										
<i>MTR</i> 2756AA	25	50,0	7	50,0	29	61,7	18	58,1	25	64,1
<i>MTR</i> 2756AG	20	40,0	6	42,9	17	36,2	12	38,7	13	33,3
<i>MTR</i> 2756GG	5	10,0	1	7,1	1	2,1	1	3,2	1	2,6
Мальчики										
<i>RFC1</i> 80AA	5	15,6	5	26,3	7	14,3	11	40,7	16	30,2
<i>RFC1</i> 80AG	17	53,1	7	36,8	26	53,1	10	37,0	26	49,1
<i>RFC1</i> 80GG	10	31,3	7	36,8	16	32,7	6	22,2	11	20,8
Девочки										
<i>RFC1</i> 80AA	11	22,4	4	28,6	7	15,6	3	10,3	7	17,5
<i>RFC1</i> 80AG	22	44,9	8	57,1	23	51,1	16	55,2	22	55,0
<i>RFC1</i> 80GG	16	32,7	2	14,3	15	33,3	10	34,5	11	27,5

тифицированным фенотипом. Есть данные, что наиболее неблагоприятное сочетание факторов в плане риска возникновения у плода ВПР нервной трубки, хромосомной патологии, ВПС состоит в следующем: гомозиготность 677TT по гену *MTHFR* у плода и матери, отсутствие периконцепционной профилактики фолевой кислотой. Но и эти данные нуждаются в проверке и уточнении.

При анализе ассоциаций полиморфизма С677Т гена *MTHFR* с рядом клинических показателей обнаружено, что нарушения проводимости, зарегистрированные на ЭКГ, до операции у мальчиков-носителей генотипа 677CC выявляют-

ся реже, чем у мальчиков-носителей двух других генотипов (ОШ 0,37; 95 % доверительный интервал ДИ 0,16–0,86; $p = 0,009$). Частота носителей генотипа 677TT в 2 раза выше в группе детей, у которых восстановление сердечной деятельности после окклюзии происходило через атриовентрикулярную блокаду или через фибрилляцию, по сравнению с группой со спонтанным восстановлением сердечной деятельности ($p = 0,01$).

В объединенной группе мальчиков с тетрадой Фалло и ДМЖП (в сочетании с другими пороками) частота редкого гомозиготного генотипа по полиморфизму А66G гена *MTRR* в 3 раза ниже, чем в контроле (95 % ДИ 1,1–9,5; $p = 0,045$), в то

время как при изолированных ДМПП и ДМЖП – напротив, 1,5 раза выше, чем в контроле. У мальчиков с изолированными ДМПП и ДМЖП частота генотипа 66AA оказалась в 4 раза выше (95 % ДИ 1,5–15,2; $p = 0,004$), чем у мальчиков с тетрадой Фалло и ДМЖП (в сочетании с другими пороками). У девочек с тетрадой Фалло, изолированным ДМЖП и ДМЖП (в сочетании с другими пороками) частоты редкого гомозиготного генотипа не отличаются от частоты в контроле, а при изолированном ДМПП, ДМПП (в сочетании с другими пороками) – в 3 раза ниже, чем в популяции ($p = 0,05$). При анализе ЭКГ до операции обнаружено, что частота носителей генотипа 66AA среди детей с зубцом Т на изолинии или положительным в 3 раза меньше, чем среди детей с другим положением зубца Т ($p = 0,04$). Имеется тенденция к накоплению носителей генотипа 66AA среди детей с неполной блокадой правой ножки пучка Гиса по сравнению с лицами без данной патологии. Давление в легочной артерии значимо выше у носителей генотипа 66AA по сравнению с носителями двух других генотипов ($p = 0,006$). Артериальное давление до искусственного кровообращения и после него у носителей генотипа 66AA ниже, а в процессе искусственного кровообращения – выше, чем у носителей двух других генотипов. Содержание калия до операции меньше, а суточного хлора – больше у носителей генотипа 66AA по сравнению с носителями двух других генотипов.

Частота генотипов полиморфизма A80G гена *RFC1* у мальчиков значимо отличается в группе с ДМПП и ДМЖП, по сравнению с группой с тетрадой Фалло и другими сочетанными пороками ($p = 0,002$). Частота генотипа 80AA при изолированных ДМПП и ДМЖП у мальчиков в 2 раза ниже, чем при тетраде Фалло и других сочетанных пороках. У девочек нет различий по частотам генотипов гена *RFC1* при разных видах ВПС, но имеется тенденция к накоплению носителей генотипа 80GG по сравнению с контролем. Артериальное давление на этапе раннего послеоперационного периода значимо различалось у носителей гетерозиготного генотипа, по сравнению с гомозиготами обоих типов ($p = 0,022$).

В ходе работы над проектом, которая началась еще в 2003 году, по мере увеличения фенотипически и этнически однородных групп больных с разделением их по полу, выявился ряд ранее не идентифицированных отличий. Проблема формирования групп исследования с максимальным соблюдением принципов фенотипической и этнической однородности трудно разрешима даже при ясном понимании всей ее важности. Первые результаты, полученные в начале работы над

проектом, по мере формирования групп уточнялись, перепроверялись и не всегда подтверждались, что обусловлено неизбежными издержками попыток анализа на сравнительно небольших по объему и недостаточно однородных группах. Это одна из главных причин несовпадения результатов, полученных разными исследователями. В полной мере сопоставимы только результаты многоцентровых исследований, выполненных по идентичному дизайну с постоянным контролем качества. Подтверждение нашего мнения мы нашли в обзоре с метаанализом, выполненном van I.M. Weunum с соавторами, в котором очерчивается целый ряд проблем, усложняющих изучение ассоциации ОНП C677T в гене *MTHFR* с ВПС: гетерогенность данных по популяциям (например, факт периконцепционного применения фолиевой кислоты), разный дизайн исследований, разные типы ВПС. Авторы попытались сравнить результаты 13 исследований: 10 из них были выполнены по дизайну «случай – контроль», а три – на семейном материале с анализом неравновесия по сцеплению. При этом в четырех из 10 исследований «случай – контроль» изучались плоды, в двух – матери, в четырех – те и другие. Все это в совокупности не позволило авторам прийти к сколько-нибудь определенным выводам. Чтобы их сделать, по мнению авторов обзора, нужны большие исследования с хорошо определенными фенотипами и факторами риска [13]. К аналогичному выводу пришли и авторы более поздних метаанализов [9, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружены ассоциации некоторых ОНП в генах фолатного обмена с отдельными видами ВПС и рядом клинических параметров, характеризующих состояние пациентов до, во время и после операции. Подтверждение полученных данных на большой по объему однородной группе больных в исследовании, построенном на принципах доказательной медицины, даст возможность сделать выводы о практическом значении обнаруженных ассоциаций. Проблема поиска надежных информативных прогностических показателей для формирования групп повышенного риска развития заболевания или его осложнений с целью проведения первичной профилактики еще далека от разрешения. Комплекс ОНП идеально подошел бы для решения этой проблемы, в частности, благодаря своей неизменности в течение жизни индивидуума. Но пока мы находимся на этапе накопления знаний, необходимых для его формирования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность академику Юрию Петровичу Никитину и профессору Софье Константиновне Малютиной за предоставленную возможность сформировать контрольную группу на материале когорты MONICA.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ в рамках научно-исследовательского проекта РГНФ («Изучение молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к развитию врожденных пороков сердца»), проект № 05-06-06119а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вайнер А.С., Жечев Д.А., Кечин А.А. и др. Метаболизм фолатов и врожденные аномалии развития // *Мать и дитя в Кузбассе*. 2011. (2). 3–10.
2. Жученко Л.А. Первичная массовая профилактика фолат-зависимых врожденных пороков развития: автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2009.
3. Подзолков В.П., Шведунова В.Н. Врожденные пороки сердца // *Рус. мед. журн.* 2001. 9. (10). 430–433.
4. Смит К., Калко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК // *Анализ генома / Под ред. К. Дейвиса; пер. с англ.* М.: Мир, 1990. 58–94.
5. Czeizel A.E. Primary prevention of neural-tube defects and some other major congenital abnormalities: recommendations for the appropriate use of folic acid during pregnancy // *Paediatr. Drugs*. 2000. 2. (6). 437–49.
6. Frosst P., Blom H.J., Milos R. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase // *Nature Genet.* 1995. 10. 111–113.
7. Leclerc D., Rozen R. Molecular genetics of MTHFR: polymorphisms are not all benign // *Med. Sci.* 2007. 23. (3). 297–302.
8. MONICA Monograph and Multimedia Sourcebook. World's largest study of heart disease, stroke, risk factors, and population trends 1979–2002. Edited by Hugh Tunstall-Pedoe (with 64 other contributors for the WHO MONICA Project) // WHO. Geneva. 2003. 237.
9. Nie Y., Gu H., Gong J. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and congenital heart disease: a meta-analysis // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011. 49. (12). 2101–2108.
10. Relton C.L., Wilding C.S., Pearce M.S. et al. Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population // *J. Med. Genet.* 2004. 41. (4). 256–260.
11. Shaw G.M., Zhu H., Lammer E.J. et al. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects // *Am. J. Epidemiol.* 2003. 158. (8). 747–752.
12. Strain J.J., Doney L., Ward M. et al. B-vitamins, homocysteine metabolism and CVD // *Proc. Nutr. Soc.* 2004. 63. (4). 597–603.
13. Van Beynum I.M., den Heijer M., Blom H.J., Kapusta L. The MTHFR 677C->T polymorphism and the risk of congenital heart defects: a literature review and meta-analysis // *QJM.* 2007. 100. (12). 743–53.
14. Yin M., Dong L., Zheng J. et al. Meta analysis of the association between MTHFR C677T polymorphism and the risk of congenital heart defects // *Ann. Hum. Genet.* 2012. 76. (1). 9–16.

POLYMORPHISM OF FOLATE-RELATED GENES AND CONGENITAL HEART DISEASES

Vladimir Nikolaevich MAXIMOV^{1,3}, Inna Vladimirovna POLYAKOVA²,
Julia Vladimirovna MAKSIMOVA³, Oksana Nikolaevna KOVAL³,
Mikhail Ivanovich VOEVODA^{1,4}

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

² Institute of Circulation Pathology, of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15

³ Novosibirsk State Medical University,
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

⁴ Institute of Cytology and Genetics of SB RAS,
630090, Novosibirsk, Akademicheskaya str., 10

Aim: To study the associations between polymorphism of folate metabolism genes with congenital heart diseases (CHD), paraclinical and clinical features. **Methods:** Children with congenital heart disease received surgical treatment at the clinic (225 boys and 225 girls). The 156 residents of Novosibirsk population sample aged 25–34 years were examined as a control to determine the population genotype frequencies of polymorphisms of *MTHFR* (C677T), *MTRR* (A66G), *RFC1* (A80G), *MTR* (A2756G). **Results:** The differences in genotypes frequencies of SNPs of *MTHFR*, *MTRR* and *RFC1* genes between patients with CHD and control have not been found. Statistically significant differences ($p = 0.04$) between compared groups were observed for A2756G polymorphism of *MTR* gene. The homozygous 677TT of the *MTHFR* gene were more frequent in patients with Fallo's tetrad and other combined heart defects in both sexes. Boys with *MTHFR* 677CC genotype had lower frequency of conductivity abnormalities before operation than patients with two other genotypes (OR 0.37; 95 % CI 0.16–0.86; $p = 0.009$). It was also noted that patients with *MTHFR* 677TT genotype had higher frequency of AV blockade or atrial fibrillation after surgery ($p = 0.01$).

Key words: congenital heart diseases, SNP, population frequency, association study, *MTHFR* (C677T), *MTRR* (A66G), *RFC1* (A80G), *MTR* (A2756G).

Maximov V.N. – doctor of medical sciences, head of the laboratory for molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: medik11@mail.ru

Polyakova I.V. – anaesthesiologist-resuscitation specialist, e-mail: liska-pol@mail.ru

Maximova J.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of medical genetics and biology, e-mail: 164706@mail.ru

Koval O.N. – junior researcher of the laboratory for molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: oxen-ok@mail.ru

Voevoda M.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, director, e-mail: mvoevoda@ya.ru

ЛЕЧЕНИЕ ОНИХОМИКОЗА СТОП, ОБУСЛОВЛЕННОГО *TRICHOPHYTON RUBRUM*, У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Ольга Васильевна РАЙДЕНКО¹, Николай Николаевич КЛИМКО²

¹ КГБУЗ Алтайский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИДом
и инфекционными заболеваниями
656010, г. Барнаул, ул. 5-я Западная, 62

² ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова Минздрава России
194291, г. Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1

Цель исследования – изучить эффективность флуконазола и тербинафина в лечении онихомикоза стоп, обусловленного *T. rubrum*, у ВИЧ-инфицированных пациентов. Материалы и методы. В исследование были включены 24 ВИЧ-инфицированных пациента с микологически подтвержденным онихомикозом стоп, обусловленным *T. rubrum*. Пациенты были разделены на две группы: в 1-й группе (14 человек) применяли флуконазол по 150 мг 1 раз в неделю, во 2-й группе (10 пациентов) – тербинафин по 250 мг в сутки. Результаты. Срок лечения варьировал от 3 до 9 месяцев. Через 3–4 месяца терапии клиническое и микологическое излечение наступило лишь у 30 % пациентов в обеих группах. У 70 % больных продолжительность лечения составила 5–9 месяцев. При использовании флуконазола клиническое и микологическое излечение отмечено у 85,7 % пациентов, тербинафина – у 90 % ($p > 0,05$). Выраженных побочных эффектов и лекарственных взаимодействий в обеих группах не зарегистрировано. Выводы. У ВИЧ-инфицированных пациентов с онихомикозом стоп, обусловленным *T. rubrum*, продолжительное (3–9 месяцев) применение флуконазола и тербинафина эффективно и безопасно. Для определения препарата выбора требуется более крупное рандомизированное исследование.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, онихомикоз стоп, лечение, тербинафин, флуконазол, *T. rubrum*.

Микозы кожи и ногтей довольно часто регистрируются у больных ВИЧ-инфекцией. По оценкам различных авторов, у данной категории пациентов доля онихомикозов в общей структуре поверхностных микозов варьирует от 15 до 40 % [12, 16]. Следует отметить, что микозы кожи и ногтей у ВИЧ-инфицированных лиц характеризуются выраженными клиническими проявлениями, распространенностью патологического процесса, нередко возникают трудности в подборе и эффективности терапии [13]. В настоящее время имеются скудные сведения об эффективности антимикотических препаратов в лечении онихомикозов у ВИЧ-инфицированных пациентов, что требует дальнейшего изучения данного вопроса.

Целью нашего исследования было изучить эффективность тербинафина и флуконазола в лечении онихомикоза стоп, обусловленного грибом *Trichophyton rubrum*, у ВИЧ-инфицированных пациентов в Алтайском крае.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование проспективно включены ВИЧ-инфицированные пациенты, состоящие на диспансерном учете в Алтайском краевом центре по профилактике и борьбе со СПИДом, которые проходили профилактический осмотр у врача-дерматовенеролога в течение 2010–2012 гг. ВИЧ-инфекция диагностирована на основании эпидемиологических данных и подтверждена путем обнаружения антител методами ИФА и иммунного блоттинга на тест-системе New Lav Blot 1 (Bio-Rad, США) к белкам вируса иммунодефицита человека I типа. Для верификации диагноза онихомикоза проводили клинический осмотр больных, микроскопию и посев патологического материала. Для микроскопии брали соскобы с пораженных участков ногтей при помощи скальпеля. Патологический материал для исследования забирали с поверхностных и средних слоев

Райденко О.В. – врач-дерматовенеролог, e-mail: olgaray2007@rambler.ru

Климко Н.Н. – д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической микологии, иммунологии и аллергологии, e-mail: n_klimko@mail.ru

ногтевых пластин, помещали в пробирку с 20 % раствором КОН на 3 ч, после чего переносили на предметное стекло, наложив покровное стекло, и проводили световую микроскопию. Культивирование выполняли на картофельном агаре при температуре 28 °С. Идентифицировали полученные культуры с учетом роста колоний и по микроморфологическим признакам. Из 240 ВИЧ-инфицированных пациентов с микозами кожи и ногтей изолированный онихомикоз стоп был диагностирован у 113 больных.

В лечение взято 24 ВИЧ-инфицированных пациента с онихомикозом стоп, обусловленным *T. rubrum*, среди них 16 (66,7 %) мужчин и 8 (33,3 %) женщин. Перед началом терапии проанализировано наличие кандидоза полости рта, на основании чего всех пациентов разделили на 2 группы: I группа – ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие флуконазол в дозе 150 мг 1 раз в неделю, и II группа – ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие тербинафин по 250 мг 1 раз в сутки ежедневно. Все больные находились под динамическим наблюдением в течение всего периода лечения и 6 месяцев после окончания терапии. Производился клинико-лабораторный мониторинг: 1 раз в месяц оценивали динамику клинических проявлений онихомикоза, 1 раз в месяц забирали кровь для анализа изменений биохимических показателей, микологический контроль осуществляли 1 раз перед началом терапии и 1 раз после окончания лечения. Различия между группами оценивали с помощью точного критерия Фишера и считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Онихомикоз стоп был представлен дистально-латеральной и тотальной клиническими формами, в I группе таких пациентов было соответственно 10 и 4, во II – 4 и 6. Из 14 пациентов I группы клиническое и микологическое излечение наступило у 12 (85,7 %) ВИЧ-инфицированных. 1 пациент самостоятельно прервал терапию. У 1 больного эффекта от терапии не было. После 16 недель лечения выздоровление зарегистрировано у 4 (28,5 %) пациентов. У 8 (57,2 %) ВИЧ-инфицированных больных клиническое и микологическое излечение наступило через 5 (2 пациента), 6 (2 больных), 7 (2 пациента) и 9 (2 больных) месяцев терапии. Из 10 ВИЧ-инфицированных II группы клиническое и микологическое излечение наступило у 9 (90 %) пациентов. Однако через 6 месяцев наблюдения у 1 пациента возник рецидив, что потребовало повторного назначения антимикотической терапии.

У 1 пациента выздоровление наступило через 12 недель терапии, у 2 – через 16 недель, у 3 – через 6 месяцев, у 2 – через 7 месяцев, у 1 – через 9 месяцев.

Онихомикоз стоп – в общей структуре поверхностных микозов наиболее часто регистрируемая патология у ВИЧ-инфицированных пациентов [12, 16]. Наличие у таких больных иммунодефицита разной степени влечет за собой выраженные клинические проявления, быстрое распространение патологического процесса и даже развитие более тяжелых осложнений, таких как инвазивные микозы [13]. Вследствие этого необходимо своевременное выявление данной патологии и назначение адекватной терапии.

При подборе антимикотических средств может возникнуть ряд трудностей, связанных с наличием у ВИЧ-инфицированных пациентов вирусных гепатитов, кандидоза полости рта, проведением антиретровирусной терапии. Масштабных исследований эффективности противогрибковых препаратов в лечении дерматомикозов у ВИЧ-инфицированных больных в мире не проводилось. Ряд зарубежных авторов изучали эффективность флуконазола и тербинафина, однако группы пациентов были малочисленны, в России же не было ни одного такого исследования [17].

Мы использовали данные крупных трайлов, первым из которых является выполненное в 1999 г. многоцентровое, рандомизированное, проспективное, двойное слепое исследование L.I.O.N., охватившее 496 иммунокомпетентных больных дерматофитным онихомикозом стоп в 6 европейских странах. Установлено, что наиболее эффективными препаратами для лечения грибковых поражений ногтей являются тербинафин и итраконазол [9]. Также обнаружено, что итраконазол взаимодействует с рядом антиретровирусных препаратов и противопоказан при наличии вирусных гепатитов [1]. При этом потенциал лекарственных взаимодействий тербинафина с другими препаратами низкий. Вместе с тем у 57 ВИЧ-инфицированных пациентов при лечении онихомикоза тербинафином нарушений функции печени не зарегистрировано даже при серологически подтвержденном гепатите [7]. Учитывая, что ВИЧ-инфицированные больные входят в группу риска по лекарственным взаимодействиям, связанным с наличием вирусных гепатитов [8] и антиретровирусной терапией, для системной терапии онихомикозов у ВИЧ-инфицированных необходимо использовать тербинафин [6, 7]. Однако данный препарат имеет ограниченный спектр действия, обладая исключительной активностью в отношении дерматофитов рода *Trichophyton* [3]. Вследствие этого в

нашем исследовании тербинафин назначили пациентам с онихомикозом стоп, обусловленным *T. rubrum* без сопутствующего кандидоза полости рта, и он был эффективен в лечении онихомикоза у 90 % ВИЧ-инфицированных больных; лекарственные взаимодействия и побочные эффекты не зарегистрированы.

Известно, что у больных ВИЧ-инфекцией полость рта достаточно сильно колонизирована дрожжевыми грибами [14]. По оценкам различных исследователей, как в России, так и за рубежом, частота поражения ротовой полости кандидозом у ВИЧ-инфицированных лиц составляет около 33 %, а у пациентов со СПИДом достигает 85 % [4, 11]. Препаратом выбора для лечения кандидоза полости рта является флуконазол [2]. Наряду с этим опыт применения флуконазола в лечении онихомикоза в нашей стране ограничен, его назначают преимущественно при поражениях, обусловленных дрожжеподобными грибами рода *Candida*. Вместе с тем этот антимикотик, обладая широким спектром противогрибковой активности и благоприятным профилем безопасности, может быть альтернативой тербинафину и итраконазолу [2]. Данные многочисленных зарубежных исследований, проведенных у иммунокомпетентных лиц, свидетельствуют о высокой эффективности флуконазола в лечении онихомикоза, обусловленного грибами рода *Trichophyton* [5, 10, 15], на основании чего больным, у которых диагностировали кандидоз полости рта в качестве сопутствующей патологии, был назначен флуконазол в стандартных дозировках. Установлено, что срок терапии у 70 % больных в обеих группах составил 5–9 месяцев, что значительно больше стандартных рекомендованных (3 и 4 месяца); препарат был эффективен у 86 % пациентов. Лекарственных взаимодействий и изменений в биохимических показателях крови не зарегистрировано.

К. Рандуа в исследовании, включавшем 20 ВИЧ-инфицированных больных онихомикозом, показал, что применение флуконазола в дозе 150 мг в неделю и тербинафина в дозе 250 мг ежедневно в течение 12 недель обеспечивает сходный терапевтический эффект [17], что сопоставимо с полученными нами результатами.

Например, тербинафин может быть препаратом выбора для лечения дерматофитного онихомикоза стоп у ВИЧ-инфицированных больных без поражения полости рта грибами рода *Candida*. В случае сочетания онихомикоза стоп, обусловленного *T. rubrum*, и орофарингеального кандидоза у данной категории лиц препаратом выбора для лечения онихомикоза может быть флуконазол.

ВЫВОДЫ

1. У ВИЧ-инфицированных пациентов с онихомикозом стоп, обусловленным *T. rubrum*, продолжительное (3–9 месяцев) применение флуконазола и тербинафина эффективно и безопасно.

2. Для определения препарата выбора требуется более крупное рандомизированное исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману / Общ. ред. А.Г. Гилман. М.: Практика, 2006. 1850 с.
2. Кубанова А.А., Степанова Ж.В., Воробьева И.А. Альтернативный метод лечения онихомикоза дифлюканом // Фарматека. 2003. (9). 30–34.
3. Сергеев А.Ю. Современные подходы к терапии и профилактике онихомикозов // Фарматека. 2001. (6). 35–39.
4. Тертышников В.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика некоторых микозов у ВИЧ-инфицированных женщин, находящихся в условиях пенитенциарной системы // Фундаментальные исследования. 2009. (5). 113–117.
5. Assaf R.R., Elewski B.E. Intermittent fluconazole dosing in patients with onychomycosis: Results of a pilot study // J. Am. Acad. Dermatol. 1996. 35. 216–219.
6. Cribier B.J., Bakshi R. Terbinafine in the treatment of onychomycosis: a review of its efficacy in high-risk populations and in patients with nondermatophyte infections // Br. J. Dermatol. 2004. 150. 414–420.
7. Elewski B., Tavakkol A. Safety and tolerability of oral antifungal agents in the treatment of fungal nail disease: a proven reality // Ther. Clin. Risk Manag. 2005. 1. (4). 299–306.
8. Elewski B., Smith S. The safety and efficacy of terbinafine in patients with diabetes and patients who are HIV positive // Cutis. 2001. 68. 23–29.
9. Evans E.G., Sigurgeirsson B. Double blind, randomised study of continuous terbinafine compared with intermittent itraconazole in treatment of toenail onychomycosis. The LION Study Group // Br. Med. J. 1999. 318. 1031–1035.
10. Fräki J.E., Heikkilä H.T., Kero M.O. et al. An open-label, non-comparative, multicenter evaluation of fluconazole with or without urea nail pedicure for treatment of onychomycosis // Curr. Ther. Res. 1997. 58. (8). 481–491.
11. Gileva O.S., Sazhina M.V., Gileva E.S. et al. Spectrum of oral manifestations of HIV/AIDS in the Perm region (Russia) and identification of self-induced ulceronecrotic lingual lesions // Med Oral. 2004. 9. 212–215.
12. Gupta A.K., Taborda P., Taborda V. et al. Epidemiology and prevalence of onychomycosis in

HIV-positive individuals // Int. J. Dermatol. 2000. 39. (10). 746–753.

13. Herranz R., Garcia J., De Lucas R. et al. Toenail onychomycosis in patients with acquired immune deficiency syndrome: treatment with terbinafine // Br. J. Dermatol. 1997. 137. 577–580.

14. Junqueira J.C., Vilela S.F., Rossoni R.D. et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2012. 54. 17–24.

15. Kuokkanen K., Alava S. Fluconazole in the treatment of onychomycosis caused by dermatophytes // J. Dermatol. Treat. 1992. 3. 115–7.

16. Moreno-Coutino G., Arenas R., Reyes-Teran G. Clinical presentation of onychomycosis in HIV/AIDS: a review of 280 mexican cases // Indian J. Dermatol. 2011. 56. (1). 120–121.

17. Pandya K. Antifungal treatment for onychomycosis in HIV patient // Ann. Dermatol. Venereol. 2002. 129. 1S670.

TREATMENT OF FEET ONYCHOMYCOSIS CAUSED BY *TRICHOPHYTON RUBRUM* AT THE HIV-INFECTED PATIENTS

Olga Vasil'evna RAYDENKO¹, Nikolai Nikolaevich KLIMKO²

¹ Altay Regional Center for Prevention and against AIDS and Infectious Diseases
656010 Barnaul, 5th Zapadnaya str., 62

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
194291 St. Petersburg, Santiago de Cuba str., 1

Objective: to study the effectiveness of fluconazole and terbinafine in the treatment of onychomycosis of feet caused by *T. rubrum* in HIV-infected patients. Materials and methods. The study included 24 HIV-infected patients with mycologically confirmed feet onychomycosis caused by *T. rubrum*. Patients were divided into two groups: fluconazole of 150 mg was used once a week in group 1 ($n = 14$), terbinafine of 250 mg per day — in the 2nd group (10 patients). Results. Duration of treatment ranged from 3 to 9 months. The clinical and mycological cure occurred only 30 % of patients in both groups after 3–4 months of therapy. The treatment duration was 9.5 months in 70 % of patients. For the use of fluconazole the clinical and mycological cure was seen in 85.7 % (12/14) of patients, for terbinafine – in 90 % (9/10) ($p > 0,05$). The severe side effects and drug interactions have not been registered in both groups. Conclusions. The long-term (3–9 months) use of fluconazole and terbinafine was effective and safe in HIV-infected patients with feet onychomycosis caused by *T. rubrum*. The larger randomized study is required to determine the drug of choice.

Key words: HIV-infection, onychomycosis of feet, treatment, terbinafine, fluconazole, *T. rubrum*.

Raydenko O.V. – dermatologist, e-mail: olgaray2007@rambler.ru

Klimko N.N. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair of clinical mycology, allergology and immunology, e-mail: n_klimko@mail.ru

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ МЕДИКО-ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Анатолий Иванович Бабенко¹, Олег Владимирович ПУШКАРЕВ^{1,2}

¹ ФГБУ НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН 654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23

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

Статья посвящена комплексной оценке эффективности системы здравоохранения: предлагаются критерии оценки эффективности, методики расчета, математическая модель и экономический анализ потерь капитала здоровья. При этом эффективность системы рассматривается на трех уровнях: государственном, региональном и муниципальном. Вводится новый критерий – регулирующий эффект системы здравоохранения, основанный на соизмерении полученных результатов (снижение потерь капитала здоровья) с затратами (консолидированный бюджет здравоохранения) за определенный интервал времени. Разработаны компьютерные программы MEDECAN и MEDEF, позволяющие решать задачи количественного расчета медико-экономической эффективности многопрофильной больницы.

Ключевые слова: эффективность здравоохранения, человеческий капитал, математическое моделирование в здравоохранении.

Проблема комплексной оценки эффективности здравоохранения – одна из важнейших теоретических и прикладных проблем современной организации и экономики здравоохранения. В настоящее время при переходе от принципов традиционного (рационального) планирования к стратегическому становится важной задачей разработка методологических и методических подходов к оценке медико-экономической эффективности отдельных элементов здравоохранения. Если рассмотреть дифференцированно (см. таблицу) основные страты населения (популяция, контингент, коллектив, семья, индивид), существующие элементы здравоохранения, организации медицинской помощи и направления научных исследований на каждом из уровней, то можно определить, насколько каждое звено, каждая страта подкреплена соответствующим элементом здравоохранения и уровнем научного познания [2].

В данной статье система здравоохранения, деятельность лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) рассматриваются только как объект комплексного медико-экономического анализа. Задача заключалась в следующем:

– четко выяснить взаимосвязь и структуру свойств, определяющих эффективность функционирования системы здравоохранения на различных уровнях иерархии, которые должны быть учтены при медико-экономическом анализе;

– выбрать основу, на которой должен базироваться разрабатываемый математический аппарат для оценки эффективности здравоохранения на соответствующих уровнях исследования;

– максимально использовать современные информационные технологии.

Для углубленного изучения медико-экономической эффективности здравоохранения нами предложены концептуальная модель, комплексная методика исследования, математические модели с использованием оптимизационных и вероятностно-статистических методов и разработаны компьютерные программы расчета медико-экономической эффективности и анализа эффективности затрат. Для решения этих проблем использовались методология и методы системного анализа с учетом требований клинической эпидемиологии – научно доказательной медицины. При этом научной основой принятия решений становятся данные грамотно проведенных исследований с привле-

Бабенко А.И. – д.м.н., проф., рук. лаборатории стратегического планирования в здравоохранении, e-mail: bai@soramn.ru

Пушкарев О.В. – д.м.н., проф. кафедры экономики и управления в здравоохранении, e-mail: olegpushkarev@ngs.ru

Таблица

Население, элементы системы здравоохранения и предмет научного познания

Страта населения	Элемент системы здравоохранения	Предмет научного познания
Жители территории Страна, регион, город, район	Здравоохранение территории	Взаимосвязь развития общества и здоровья населения: человеческий капитал, капитал здоровья, эффективность управления
Контингенты Дети, подростки, взрослые, население трудоспособного возраста, инвалиды, больные и т.д.	Медико-социальные сферы Оплата труда, пенсионное обеспечение, охрана материнства и детства, педиатрическая, онкологическая службы и т.д.	Процесс формирования потерь капитала здоровья у отдельных контингентов населения. Популяционные исследования анализа эффективности затрат
Коллективы Трудовые, учащейся молодежи, школьников, учреждений и т.д.	Медико-санитарное обеспечение Лечебно-профилактические учреждения, врачи школ и детских дошкольных учреждений	Взаимосвязь реализации цели функционирования коллектива со здоровьем населения или его членов. Медико-экономическая эффективность ЛПУ
Семья Функции – репродуктивная, воспитательная, экономическая, хозяйственно-бытовая, досуговая и т.д.	Семейная медицина Семейные врачи	Взаимосвязь реализации функции семьи со здоровьем ее членов.
Индивид	Отдельные медицинские службы и врачи-специалисты	Функционирование органов, тканей и систем организма человека в норме и патологии

чением экономического анализа, основанного на математических расчетах и доказательствах.

В деле охраны здоровья населения региона, территории существует два концептуальных подхода: первый рассматривает население в качестве цели его развития (улучшения качества жизни, увеличения продолжительности жизни, уменьшения заболеваемости и инвалидности и т. д.), второй – как средство для решения экономических и технологических проблем региона (например, увеличение валового внутреннего продукта (ВВП)). Соответственно этому исследование эффективности здравоохранения отражает основные принципы этих подходов. Поэтому центральным звеном в оценке эффективности здравоохранения, отражающей различные процессы формирования здоровья населения, может служить концепция человеческого капитала, а именно, капитала здоровья [1].

Исследования проводились для трех иерархических уровней управления.

Первый уровень государственного, регионального и муниципального управления здравоохранением (соответственно Россия, Новосибирская область и г. Новосибирск). На этом уровне медико-экономическая эффективность оценивалась через ее влияние на изменение человеческого капитала, а именно капитала здоровья, с двух сторон. С одной стороны, определяется прямой ущерб общества от потерь человеко-лет активной жизни трудоспособного и потенциально

трудоспособного населения. Ущерб оценивается потерями ВВП. С другой стороны, под медико-экономической эффективностью деятельности системы управления понимается комплексная характеристика потенциальных и/или реальных медико-социальных результатов функционирования системы, отнесенных с объемом ресурсов, затрачиваемых для их достижения. Поэтому для оценки эффективности системы здравоохранения на уровне государственного, регионального или муниципального управления введено новое понятие – регулирующий эффект системы здравоохранения (РЭЗ). Под РЭЗ понимается степень увеличения или уменьшения потерь человеко-лет из-за преждевременной смертности, заболеваемости и инвалидности всего населения с изменением затраченных на это ресурсов здравоохранения.

Данный показатель впервые позволяет соизмерить полученные результаты (потери капитала здоровья) с затратами (консолидированный бюджет здравоохранения) за определенный интервал времени (год, месяц) при текущем управлении или в период реформирования системы здравоохранения. РЭЗ определяется следующим образом:

$$РЭЗ = \frac{\Delta ПКЗ}{\Delta ПЗЗ} = \frac{\left(\frac{ПКЗРВ - ПКЗПВ}{ПКЗПВ} \right)}{\left(\frac{ЗЗРВ - ЗЗПВ}{ЗЗПВ} \right)},$$

где ΔПКЗ – приращение потерь человеко-лет в относительных единицах за расчетный период

времени; ДПЗЗ – приращение затрат на здравоохранение в относительных единицах за это же время; ПКЗРВ – потери человеко-лет за расчетный период времени; ПКЗПВ – потери человеко-лет в предыдущий год (месяц); ЗЗРВ – затраты на здравоохранение за расчетный период времени, тыс. рублей; ЗЗПВ – затраты на здравоохранение в предыдущий год (месяц), тыс. рублей.

Второй уровень – оценка и выбор отдельных крупных популяционных альтернативных медицинских программ и методов профилактики и лечения, принимаемых на определенном уровне управления. Анализ эффективности затрат – это метод поиска оптимального баланса между финансовыми и нефинансовыми показателями [3]. Эффективное здравоохранение при имеющихся ресурсах обеспечивает оптимальную для популяции медицинскую помощь, но не максимальную для индивида. Бесплатно для населения при заданном уровне финансирования должна обеспечиваться оптимальная для популяции медицинская помощь.

Третий уровень – это уровень ЛПУ и их отделений. Медико-экономическая эффективность ЛПУ – это комплексная характеристика потенциальных и/или реальных медико-социальных результатов функционирования ЛПУ, отнесенных с объемом ресурсов, затрачиваемых для их достижения; ее показателем является вероятность достижения цели – оптимального соотношения «затраты – эффект». Для медико-экономической эффективности – вероятность достижения определенного соотношения «затраты – экономический эффект», для социально-экономической эффективности – вероятность достижения определенного соотношения «затраты – социально-экономический эффект».

На всех трех уровнях медико-экономический анализ «затраты – эффективность» связан с проблемой выбора. Первая задача такого анализа состоит в выборе модели, используемой для исследования процесса функционирования системы, и определении критериев, полезных для принятия решения о распределении ограниченных ресурсов по различным направлениям их использования. Другой важной чертой анализа является то, что он работает и с затратами, и с результатами. Следовательно, вторая задача экономической оценки «затраты – эффективность» – идентификация, измерение, оценка и сравнение затрат и результатов рассматриваемых альтернатив. Решение этих задач на каждом уровне анализа эффективности обуславливает наличие трех компонентов научного исследования.

Первый компонент научного исследования соответствует первому уровню анализа эффек-

тивности здравоохранения. Выяснение характера и закономерностей взаимосвязи между показателем экономического развития региона (ВВП) и здравоохранением, важнейшей социальной сферой общества, и здоровьем людей (капиталом здоровья) есть одна из основных проблем медицины. Учитывая разнообразие факторов, влияющих на формирование общественного здоровья, и его значимость как одного из важнейших ресурсов, следует считать, что капитал здоровья населения – это интегральный показатель оценки успешности проводимых реформ системы здравоохранения. С другой стороны, необходимо определить потери ВВП в результате потерь капитала здоровья трудоспособного населения.

На этой основе была предложена методика расчета потерь капитала здоровья. Для интегральной оценки этих потерь рекомендуется использовать критерий эффективности – потери валового внутреннего продукта в результате потерь человеко-лет активной жизни трудоспособного населения в определенном интервале времени. Математическая модель описывает функциональные связи между ними. Учитываются потери капитала здоровья от преждевременной и младенческой смертности, низкой рождаемости, высокого уровня заболеваемости, инвалидности, аборт и накопления «груза болезней». Исследования потерь капитала здоровья и его отдельных составляющих проведены для России, Новосибирской области и г. Новосибирска. Потери человеко-лет активной жизни рассчитаны для трудоспособного периода времени с учетом среднегодовой численности населения, занятого в экономике. Исследования позволили оценить, во сколько обходится обществу нездоровье населения. Показано, что расходы на здравоохранение ни в России, ни в области и городе не соответствуют их пороговому значению, принятому ВОЗ (5 % от ВВП), потери ВВП в результате потерь капитала здоровья трудоспособного населения составляют 6–10 % от ВВП и в 3–5,5 раза превышают расходы на здравоохранение. Экономические потери общества из-за потерь капитала здоровья значительно превышают расходы на здравоохранение [5].

Регулирующий эффект системы здравоохранения, используемый на первом уровне анализа эффективности ЗО, определяется как отношение приращения потерь капитала здоровья к приращению затрат, выраженных в относительных единицах. РЭЗ позволяет соизмерить полученные результаты (изменение общих потерь капитала здоровья) с затратами (изменением интегрального бюджета здравоохранения) за определенный интервал времени при текущем управлении или в период реформирования системы здравоохранения.

ния. Анализ изменения РЭЗ для России показал, что в 1997–2000 гг. общей положительной тенденции в управлении здравоохранением не наблюдалось, что и вызвало необходимость его реформирования. Этот показатель может успешно использоваться для оценки проводимых реформ здравоохранения на любом уровне управления.

Заболеваемость и инвалидность – основные регулируемые показатели здоровья нации и одни из важнейших государственных проблем в социальной сфере. Ими определяется и сверхсмертность. Поэтому первый компонент исследования включает также подробный анализ корреляции между заболеваемостью и инвалидностью, с одной стороны, и ресурсами здравоохранения и социальными ресурсами – с другой.

Исследования основных социально-экономических причин роста заболеваемости и инвалидности в регионе и, соответственно, роста потерь человеческого капитала показали, что одним из главных аргументов их социально-экономической природы являются неравномерность распределения и недостаток ресурсов здравоохранения, что способствует быстрому росту уровня заболеваемости и «вхождению из заболеваемости в инвалидность». Исследование влияния на заболеваемость и инвалидность ресурсов здравоохранения (обеспеченность врачами и другим медицинским персоналом; квалификация врачей и среднего медицинского персонала; количество посещений поликлиник на одного жителя; расходы на медицинскую помощь на одного жителя в каждом районе) показало, что число пролеченных больных положительно коррелирует почти со всеми компонентами ресурсов здравоохранения как в регионе, так и в районах города и области, но имеет отрицательную корреляцию с числом инвалидов. Особенно четко эта зависимость проявляется в районах области, где установлено, что чем меньше в районе врачей и среднего медицинского персонала, меньше уровень посещаемости поликлиник, тем меньше количество пролеченных больных, но выше уровень инвалидизации населения. Недостаточная обеспеченность врачами всех специальностей и посещений поликлиник на одного жителя каждого района города и области являются определяющими факторами роста инвалидности. Следовательно, утверждение, что заболеваемость мало влияет на потери капитала здоровья, некорректно. Это влияние опосредовано через рост инвалидности. Кроме того, расходы на медицинскую помощь на одного жителя в каждом районе разные. В районах, где удельное финансирование высокое, больше пролеченных больных, снижается показатель первичного выхода на инвалидность. Это свидетельствует о на-

личии прямой связи финансирования здравоохранения и уровня потерь человеческого капитала. Реализация новых медицинских технологий, повышение качества лечения и реабилитации больных, оптимизация первичной медико-санитарной помощи способствуют уменьшению количества инвалидов, росту капитала здоровья и уменьшению неэффективного использования потенциала здравоохранения.

Следующая причина социально-экономической природы роста заболеваемости и инвалидности – неэффективное использование социальных ресурсов. Исследование корреляции между инвалидностью и заболеваемостью и компонентами социальных ресурсов (среднесписочная численность работников на 1000 человек; число реальных работников, приходящих на одного инвалида; средняя заработная плата в районе; социальные выплаты) показали, что районы с высоким уровнем занятости трудоспособного населения, заработной платы и социальных выплат имеют значительно меньший уровень заболеваемости и инвалидности.

При формировании адекватных рекомендаций для принятия управленческих решений с целью увеличения капитала здоровья необходимо организовать существующую информацию (районы с их ресурсами) в наглядные структуры. Для этого были объединены районы города и области в кластеры – группы со схожими показателями. Кластерный анализ, проведенный с помощью метода К средних, позволяет сопоставить положение районов. Это дает возможность определить основные направления и задачи при принятии социально-экономических решений с целью уменьшения заболеваемости и инвалидности, выявления общих причин потерь капитала здоровья в объединенных в кластеры районах города и области.

Второй компонент научного исследования соответствует второму уровню анализа эффективности системы здравоохранения. В отечественной и международной практике разработаны и используются научно обоснованные критерии для оценки медицинских вмешательств, оптимальных для популяции в целом и для отдельных больных. Нами до практической реализации доведен анализ эффективности затрат (АЭЗ). Разработана оптимизационная математическая модель АЭЗ с применением методов линейного программирования. На основе этой модели составлена компьютерная программа анализа эффективности затрат для оценки и выбора отдельных крупных популяционных альтернативных медицинских программ и методов профилактики и лечения. Оптимизационная модель реали-

зована с помощью надстройки ADD in «Solver» в Microsoft Excel 2003. АЭЗ позволяет выбрать клинические рекомендации, оптимальные для популяции в целом, и наиболее эффективно использовать ограниченные ресурсы. Результаты могут быть не самыми выгодными для отдельного больного, но наиболее полезными для здоровья общества в целом и для увеличения капитала здоровья популяции. Этот метод является аналитическим инструментом, который рекомендуется использовать для оказания помощи лицам, принимающим решения, в проведении оценки и сравнении затрат и эффективности альтернативных путей достижения целей.

Третий компонент научного исследования – медико-экономическая эффективность многопрофильных клинических больниц и их отделений. Для анализа работы ЛПУ используются разнообразные показатели, которые отражают различные стороны стационарной медицинской помощи. Необходима разработка интегрального критерия медико-экономического анализа (анализа «затраты – эффективность») функционирования подразделений и больницы в целом. Такой критерий поможет принимать научно-обоснованные управленческие решения при распределении ресурсов по различным статьям между отделениями и оценке деятельности ЛПУ. При выборе критерия медико-экономической эффективности и создании модели учитывалось то, что система здравоохранения и ее элементы – стохастические системы. С учетом стохастической природы изучаемых процессов создана вероятностно-статистическая математическая модель оценки эффективности многопрофильной больницы [4]. Теория вероятностно-статистических решений дает основу для количественного подхода к очень сложным административным и организационным задачам, которые до самого последнего времени считались недоступными для математических методов. При разработке математической модели учитывалось то обстоятельство, что в последнее десятилетие произошло смещение научных приоритетов с вопроса разработки и внедрения новых технологий управления, ориентированных

на экономию издержек («минимизация затрат»), к вопросам эффективности и оптимальности расходования средств (оценка «затраты – эффективность»). Практическая ценность математической модели заключается в возможности количественной оценки медико-экономической эффективности функционирования подразделений и больницы в целом. В общей формулировке для оценки эффективности предложен основной критерий (показатель) – вероятность достижения цели. На основе вероятностной модели медико-экономической эффективности с применением современных компьютерных технологий разработаны программы MEDECAN и MEDEF, позволяющие решать различные задачи количественного расчета медико-экономической эффективности многопрофильной больницы.

Таким образом, три компонента научного исследования представляют единый комплекс оценки медико-экономической эффективности здравоохранения на различных иерархических уровнях управления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабенко А.И., Пушкарев О.В. Комплексная оценка эффективности здравоохранения: методологический подход и критерии // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2007. (6). 3–5.
2. Бабенко А.И. Стратегическое планирование и социально-гигиеническая оценка функционирования медицинских организаций. Новосибирск, 2006. 403 с.
3. Корчагин В.П. Финансовое обеспечение здравоохранения. М., 1997. 268 с.
4. Пушкарев О.В. Вероятностно-стохастическая модель медико-экономической эффективности многопрофильной больницы // Экономика здравоохранения. 2006. (6). 20–25.
5. Pushkarev O. The human capital – the integrator of social and economic problems of region // KORUS-2004. The 8th Korean-Russian International Symposium on Science and Technology. Ulsan, 2004. 267–271.

METHODOLOGICAL BASIS OF THE COMPLEX ESTIMATION OF MEDICAL-ECONOMIC EFFICIENCY OF PUBLIC HEALTH SERVICES

Anatoliy Ivanovich BABENKO¹, Oleg Vladimirovich Pushkarev^{1,2}

¹ *Institute for Integrated Problems of Hygiene and Occupational Diseases of SB RAMS
654041, Novokuznetsk, Kutuzov str., 23*

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

The article is devoted to the complex estimation of public health system effectiveness: criteria of the efficiency estimation, design procedure, mathematical model and economic analysis of health capital losses are offered. The system effectiveness is considered at three levels: state, regional and municipal. The new criterion is introduced which regulates the effect of system public health, is founded on correlation between received results (lowering loss of health capital) and expenditure (consolidated budget of public health service) for defined time lag. The computer programs MEDECAN and MEDEF are developed to solve the problems of quantitative calculation of medical-economic effectiveness of multi-field hospital.

Key words: efficiency of public health services, the human capital, mathematical modeling in public health services.

Babenko A.I. – doctor of medical sciences, professor; chief of laboratory of strategic planning in public health services, e-mail: bai@soramn.ru

Pushkarev O.V. – doctor of medical sciences, professor of faculty of economy and management in public health services, e-mail: olegpushkarev@ngs.ru