

ИНДУКЦИЯ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *IN VITRO* В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ MCF-7

Евгения Викторовна ШАХРИСТОВА¹, Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА^{1,2},
Елена Алексеевна СТЕПОВАЯ¹, Ольга Леонидовна НОСАРЕВА¹

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

² Национальный исследовательский Томский государственный университет
634050, г. Томск, просп. Ленина, 36

Цель исследования. Подбор концентрации пероксида водорода, способной индуцировать развитие окислительного стресса и запускать апоптотическую гибель клеток эпителия молочной железы без элиминации клеток по пути некроза. Материал и методы. Объектом исследования выбраны культура клеток эпителия молочной железы человека (HBL-100) и опухолевая клеточная линия MCF-7 (эпителиоподобная аденокарцинома молочной железы человека). Моделирование окислительного стресса в клетках линии HBL-100 достигалось путем добавления пероксида водорода в конечных концентрациях 0,2; 0,3; 0,5 и 1,0 мМ. Определяли продукцию активных форм кислорода, а также содержание общего, восстановленного, окисленного глутатиона и величину их отношения в эпителиальных клетках линии HBL-100 для сравнительной оценки степени выраженности окислительного стресса с опухолевыми клетками линии MCF-7. Результаты и их обсуждение. Установлена оптимальная концентрация пероксида водорода – 0,3 мМ, при которой зарегистрировано нарастание продукции активных форм кислорода в эпителиоцитах, сопоставимое с их уровнем в опухолевых клетках, а также значение величины отношения восстановленного глутатиона к окисленному, образование максимального количества аннексин-положительных и минимального числа пропидий-положительных клеток.

Ключевые слова: окислительный стресс, апоптоз, опухолевая прогрессия, аденокарцинома молочной железы.

Окислительный стресс лежит в основе патогенеза многих заболеваний, таких как сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, воспалительные, онкологические, а также процессов адаптации и старения [8]. Опухоли молочной железы в настоящее время являются наиболее часто встречающимися злокачественными новообразованиями у женщин, с ежегодно увеличивающимися показателями заболеваемости [3]. Аденокарцинома молочной железы занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости в мире, в том числе и в России [3, 13]. Опухолевая прогрессия сопровождается повышенной выработкой активных форм кислорода (АФК), изменением окислительно-восстановительного баланса клетки с последующим развитием свободнорадикального окисления и нарушением процессов ре-

ализации программированной клеточной гибели [4, 6, 8, 10–12, 15, 22, 24].

Одним из важнейших элементов редокс-системы клеток выступают АФК, выполняющие функции, в том числе, вторичных месенджеров и реализующие лиганд-рецепторные взаимодействия. В число таких лигандов входят факторы транскрипции, гормоны, медиаторы и цитокины [4, 8, 16, 18]. Из-за высокой реакционной способности АФК лишь в низких концентрациях играют роль регуляторных молекул различных клеточных функций, таких как пролиферация, хемотаксис, апоптоз, межклеточный сигналинг, мембранная рецепция [15, 24]. В то же время интенсификация процессов свободнорадикального окисления, нарушение баланса между про- и антиоксидантами приводят к увеличению стационарной

Шахристова Е.В. – к.м.н., руководитель научно-образовательного центра молекулярной медицины, e-mail: shaxristova@yandex.ru

Рязанцева Н.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики, e-mail: office@ssmu.tomsk.ru

Степовая Е.А. – д.м.н., проф. кафедры биохимии и молекулярной биологии, e-mail: muir@mail.ru

Носарева О.Л. – к.м.н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии, e-mail: olnosareva@yandex.ru

концентрации АФК, способствующих окислительному повреждению макромолекул (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот), активации протеолитических ферментов, нарушению структуры мембран и метаболизма Ca^{2+} , что способствует дизрегуляции процессов пролиферации и апоптоза клеток [2, 4, 8, 10, 11, 18, 21]. Для объяснения молекулярных механизмов реализации и регуляции апоптоза опухолевых клеток необходимо учитывать изменения в системе глутатиона, способной снижать цитотоксическое действие АФК при опухолевой трансформации, участвовать в передаче внутриклеточных сигналов, редокс-регуляции функционирования различных белков, в том числе задействованных в реализации запрограммированной клеточной гибели [5, 7, 9].

Клеточные культуры являются удобной модельной системой для исследования окислительного стресса *in vitro* при различных патологических процессах, поскольку их использование позволяет исключить многие неспецифические факторы, сопровождающие индукцию свободнорадикального окисления *in vivo* [17]. При этом пероксид водорода (H_2O_2), применяемый в моделировании окислительного стресса, способен индуцировать апоптотическую гибель клеток [1]. Представляются актуальным направление исследования изменений в системе глутатиона эпителиальных клеток молочной железы при действии различных концентраций H_2O_2 *in vitro* и необходимость поиска концентрации прооксиданта, индуцирующей в них запрограммированную клеточную гибель.

Целью настоящего исследования является экспериментальный подбор оптимальной концентрации H_2O_2 , способной эффективно индуцировать развитие окислительного стресса и запуск апоптотической гибели клеток эпителия молочной железы без их элиминации по пути некроза. Создание модели окислительного стресса в эпителиальных клетках молочной железы позволит установить механизмы регуляции апоптоза клеток, находящихся в состоянии свободнорадикального окисления, в том числе в опухолевых клетках линии MCF-7.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы опухолевая клеточная линия MCF-7 (эпителиоподобная аденокарцинома молочной железы человека) и культура клеток эпителия молочной железы человека (HBL-100), полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург).

Культивирование опухолевых клеток линии MCF-7 проводили адгезионным методом в полной питательной среде, содержащей 90 % EMEM («ПанЭко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 1 % заменимых аминокислот («ПанЭко», Россия), 10 мкг/мл бычьего инсулина («ПанЭко», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина («INS», США) при температуре 37 °С и 5 % CO_2 . Клетки линии HBL-100 культивировали адгезионным методом в полной питательной среде, содержащей 90 % RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), 0,3 мг/мл L-глутамин («ПанЭко», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина («INS», США) при температуре 37 °С и 5 % CO_2 . Обе клеточные линии поддерживали в логарифмической фазе роста и пересаживали через 3 сут. Индукция окислительного стресса в клетках эпителия молочной железы достигалась путем добавления H_2O_2 в конечных концентрациях 0,2, 0,3, 0,5 и 1,0 мМ.

Для сравнительной оценки интенсивности окислительного стресса в опухолевых клетках и при индукции H_2O_2 свободнорадикального окисления в эпителиальных клетках молочной железы проводили оценку продукции АФК, концентрации общего, восстановленного (GSH), окисленного (GSSG) глутатиона и величины отношения содержания восстановленной формы трипептида к содержанию окисленной. Для оценки интенсивности внутриклеточной продукции АФК методом проточной цитофлуориметрии на проточном лазерном цитометре «BD FaCSCanto II» (BD Biosciences, США) клетки предварительно инкубировали с 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетатом в конечной концентрации 5 мкМ («Sigma Aldrich», США) [19]. В основе метода лежит способность 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата (не флуоресцирующего) проникать в цитоплазму клеток в виде ацетилового эфира, деэстерифицироваться под действием эстераз, что исключает возможность его транспорта из клеток, и приобретать способность флуоресцировать после взаимодействия с H_2O_2 и его метаболитами.

Содержание общего глутатиона, GSH и GSSG определяли методом, предложенным М.Е. Anderson [14], в модификации I. Rahman и соавт. [23]. Его принцип основан на способности GSH взаимодействовать с 5,5-дителиобис-2-нитробензойной кислотой с образованием тионитрофенольного аниона, имеющего характерный максимум поглощения при длине волны 412 нм. При этом образуется GSSG, который восстанавливается специфически глутатионредуктазой, и восстановленная форма трипептида вновь взаи-

действует с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию общего глутатиона. Для определения GSSG пробы предварительно инкубировали с блокатором SH-групп 2-винилпиридином («Wako», Япония), который необратимо связывает в пробе GSH, и поэтому в данном случае скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию GSSG.

Определение количества аннексин- и пропи-дий йодид-положительных клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченного аннексина V и пропи-дия йодида («eBioscience», Австрия). Метод основан на способности аннексина V в присутствии ионов Ca^{2+} с высокой аффинностью связываться с фосфатидилсеринном, экспрессированным на внешней стороне цитоплазматической мембраны, что указывает на возможность клетки вступить в апоптоз или воспринимается как сигнал к фагоцитозу. Молекулы пропи-дия йодида способны проникать в поврежденные клетки и интеркалировать между основаниями дефрагментированной ДНК при некрозе клетки.

При оценке полученных данных соответствие выборок нормальному закону распределения проверяли с помощью критерия Шапиро – Вилка. В связи с отсутствием согласия данных с нор-

мальным распределением на уровне значимости $p < 0,01$ и $p < 0,05$ вычисляли средневывборочные характеристики: медиану (Me), первый и третий квартили (Q_1-Q_3). Достоверность различий независимых выборок оценивали с помощью непараметрического критерия для малых групп Краскала – Уолиса – для шести независимых групп исследования. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$ или $p < 0,01$. Межгрупповой анализ проводили с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе данных, изложенных в современной научной литературе, обращает на себя внимание факт отсутствия моделирования свободнорадикального окисления для различных типов опухолевых клеток. В частности, отсутствуют данные об изменении метаболизма опухолевых клетках эпителиоподобной аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 в присутствии различных концентраций H_2O_2 . Большой интерес представляет изучение дисрегуляции апоптоза в условиях окислительного стресса *in vitro* в опухолевых клетках линии MCF-7.

В результате проведенных нами исследований *in vitro* установлено, что H_2O_2 в конечных

Таблица

Уровень показателей в опухолевых клетках линии MCF-7 и при различных условиях культивирования эпителиальных клеток молочной железы линии HBL-100, Me (Q_1-Q_3)

Показатель	Клеточная линия MCF-7	Конечная концентрация H_2O_2 (мМ) в культуральной среде клеток линии HBL-100				
		Интактные	0,2	0,3	0,5	1,0
Количество аннексин-положительных клеток, %	16,59 (15,60–18,21)	15,88 (15,34–16,97)	21,00* (20,46–21,24)	31,71** (30,78–32,64)	27,93** (27,66–28,20)	14,47* (14,88–15,06)
Количество пропи-дий йодид-положительных клеток, %	4,62 (4,44–4,71)	4,14 (4,05–4,60)	8,91** (8,64–9,18)	9,72** (9,66–9,78)	15,36** (14,82–15,90)	26,04* (24,66–28,29)
Продукция АФК, у. е.	0,74 (0,71–0,77)	0,50* (0,48–0,53)	1,22** (1,18–1,26)	1,47** (1,46–1,56)	2,06** (2,02–2,21)	2,20** (2,18–2,26)
Общий GSH, нмоль/мг белка	3,96 (3,88–4,09)	5,11** (4,83–5,39)	4,94** (4,90–4,99)	4,43* (4,33–4,52)	3,17** (3,12–2,25)	3,10** (3,05–3,36)
GSH, нмоль/мг белка	3,57 (3,52–3,70)	5,11** (4,83–5,39)	4,40** (4,37–4,45)	3,82** (3,80–3,89)	2,59** (2,55–2,77)	2,60** (2,49–2,77)
GSSG, моль/мг белка	0,39 (0,36–0,40)	0,47** (0,47–0,50)	0,53** (0,53–0,55)	0,61** (0,55–0,61)	0,58** (0,58–0,61)	0,50* (0,44–0,59)
GSH/GSSG, у. е.	9,49 (9,22–9,50)	10,79* (10,38–11,25)	8,23 (8,17–8,24)	6,32** (6,25–6,58)	4,42** (4,36–4,43)	5,25** (4,69–5,62)

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей опухолевой линии MCF-7 (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$).

концентрациях 0,2, 0,3, 0,5 и 1,0 мМ вызывает значимое увеличение интенсивности флуоресценции эпителиальных клеток молочной железы человека, нагруженных реагирующим с АФК зондом (2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетатом) по сравнению с опухолевыми клетками линии MCF-7. Интенсивность внутриклеточной флуоресценции зонда повышалась с увеличением концентрации H_2O_2 в инкубационной среде. Максимальное содержание АФК определяли в клетках, культивируемых в присутствии 1,0 мМ H_2O_2 (см. таблицу).

Известно, что окислительный стресс развивается на фоне дисбаланса системы «прооксиданты – антиоксиданты». Учитывая важную роль системы глутатиона в антиоксидантной защите клеток, нами было исследовано влияние H_2O_2 на содержание общего глутатиона, GSH и GSSG в клетках эпителия молочной железы. Установлено, что инкубация эпителиальных клеток линии HBL-100 с H_2O_2 в концентрациях 0,2–1,0 мМ приводила к снижению содержания в них общего глутатиона и GSH, при этом интенсивность сни-

жения концентрации трипептида повышалась с увеличением концентрации прооксиданта в среде культивирования клеток (см. таблицу).

В регуляции редокс-состояния клеток существенную роль играет не содержание общего глутатиона, а соотношение его окисленной и восстановленной форм [20]. Снижение величины отношения GSH/GSSG в настоящее время рассматривается как один из маркеров окислительного стресса в клетках [8]. Нами обнаружено, что соотношение концентраций GSH и GSSG на фоне добавления H_2O_2 (0,2–1,0 мМ) снижалась, достигая минимальных значений при культивировании клеток линии HBL-100 с 1,0 мМ прооксиданта (см. таблицу). Полученные результаты свидетельствуют о том, что концентрация общего глутатиона в эпителиальных клетках молочной железы под действием H_2O_2 уменьшается в основном за счет его восстановленной формы.

Однако следует учитывать, что созданная нами экспериментальная модель разрабатывалась для изучения дисрегуляции апоптоза в условиях окислительного стресса *in vitro* в опухо-

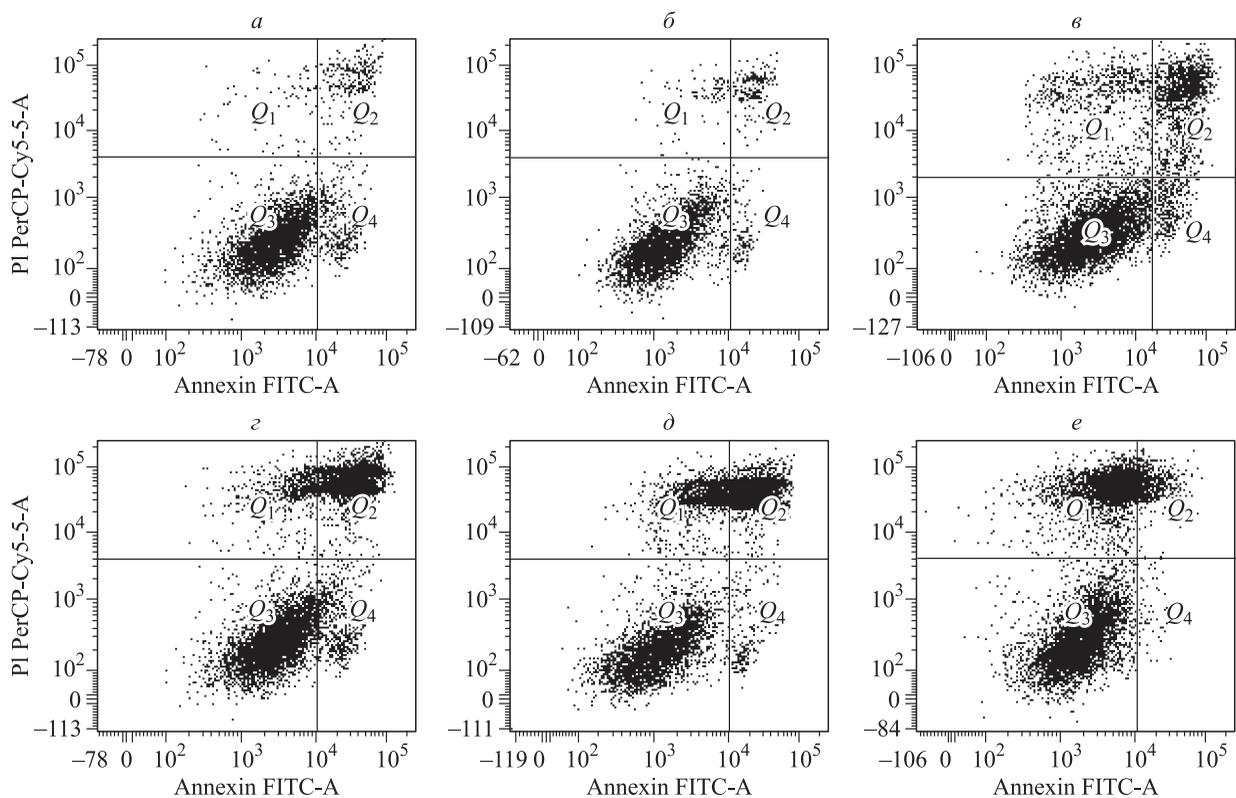


Рис. Содержание аннексин- и пропидий йодид-положительных клеток в зависимости от концентрации пероксида водорода; Annexin FITC-A – канал на проточном цитофлуориметре для аннексина V, меченого флуоресцеинизотиоцианатом; PI PerCP-Cy5-5-A – канал на проточном цитофлуориметре для пропидия йодид и перидинхлорофиллпротеин-цианина-5-5; Q₁ – аннексин V-FITC–, пропидий йодид+; Q₂ – аннексин V-FITC+, пропидий йодид+; Q₃ – аннексин V-FITC–, пропидий йодид–; Q₄ – аннексин V-FITC+, пропидий йодид–; а – опухолевые клетки линии MCF-7; б, в, г, д и е – эпителиальные клетки молочной железы линии HBL-100, культивируемые в отсутствие и в присутствии 0,2, 0,3, 0,5 и 1,0 мМ пероксида водорода соответственно

левых клетках эпителиоподобной адокариномы молочной железы человека. Таким образом, необходимо было подобрать такую концентрацию H_2O_2 для моделирования окислительного стресса и индукции апоптоза в эпителиальной клетке, которая создавала бы оптимальные условия для развития свободнорадикальных процессов, сопоставимых с соответствующими показателями в опухолевых клетках линии MCF-7.

В своих экспериментах мы показали, что для моделирования окислительного стресса и индукции апоптоза в клетках эпителия молочной железы с оптимальной конечной концентрацией H_2O_2 является 0,3 мМ, поскольку в этом случае нарастание внутриклеточной продукции АФК и снижение величины отношения GSH/GSSG под действием прооксиданта в клетках линии HBL-100 сопоставимо с соответствующими показателями в опухолевых клетках. В этой же концентрации (0,3 мМ) H_2O_2 индуцирует образование максимального количества аннексин-положительных и минимального – пропидий йодид-положительных клеток (см. таблицу, рисунок). Культивирование эпителиоцитов молочной железы с H_2O_2 в конечных концентрациях 0,5 и 1,0 мМ приводило к увеличению количества пропидий йодид-положительных и снижению числа аннексин-положительных клеток, что отражает активацию процессов гибели клетки по пути некроза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование индукции окислительного стресса *in vitro* в эпителиальных клетках молочной железы линии HBL-100 при действии H_2O_2 в конечных концентрациях 0,2, 0,3, 0,5 и 1,0 мМ позволило определить оптимальную концентрацию прооксиданта в культуральной среде – 0,3 мМ, способствующую развитию апоптотической гибели клеток без элиминации по пути некроза и свободнорадикальных процессов, сопоставимых с таковыми в опухолевых клетках линии MCF-7.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (договор № 4184.2014.7-НШ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипов С.А., Шкурупий В.А., Зайковская М.В. и др. Разнонаправленные эффекты H_2O_2 на макрофаги и фибробласты в условиях моделирования

окислительного стресса // *Соврем. наукоемкие технологии*. 2010. (8). 76–77.

2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // *Соросовский образоват. журн.* 2000. 6. (12). 13–19.

3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2008 г. // *Вестн. РОНЦ*. 2010. 2. (21). 52–86.

4. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб., 2006. 400 с.

5. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р. и др. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов // *Вестн. РАМН*. 2010. (3). 46–54.

6. Кондакова И.В., Какурина Г.В., Смирнова Л.П., Борунов Е.В. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами // *Сиб. онкол. журн.* 2005. (1). 58–61.

7. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // *Биомед. химия*. 2009. 55. (3). 255–277.

8. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск, 2008. 284 с.

9. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // *Биохимия*. 2007. 72. (2). 158–174.

10. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б. и др. Роль активных форм кислорода и белков семейства Bcl-2 в реализации ФНО- α -опосредованного апоптоза лимфоцитов // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2010. 148. (2). 139–142.

11. Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Васильева О.А. и др. Участие редокс-сигнализации в опосредованной оксидом азота, монооксидом углерода и сульфидом водорода регуляции апоптоза и клеточного цикла // *Бюл. сиб. медицины*. 2013. 12. (1). 49–54.

12. Степовая Е.А., Петина Г.В., Жаворонок Т.В. и др. Роль тиолдисульфидной системы в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофилов при окислительном стрессе // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2010. (8). 161–165.

13. Чиссова В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2011 г. (заболеваемость и смертность). М., 2013. 289 с.

14. Anderson M.E. Determination of glutathione and glutathione sulfide in biological samples // *Methods Enzymol.* 1985. (113). 548–555.

15. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors // *Antioxid Redox Signal*. 2011. 15. (8). 2335–2381.

16. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol. Rev.* 2002. 82. (1). 476–485.
17. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress // *Biochem. Soc. Trans.* 2007. (5). 1147–1150.
18. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view // *Nutr. Rev.* 2012. 70. (5). 257–265.
19. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? // *Br. J. Pharmacol.* 2004. 142. 231–255.
20. Khamaisi M., Kavel O., Rosenstock M. et al. Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine // *Biochem. J.* 2000. 349. (2). 579–586.
21. Murphy M.P., Holmgren A., Larsson N.G. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species // *Cell Metab.* 2011. 13. (4). 361–366.
22. Oberley T.D. Oxidative damage and cancer // *Am. J. Pathol.* 2002. 160. (2). 403–408.
23. Rahman I., Kode A., Biswas S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method // *Nat. Protoc.* 2006. 1. (6). 3159–3165.
24. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // *Cell Signal.* 2012. 24. (5). 981–990.

INDUCTION OF OXIDATIVE STRESS BY HYDROGEN PEROXIDE *IN VITRO* IN BREAST EPITHELIAL CELLS FOR STUDYING MCF-7 TUMOR CELL LINE APOPTOSIS

Evgenija Viktorovna SHAKHRISTOVA¹, Natal'ja Vladimirovna RYAZANTSEVA^{1,2},
Elena Alekseevna STEPOVAYA¹, Ol'ga Leonidovna NOSAREVA¹

¹ Siberian State Medical University
634050, Tomsk, Moscovski Trakt, 2

² National Research Tomsk State University
634050, Tomsk, Lenin av., 36

The research objective. Selection of the hydrogen peroxide concentration that is able to induce oxidative stress and trigger breast epithelial cell apoptosis without eliminating cells via cell death. Material and methods. The cell culture of human breast epithelium (HBL-100) and MCF-7 tumor cell line (epithelial-like eadenocarcinoma of human breast) have been chosen as the objects of the research. Modeling of oxidative stress in HBL-100 cell line has been achieved by adding hydrogen peroxide in the final concentrations of 0.2; 0.3; 0.5 and 1.0 mMole. The level of reactive oxygen species, the concentration of total, reduced and oxidized glutathione as well as their ratio in HBL-100 epithelial cell line have been evaluated in order to carry out comparative analysis of the degree of oxidative stress with MCF-7 tumor cells line. Results and discussion. The optimal concentration of hydrogen peroxide has been established – 0.3 mMole, at which the increase in the concentration of reactive oxygen species in the cell is registered that may be compared to the one in tumor cells and also may be compared to the value of the reduced glutathione-oxidized glutathione ratio; more over, formation of the maximum amount of annexin V-positive cells and the minimum amount of propidium iodide-positive cells takes place.

Key words: oxidative stress, apoptosis, tumor progression, breast adenocarcinoma.

Shakhristova E.V. – candidate of medical sciences, head of the laboratory of molecular medicine
Ryazantseva N.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for molecular medicine
and clinical laboratory diagnostics, e-mail: office@ssmu.tomsk.ru

Stepovaya E.A. – doctor of medical sciences, professor of the chair for biochemistry and molecular biology,
e-mail: muir@mail.ru

Nosareva O.L. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for biochemistry
and molecular biology, e-mail: olnosareva@yandex.ru

ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ МЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ОКИСЛЕННОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Александра Романовна ТАРКОВА¹, Александр Михайлович ЧЕРНЯВСКИЙ¹,
Сергей Владимирович МОРОЗОВ², Игорь Алексеевич ГРИГОРЬЕВ^{1,2},
Наталья Ивановна ТКАЧЕВА², Владимир Иванович РОДИОНОВ²

¹ ФГБУ Новосибирский НИИ патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина
Минздрава России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

² ФГБУ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

В исследовании проведено определение гемостатической активности импортозамещающего гемостатического материала местного действия, полученного в результате окисления нерегенерированной целлюлозы, на моделях лабораторных животных (беспородные крысы). Установлено, что исследуемый образец окисленной целлюлозы обладает гемостатической активностью, которая по своим показателям сопоставима с таковой для известного материала «Surgicel»: его использование после нанесения резаной раны на левую долю печени крыс приводило к снижению интенсивности кровопотери на 60 % от выраженности спонтанно останавливающегося кровотечения, а время остановки кровотечения составляло 300 ± 24 с (в случае применения «Surgicel») – соответственно 64 % и 273 ± 36 с).

Ключевые слова: окисленная целлюлоза, гемостаз, хирургическое вмешательство, кровотечение.

Кровотечение, возникающее в интра- и послеоперационном периодах, является одной из важнейших проблем современной медицины [12]. По данным мировой литературы, послеоперационное кровотечение увеличивает сроки госпитализации в среднем на 3,3 дня, а стоимость лечения – на 19,9 % [18]. Вынужденная гемотрансфузия сопровождается повышенным риском вирусной и бактериальной инфекции. Так, например, во Франции гемотрансмиссивная бактериальная инфекция встречается в 2,4 случаев на 1 млн единиц перелитой эритроцитарной массы, в 24,7 случаев на 1 млн единиц перелитого тромбоконцентрата и в 0,4 случаев на 1 млн единиц перелитой свежезамороженной плазмы, а тяжелые формы данной инфекции – с частотой 13,4 случаев и 5,1 летальных исходов на 1 млн

единиц перелитого тромбоконцентрата [10]. Все вышеперечисленное значительно ухудшает течение послеоперационного периода и увеличивает сроки госпитализации.

Существует большое разнообразие традиционных методов остановки кровотечения (механические, химические, термические и др.), но особое внимание уделяется местным гемостатическим средствам, которые обладают эффективным локальным действием и могут быть использованы в случаях диффузной кровоточивости (раневая поверхность паренхиматозного органа, губчатая ткань и др.). При сравнительной оценке и выборе гемостатических препаратов рассматривают их безопасность, эффективность, удобство в использовании, стоимость, доступность и другие факторы [14]. Несмотря на наличие большого

Таркова А.Р. – аспирант Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий,
e-mail: artarkova@mail.ru

Чернявский А.М. – д.м.н., проф., руководитель Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, e-mail: amchern@mail.ru

Морозов С.В. – к.х.н., зав. лабораторией экологических исследований и хроматографического анализа,
e-mail: morozov@nioch.nsc.ru

Григорьев И.А. – д.х.н., проф., зав. лабораторией азотистых соединений, e-mail: grig@nioch.nsc.ru

Ткачева Н.И. – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории экологических исследований и хроматографического анализа, e-mail: yaroshen@nioch.nsc.ru

Родионов В.И. – к.х.н., руководитель подразделения, e-mail: virod@nioch.nsc.ru

числа препаратов, нет универсальных гемостатических средств. Поэтому разработка средств и методов борьбы с кровотечениями остается одной из главных задач хирургии.

На сегодняшний день одним из приоритетных направлений исследований и разработок в медицине является создание новых биосовместимых и биodeградируемых изделий для хирургии. В этой связи большой интерес вызывают гемостатические препараты на основе окисленной целлюлозы (ОЦ), которая, благодаря своей структуре и растительному происхождению, обладает такими важными свойствами, как биосовместимость, биodeградируемость, нетоксичность, химическая инертность, волокнистость, механическая прочность, нерастворимость в воде. Наиболее известным и широко используемым в медицине гемостатическим материалом на основе окисленной целлюлозы является препарат «Surgicel» (Ethicon, Johnson & Johnson, США).

Гемостатический препарат «Surgicel» находит применение в различных областях хирургии, в частности, в кардиохирургии. Так, его интраоперационное использование после стернотомии и при диффузной кровоточивости мягких тканей позволяет снизить объем дренажных потерь в послеоперационном периоде в 1,5–2 раза [1, 16, 17].

Использование материалов на основе ОЦ в гепатобилиарной хирургии описано в проспективном рандомизированном многоцентровом слепом исследовании, где сравнение эффективности гемостатиков «Veriset» (окисленная целлюлоза) и «TachoSil» (коллагеновые пластины с фибриногеном и тромбином) показало, что время достижения гемостаза при их использовании составило соответственно 1 и 3 мин. Авторами сделан вывод о том, что использование «Veriset» позволяет снизить объем гемотрансфузий, снизить риски инфицирования и возникновения послеоперационных осложнений, а также длительность пребывания пациентов в стационаре [11]. Примеры эффективного применения гемостатических материалов на основе окисленной целлюлозы в различных областях хирургии представлены в обзоре [4].

Учитывая отсутствие российских аналогов гемостатических средств на основе ОЦ, а также ее большой инновационный потенциал, заключающийся в ее способности к дальнейшей функционализации с выходом на препараты комплексного действия, создание отечественного гемостатического материала местного действия на основе ОЦ является актуальной и перспективной задачей.

Цель работы – экспериментальное исследование отечественного гемостатического средства на основе ОЦ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты по исследованию гемостатических свойств препарата «Surgicel» и исследуемой гемостатической марли (образец ОЦ) проводились на 14 беспородных белых крысах массой 300–450 г. Уход за экспериментальными животными и их содержание в условиях вивария были стандартными и соответствовали требованиям приказов «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев» № 1045-73 от 06.04.1973, а также № 1179 от 10.10.1983 МЗ СССР, № 267 от 19.06.2003 МЗ РФ, «Правилам по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденным МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977), принципам Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

Исследуемая гемостатическая марля (образец ОЦ) была получена в результате окисления целлюлозы (салфетка медицинской марли размером 70 × 70 мм) действием оксида азота (IV) в газовой фазе [13]. Содержание карбоксильных групп в полученных образцах монокарбоксилцеллюлозы определено кальций-ацетатным методом [3] и составило 18–19 %. Содержание связанного азота в монокарбоксилцеллюлозе не превышало 0,5 мас.%. Биологические испытания образца ОЦ были проведены после его стерилизации с использованием гамма-излучения.

Эксперименты по исследованию образца ОЦ и «Surgicel» выполняли согласно методике, описанной в патенте «Способ выявления и сравнительной оценки гемостатической активности кровоостанавливающих матричных препаратов местного действия» [2]. Сравнение гемостатической активности проводили путем нанесения резаной раны (длина 10 мм, глубина 3 мм) на левую долю печени крысы и аппликации к раневой поверхности образца ОЦ или «Surgicel» в зависимости от принадлежности животного к соответствующей группе. Критериями проявления гемостатических свойств у исследуемых препаратов считали снижение интенсивности кровопотери (мг) и уменьшение времени остановки кровотечения (с) в сравнении с показателями спонтанно останавливающего кровотечения (контроль). Время остановки кровотечения определяли по прекращению истечения крови после очередного снятия образца местного гемостатика с поверхности раны, величину кровопотери – взвешиванием матрицы до и после пропитывания ее кровью, при этом учитывали индивидуальные

характеристики спонтанно останавливающегося кровотечения без гемостатика, выраженность которого описывалась математически формулой экспоненциальной зависимости его интенсивности от времени, и интенсивность кровотечения, останавливаемого препаратом. Для вывода о превосходстве гемостатической активности одного гемостатика над другим проводили экстраполяцию показателей интенсивности кровотечения.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате серии проведенных экспериментов при оценке впитывающей способности гемостатических материалов путем аппликации к раневой поверхности печени установлено, что оба исследуемых материала в равной степени обладают хорошей адгезивной способностью и высокой гигроскопичностью (см. рисунок).

При оценке интенсивности кровотечения вышеописанным методом отмечено, что оба гемостатических материала значительно уменьшают объем кровопотери в сравнении с объемом спонтанно останавливающегося кровотечения. Так, интенсивность кровотечения при использовании образца ОЦ составила $0,09 \pm 0,01$ мг, а при использовании «Surgicel» – $0,04 \pm 0,01$ мг (соответственно на 60 и 64 % меньше интенсивности

спонтанно останавливающегося кровотечения). Отмечено также, что время остановки кровотечения при использовании в качестве гемостатического материала образца ОЦ сопоставимо с данными для препарата «Surgicel» (300 ± 24 и 273 ± 36 с соответственно).

Исследование механизма действия гемостатических материалов на основе ОЦ рассмотрено в работах [7, 9]. Благодаря высокой впитывающей способности ОЦ поглощает большую часть жидкой составляющей крови, повышая тем самым ее вязкость. Затем за счет отрицательного электрического заряда карбоксильных групп, входящих в состав молекулы ОЦ, происходит адгезия и активация тромбоцитов, кроме того, вследствие низкого значения pH ОЦ вызывает вазоконстрикцию в зоне ее применения. Отмечено также, что карбоксильные группы ОЦ образуют комплексы с ионами железа гемоглобина крови, что приводит к неспецифической агрегации тромбоцитов и формированию искусственного сгустка [5].

В мировой литературе приведено большое количество исследований, направленных на выявление, подтверждение и сравнение различных гемостатических материалов, созданных на основе окисленной целлюлозы, коллагена, желатина, тромбина и т.д. в эксперименте. Так, М. Chalurova и соавт. исследовали гемостатическую активность «Gelitalcel» (гемостатический материал на основе ОЦ) в сравнении с «Gelaspon» (гемостатический материал на основе желатина) в эксперименте на крысах линии Wistar. При выполнении резекции каудального полюса левой

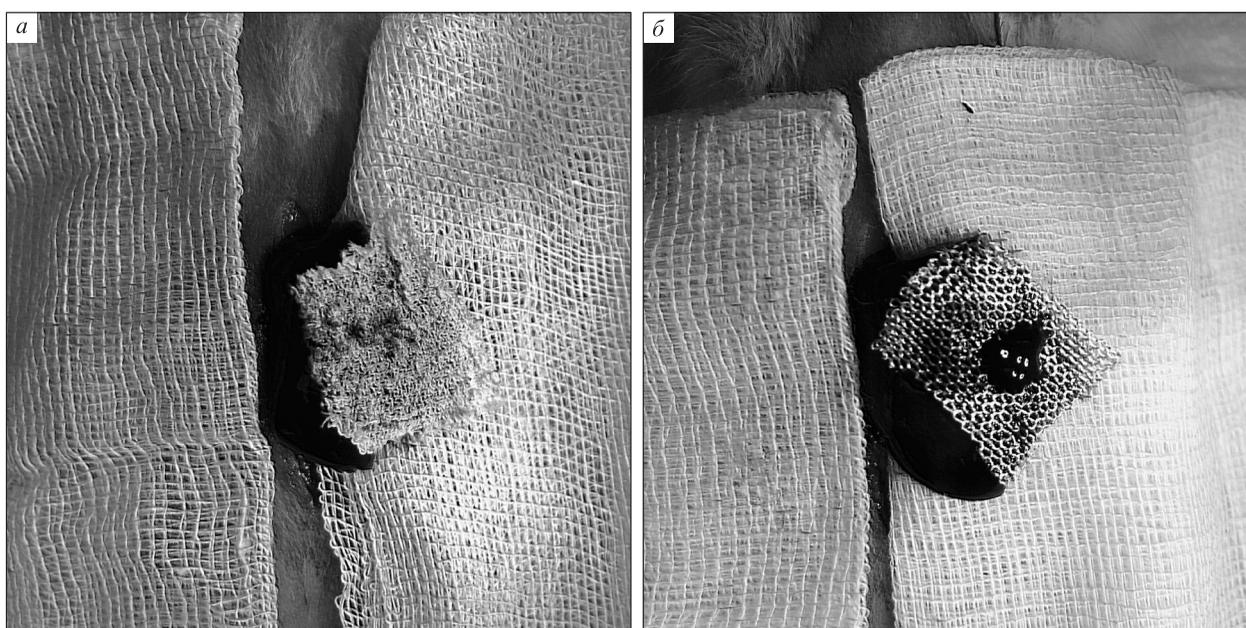


Рис. Аппликация «Surgicel» (б) и образца ОЦ (а) к резаной ране левой доли печени лабораторного животного

почки и аппликации исследуемых гемостатиков к раневой поверхности время остановки кровотечения при использовании «Gelitacel» составило $1,40 \pm 0,18$ мин, при использовании «Gelaspon» – $2,33 \pm 0,27$ мин ($p < 0,01$), что говорит о выраженной гемостатической активности материалов на основе ОЦ [6]. В свою очередь, по данным I. Takacs и соавт., при сравнении материалов на основе ОЦ («Surgicel») с материалами на основе бычьего коллагена («Sangustop») и лошадиного коллагена, покрытого фибрином и тромбином («TachoSil»), путем выполнения стандартной 5-сантиметровой резекции печени в эксперименте на свиньях установили, что время кровотечения при использовании «Sangustop» составило 140 ± 88 с, «TachoSil» – 243 ± 140 с ($p = 0,005$), «Surgicel» – 352 ± 70 с ($p < 0,001$), что говорит о выраженных гемостатических свойствах препаратов на основе коллагена в сравнении с препаратами на основе ОЦ [15].

В качестве хирургической модели для оценки гемостатических свойств «Surgicel» в мировой экспериментальной практике помимо кровотечения из моделированной раны паренхиматозного органа лабораторных животных используется модель кровотечения из артериального анастомоза. Так, S. Vijan и соавт. сравнили гемостатическую активность рассасывающейся желатиновой губки «Gelfoam», микрофибриллярного коллагена крупного рогатого скота «Avitene», окисленной регенерированной целлюлозы «Surgicel» и гемостатического агента «FloSeal», в состав которого входит желатиновая матрица и тромбин крупного рогатого скота, на кроликах, путем пересечения аорты в брюшном отделе и выполнении анастомоза конец-в-конец. На линию швов анастомоза наносили исследуемый гемостатический агент, поверх него – хирургическую марлю и запускали кровоток. Интенсивность кровотечения определялась путем взвешивания хирургической марли. В результате эксперимента выявлено, что по гемостатическим свойствам «Surgicel» (интенсивность кровотечения $66,7 \pm 16,7$ мл) сопоставима с «Gelfoam» ($66,4 \pm 17,6$ мл), превосходит «Avitene» ($80,6 \pm 34,0$ мл) и уступает «FloSeal» ($44,2 \pm 8,5$ мл) [8].

Таким образом, несмотря на большое количество исследований, направленных на изучение гемостатической активности кровоостанавливающих материалов местного действия, единого мнения относительно эффективности того или иного препарата не существует, что позволяет нам сделать вывод об актуальности проблемы разработки гемостатических препаратов местного действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеизложенного можно заключить, что полученный нами образец ОЦ обладает выраженной гемостатической активностью, значительно уменьшая объем кровопотери при моделировании раны паренхиматозного органа; гемостатическая активность исследуемого образца ОЦ по своим показателям сопоставима с таковой для материала «Surgicel». Данный образец ОЦ может быть использован для дальнейших исследований, в частности для оценки резорбционных свойств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белов Ю.В., Базылев В.В., Алексеев И.А. Использование окисленной регенерированной целлюлозы (Surgicel Nu-Knit) в дополнение к основным методам хирургического гемостаза при кардиохирургических операциях // Хирургия. 2009. (5). 10–14.
2. Пат. 2127428 РФ. Способ выявления и сравнительной оценки гемостатической активности кровоостанавливающих матричных препаратов местного действия / Ю.П. Кашперский, Е.Н. Тимин, А.А. Адамян и др.; опубл. 10.03.1999.
3. Фармакопея США: USP 29; Национальный формуляр: NF 24. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 2. 1973.
4. Чернявский А.М., Григорьев И.А., Морозов С.В. и др. Контроль локального гемостаза с помощью препаратов окисленной целлюлозы // Хирургия. 2014. (8). 71–75.
5. Bajerova M., Krejcová K., Rabiskova M. et al. Oxycellulose: Significant characteristics in relation to its pharmaceutical and medical applications // Adv. Polym. Tech. 2009. 28. (3). 199–208.
6. Chalupová M. Local tissue reaction after the application of topical hemostatic agents in a rat partial nephrectomy model // J. Biomed. Mater. Res. Pt. A. 2012. 100. (6). 1582–1590.
7. Cheng W., He J., Wu Y. et al. Preparation and characterization of oxidized regenerated cellulose film for hemostasis and the effect of blood on its surface // Cellulose. 2013. 20. (5). 2547–2558.
8. Kheirabadi B.S. Comparative study of the efficacy of the common topical hemostatic agents with fibrin sealant in a rabbit aortic anastomosis model // J. Surg. Res. 2002. 106. (1). 99–107.
9. Křížová P., Másová L., Suttner J. et al. The influence of intrinsic coagulation pathway on blood platelets activation by oxidized cellulose // J. Biomed. Mater. Res. A. 2007. 82. (2). 274–280.
10. Lafeuillade B., Eb F., Ounnoughene N. et al. Residual risk and retrospective analysis of transfusion-transmitted bacterial infection reported by the French National Hemovigilance Network from 2000 to 2008 //

Transfusion. 2014. doi: 10.1111/trf.12883. [Epub ahead of print].

11. Öllinger R., Mihaljevic A.L., Schuhmacher C. et al. A multicentre, randomized clinical trial comparing the Veriset™ haemostatic patch with fibrin sealant for the management of bleeding during hepatic surgery // HPB. 2013. 15. (7). 548–558.

12. Orlov D., Selby R., Yip P. и др. Дисфункция тромбоцитов, оцениваемая во время проведения операции, как независимый предиктор высокой кровопотери в кардиохирургии // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2014. (3). 97.

13. Patent 2232990 US. Preparation of oxycellulose / E.C. Yackel, W.O. Kenyon; published 25.02.1941.

14. Spotnitz W.D., Burks S. Hemostats, Sealants, and adhesives: components of the surgical toolbox // Transfusion. 2008. 48. (7). 1502–1516.

15. Takács I. Efficacy of different hemostatic devices for severe liver bleeding: a randomized controlled animal study // Surg. Innovation. 2010. 17. (4). 346–352.

16. Tavlasoglu M., Durukan A.B., Kurkluoglu M. et al. Comparison of sternal intramedullary bleeding prevention strategies in cardiac surgery // Turk. J. Med. Sci. 2013. 43. 695–699.

17. Wang C., Gu T.X., Yu L. et al. Role of oxidized regenerated cellulose in the hemostasis of severe sternal osteoporosis during cardiopulmonary bypass // J. lin. Rehabil. Tissue Eng. Res. 2011. 15. (25). 4739–4742.

18. Ye X., Lafuma A., Torretton E., Arnaud A. Incidence and costs of bleeding-related complications in French hospitals following surgery for various diagnoses // BMC Health Serv. Res. 2013. 13. (1). 186.

LOCAL HEMOSTATIC AGENT BASED ON OXIDIZED CELLULOSE

Aleksandra Romanovna TARKOVA¹, Alexandr Mikhaylovich CHERNYAVSKIY¹,
Sergey Vladimirovich MOROZOV², Igor' Alekseevich GRIGOR'EV^{1,2},
Natal'ya Ivanovna TKACHEVA², Vladimir Ivanovich RODIONOV²

¹ Novosibirsk Institute of Circulation Pathology n.a. acad. E.N. Meshalkin of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15

² Novosibirsk Institute of Organic Chemistry n.a. N.N. Vorozhtsov of SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentiev av., 9

The definition of haemostatic activity of import-substituting haemostatic material for local acting obtained from the oxidation of non-regenerated cellulose has been carried out on models of laboratory animals (outbred rats). It was found that the investigated sample of oxidized cellulose has hemostatic activity which parameters are comparable with the known material «Surgicel» activity parameters: using the investigated sample through application to incised wound to the left lobe of the liver in rats resulted in decrease in the intensity of blood loss by 60 % on the severity of spontaneous bleeding stops, and the stop time of bleeding was 300 ± 24 s (in the case of «Surgicel» – respectively 64% and 273 ± 36 s).

Key words: oxidized cellulose, hemostasis, surgical intervention, bleeding.

Tarkova A.R. – postgraduate student of the unit for aorta, coronary and peripheral artery surgery,
e-mail: artarkova@mail.ru

Chernyavskiy A.M. – doctor of medical sciences, professor, head of the unit for aorta, coronary
and peripheral artery surgery, e-mail: amchern@mail.ru

Morozov S.V. – candidate of chemical sciences, head of the laboratory of ecological research
and chromatography, e-mail: morozov@nioch.nsc.ru

Grigor'ev I.A. – doctor of chemical sciences, professor, head of the laboratory of nitrogen compounds,
e-mail: grig@nioch.nsc.ru

Tkacheva N.I. – candidate of chemical sciences, senior researcher of the laboratory of ecological research
and chromatography, e-mail: yaroshen@nioch.nsc.ru

Rodionov V.I. – candidate of chemical sciences, head of unit, e-mail: virod@nioch.nsc.ru

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НОВЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК

Анна Евгеньевна ЛЕМЗА¹, Виктор Олегович ТКАЧЕВ^{1,2},
Николай Константинович ЗЕНКОВ¹, Сергей Викторович ХОЛЬШИН³,
Наталья Валерьевна КАНДАЛИНЦЕВА³, Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА¹

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт экспериментальной
и клинической медицины (НИИЭКМ)
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² University of Michigan School of Medicine
MI 48109-5624, Ann Arbor, 1301 Catherine, USA

³ ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный педагогический университет
630126, г. Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

С целью исследования цитотоксичности структурно сходных синтетических водорастворимых серо- и селенсодержащих монофенольных антиоксидантов изучено их влияние на жизнеспособность моноцито/макрофагоподобных клеток U937 в нормальных условиях и при развитии окислительного стресса. Установлено, что все протестированные соединения малотоксичны ($IC_{50} \geq 0,3$ мМ), за исключением селенсодержащего аналога ($IC_{50} = 80$ мкМ). При этом несимметрично экранированный орто-трет-бутилом фенол с атомом бивалентной серы в пара-пропильном заместителе ТС-13 в малых дозах увеличивает количество жизнеспособных клеток *in vitro* как в нормальных условиях, так и при инкубации с цитотоксическими концентрациями H_2O_2 , вероятно, за счет ингибирования апоптоза.

Ключевые слова: синтетические антиоксиданты, жизнеспособность, ТС-13.

Среди ингибиторов кислородных радикалов в биологических системах важную роль играют фенольные и полифенольные антиоксиданты (соединения вида $Ar(OH)_n$, в которых одна или несколько гидроксильных групп соединены с ароматическим ядром (Ar)) [4]. Фенольные антиоксиданты эффективно взаимодействуют с гидроперекисными радикалами жирных кислот и ненасыщенных липидов, восстанавливая их до менее реакционноспособных гидропероксидов; эффект ингибирования свободнорадикальных окислительных процессов обусловлен относительной стабильностью ArO^{\cdot} , который практически не участвует в реакциях продолжения цепей окисления [4]. Несмотря на то что фенольные антиоксиданты широко представлены в природе, по всему миру ведутся работы по созданию новых соединений, обладающих свойствами, необходи-

мыми для решения поставленных исследователями задач. Одним из перспективных направлений такого поиска являются работы в области конструирования гидрофильных фенольных антиоксидантов, поскольку данное свойство существенно повышает биодоступность соединений. Примерами таких соединений могут служить тролокс и TDMG, водорастворимые аналоги α - и γ -токоферола соответственно [4, 9].

С другой стороны, усилия исследователей направлены на получение полифункциональных, или «гибридных», антиоксидантов комбинированного действия, сочетающих антирадикальную и антипероксидную активность, антиоксидантную и биологическую эффективность (противовоспалительную, антиканцерогенную, нейропротекторную и т. д.) [1, 4, 7].

Лемза А.Е. – к.б.н., научный сотрудник, e-mail: lemza.ae@yandex.ru

Ткачев В.О. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: victor.o.tkachev@gmail.com

Зенков Н.К. – д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: lemen@centercem.ru

Хольшин С.В. – ст. преп., e-mail: aquaphenol@mail.ru

Кандалинцева Н.В. – к.х.н., проф., e-mail: aquaphenol@mail.ru

Меньщикова Е.Б. – д.м.н., зав. лабораторией, e-mail: lemen@centercem.ru

В НИИ химии антиоксидантов Новосибирского государственного педагогического университета ведется интенсивный поиск и скрининг новых синтетических антиоксидантов, обладающих выраженным антирадикальным действием в системах *in vitro* и *in vivo*, низкой токсичностью, высокой биодоступностью и эффективностью *in vivo* в отношении патологических процессов и состояний, в основе этиопатогенеза которых лежит развитие окислительного стресса [5]. В ходе этой работы создан ряд структурно сходных водорастворимых монофенолов, отличающихся наличием трет-бутильных орто-заместителей и атома двухвалентной серы в пара-пропильном заместителе, всесторонне исследована зависимость антирадикальной, антиоксидантной и биологической активности соединений от структуры [2, 5]. Установлено, что в большинстве модельных систем *in vitro* и *in vivo* наиболее выраженной эффективностью обладает частично экранированный тиосульфат ТС-13 (3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия), и что активность соединения существенно зависит от длины остатка углеводородной цепи и присутствия атома бивалентной серы в пара-алкильном заместителе [3].

Целью настоящего исследования являлась количественная характеристика влияния фенольного антиоксиданта ТС-13 и его ближайших аналогов на жизнеспособность моноцито/макрофагоподобных клеток в культуре в нормальных условиях и при развитии окислительного стресса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2-(3'-Трет-бутил-4'-гидроксифенил)этилтиосульфат натрия (ТС-12), 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), 4-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-бутилтиосульфат натрия (ТС-14), 3-(3',5'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-17), 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилселеносульфат натрия (СС-13), 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (С-13), β -(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропионат калия (фенозан-калий, препарат сравнения схожей структуры) синтезированы в НИИ химии антиоксидантов Новосибирского государственного педагогического университета, как описано ранее [2].

Моноцито/макрофагоподобные клетки гистиоцитарной лимфомы человека U937, полученные из Банка клеточных культур ФГБУН Институт цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), культивировали в среде, содержащей 90 % RPMI-1640 (БиолоТ, Санкт-Петербург), 10 % фетальной бы-

чьей сыворотки (Hyclone, США), 1 % пенициллина, 1 % стрептомицина, 1 % глутамина (Invirogen, США).

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток определяли по их способности восстанавливать бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ, Sigma-Aldrich, США) до гранул формазана (МТТ-тест) [8]. Для этого клетки U937 инкубировали (24 ч, +37 °С) с исследуемыми соединениями, затем добавляли раствор МТТ (конечная концентрация 0,5 мг/мл), через 4 ч центрифугировали (6 мин, 2000 об/мин), лизировали 100 мкл диметилсульфоксида (БиолоТ) и измеряли оптическую плотность на длине волны 540 нм (поглощение раствора формазана в диметилсульфоксиде), используя референс-фильтр 630 нм. Результаты выражали в долях от единицы, за единицу принимали значение медианы оптической плотности контрольных клеток.

Для исследования влияния ТС-13 на жизнеспособность, апоптоз и некроз в условиях окислительного стресса к интактным клеткам линии U937, а также к клеткам, предварительно (за 24 ч) обработанным различными концентрациями соединения, однократно добавляли пероксид водорода в конечной концентрации 0,5 мМ. Через 24 ч после добавления H₂O₂ оценивали общее количество жизнеспособных клеток в МТТ-тесте, через 4 ч – количество клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза и некротически измененных. Индукцию апоптоза и некроза определяли по величине трансмембранного митохондриального потенциала $\Delta\Psi_m$ (с помощью 3,3'-дигексилосакарбодиамина йодида, DiOC₆, Sigma-Aldrich) и целостности клеточной мембраны (по проницаемости для йодида пропидия, PI, Sigma-Aldrich)) соответственно [6]. Для этого к клеткам добавляли 40 нМ DiOC₆, инкубировали в течение 15 мин при +37 °С, затем отмывали от избытка красителя и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в присутствии 10 мкг/мл PI. После однократной отмывки флуоресценцию клеток ($\lambda_{Em} = 520$ нм для DiOC₆ и $\lambda_{Em} = 670$ нм для PI) измеряли с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton-Dickinson, США). Клетки с высоким значением интенсивности флуоресценции DiOC₆ и неповрежденной клеточной мембраной принимали за жизнеспособные, клетки со сниженным $\Delta\Psi_m$ и непроницаемые для PI – за находящиеся на ранних стадиях апоптоза, клетки с нарушенной целостностью мембраны – за некротически измененные.

При моделировании острого локального воспаления крысам линии Wistar интраплаттарно вводили в правую заднюю лапу 0,1 мл 10%-го рас-

твор каррагинана в физиологическом растворе. Показателем развития воспалительного процесса служил отек лапы, определяемый плетизмометрически через 5 ч после инъекции каррагинана и выражаемый как $((V_p - V_l)/V_l) \times 100\%$, где V_p – объем правой лапы, V_l – объем левой лапы. Тестируемые соединения и препарат сравнения фенозан-калий, растворенные в 1 мл дистиллированной воды, вводили *per os* с помощью внутрижелудочного зонда за 1 ч до индукции воспаления каррагинаном в дозе 100 мг/кг веса тела животного, а крысам контрольной группы – по 1 мл дистиллированной воды.

Концентрации 50%-го подавления жизнеспособности клеток (IC_{50}) вычисляли интерполяцией из зависимостей «доза – ответ», полученных в результате тестирования концентраций антиоксидантов, варьирующихся в диапазоне 0–500 мкМ, результаты представлены в виде уравнений аппроксимации диаграмм рассеяния, а также медиан и разбросов в случае соединения ТС-13. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия между сравниваемыми величинами показателей различных экспериментальных групп считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве тестируемых объектов выбраны клетки U937, поскольку моноциты и макрофаги служат основными эффекторами и модуляторами воспаления, что важно при исследовании противовоспалительной активности соединений выбранного ряда [2, 3].

Наиболее нейтральным в отношении жизнеспособности клеток был фенозан-калий, статистически значимый эффект он оказывал лишь в концентрации 500 мкМ, но даже тогда доля погибших клеток была не более 85 % (см. таблицу). Выраженную токсичность проявляли ТС-17 (тиосульфат с полностью экранированной функциональной ОН-группой) и С-13 (частично экранированный сульфат): жизнеспособность клеток при обработке этими соединениями линейно снижалась, начиная с концентрации в 100 мкМ и достигая значения 15 % под действием 500 мкМ растворов соединений (см. таблицу).

Тиосульфат с несимметрично экранированной фенольной гидроксильной группой ТС-13 не только обладал невысокой цитотоксичностью (при обработке клеток его 500 мкМ раствором доля жизнеспособных клеток составляла 65 %), но и в невысоких концентрациях достоверно уве-

личивал количество жизнеспособных клеток, при воздействии 100 мкМ раствора повышая ее на 40 % (рис. 1).

Укорочение пара-пропильного заместителя ТС-13 на одно метиленовое звено (ТС-12) отменяло стимулирующее действие низких концентраций антиоксиданта, в то же время данное соединение было менее цитотоксичным, чем остальные аналоги (ТС-17, С-13, СС-13), жизнеспособность клеток была не ниже 45 % при воздействии максимальной из протестированных дозировок 500 мкМ. Напротив, замена атома «активной» серы на селен в пара-пропильном заместителе ТС-13 приводила к существенному увеличению токсичности итогового соединения: СС-13, единственный из исследованных препаратов, достоверно снижал жизнеспособность клеток в концентрации 100 мкМ (более чем на 50 %), максимального ингибирующего эффекта соединение достигало в концентрации 200 мкМ (более чем на 80 %) с последующим выходом на плато. Интересно, что в модели острого локального воспаления *in vivo* обе модификации структуры ТС-13 приводили к полной потере противовоспалительной активности соединения (рис. 2).

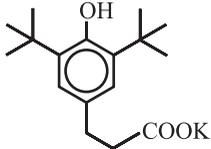
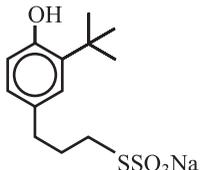
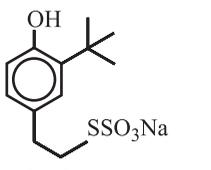
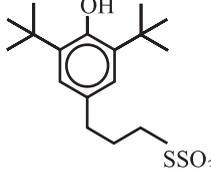
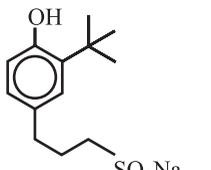
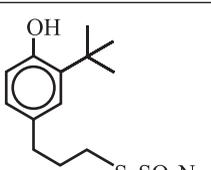
Предпосылкой для исследования замены «активной» бивалентной серы на селен послужило теоретическое предположение, основанное на существовании семейства глутатионпероксидаз. В активный центр большинства изоформ глутатионпероксидаз входит селеноцистеин, посредством обратимого окисления которого фермент участвует в восстановлении пероксидов, в том числе липидных; на основе низкомолекулярных селеноорганических соединений синтезированы имитаторы глутатионпероксидаз, обладающие сходным механизмом действия (в частности, эбселен) [9]. Однако существенным ограничением медико-биологического использования селеносодержащих соединений служит токсичность Se, что и подтверждает настоящее исследование.

Обнаруженная у ТС-13 уникальная среди тестируемых соединений способность в малых концентрациях увеличивать количество жизнеспособных клеток (см. рис. 1), очевидно, связана со стимулированием их пролиферации и/или роста. Для более детального анализа были проведены дополнительные эксперименты по исследованию влияния ТС-13 в концентрациях от 1 до 200 мкМ на жизнеспособность, апоптоз и некроз клеток U937 в условиях окислительного стресса, индуцированного экзогенным пероксидом водорода.

Инкубирование клеток U937 с 0,5 мМ H_2O_2 в течение 24 ч снижало их жизнеспособность на 40–60 % (рис. 3). Установлено, что присутствие ТС-13 защищало клетки от цитотоксиче-

Таблица

Характеристика зависимости жизнеспособности клеток линии U937 от концентрации внесенного в среду инкубации фенольного антиоксиданта

Соединение	Вид аппроксимации; уравнение	Достоверность аппроксимации (R^2 ; p)	Коэффициент корреляции Спирмена (r_s ; p)	IC ₅₀ , мкМ
 Фенозан-калий	Линейная; $y = 1,0197 - 0,0003 \times x$	0,38; 0,0013	-0,57; 0,003828	900
 TC-13*	Линейная; $y = 1,0335 - 0,0007 \times x$	0,92; 0,0000	-0,93; 0,000000	658
 TC-12	Линейная; $y = 1,0379 - 0,0011 \times x$	0,94; 0,0000	-0,98; 0,000000	438
 TC-17	Линейная; $y = 0,9802 - 0,0017 \times x$	0,95; 0,0000	-0,95; 0,000000	302
 C-13	Линейная; $y = 1,0488 - 0,0018 \times x$	0,95; 0,0000	-0,97; 0,000000	291
 CC-13	Экспоненциальная; $y = 1,075 + 0,8810 \times e^{-x/97,25}$	0,96; 0,0000	-0,81; 0,000001	80

Примечание. Соединения расположены по мере увеличения токсичности; * – данные приведены без учета стимулирующих концентраций.

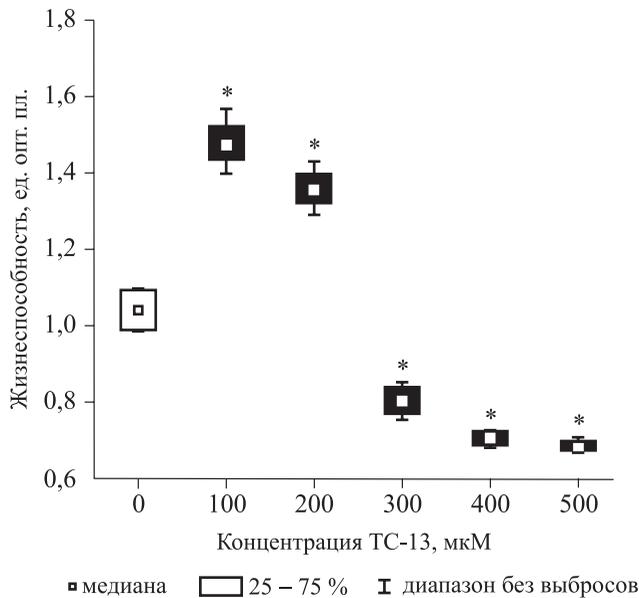


Рис. 1. Влияние TC-13 на жизнеспособность клеток линии U937. Здесь и на рис. 2–4 светлые прямоугольники – контроль (инкубирование без антиоксидантов), темные – инкубирование с антиоксидантами; * – отличие от величины соответствующего показателя в контроле статистически значимо при $p < 0,05$

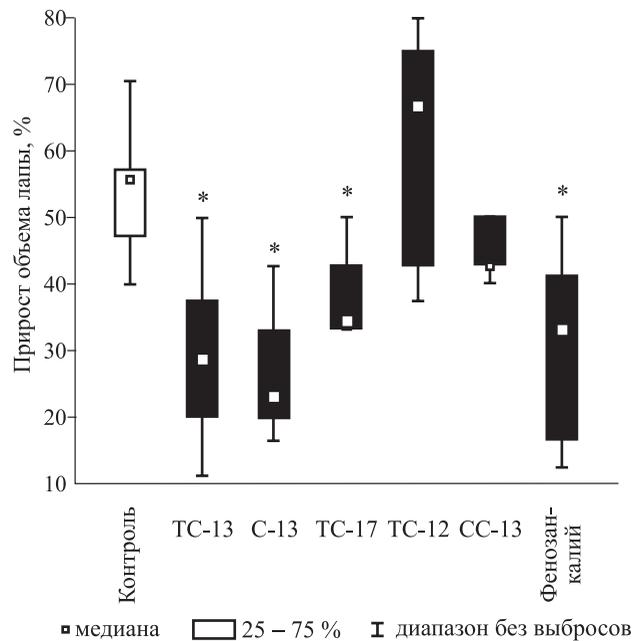


Рис. 2. Влияние фенольных антиоксидантов на выраженность воспалительной реакции

ского действия пероксида водорода, увеличивая количество жизнеспособных клеток, при этом кривая «доза – эффект» также имела колоколообразный характер, но в данном случае ее купол был смещен влево, с максимально эффективной концентрацией 20 мкМ (рис. 3). Предварительная

обработка клеток TC-13 также существенно снижала количество клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза, через 4 ч после добавления к ним H_2O_2 (рис. 4, а). Данный эффект зависел от концентрации TC-13, будучи наиболее выраженным при использовании антиоксиданта в дозах 100 и 200 мкМ, в которых соединение уменьшало количество клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом до 50 % от величины соответствующего показателя в контроле. В то же время предварительная обработка клеток TC-13 не влияла на увеличение числа клеток с нарушенной целостностью клеточной мембраны через 4 ч после индукции окислительного стресса H_2O_2 (рис. 4, б), т. е. на повышение количества пропидий-позитивных событий – клеток, погибших путем первичного и вторичного некроза (находящихся на поздних стадиях апоптоза).

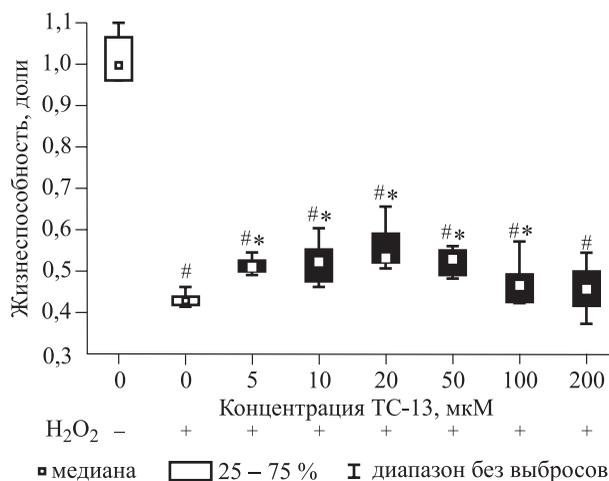


Рис. 3. Влияние TC-13 на жизнеспособность клеток линии U937 через 24 ч после добавления H_2O_2 . Здесь и на рис. 4 обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от соответствующих показателей: # – интактных клеток (культивируемых без H_2O_2), * – клеток, культивируемых с H_2O_2 в отсутствие TC-13

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из ряда структурно подобных синтетических водорастворимых антиоксидантов наименьшее влияние на жизнеспособность клеток оказывает несимметрично экранированный орто-трет-бутилом фенол с атомом бивалентной серы в пара-пропильном заместителе TC-13. Большая степень экранирования (TC-17), отсутствие «активной» серы (C-13), приближе-

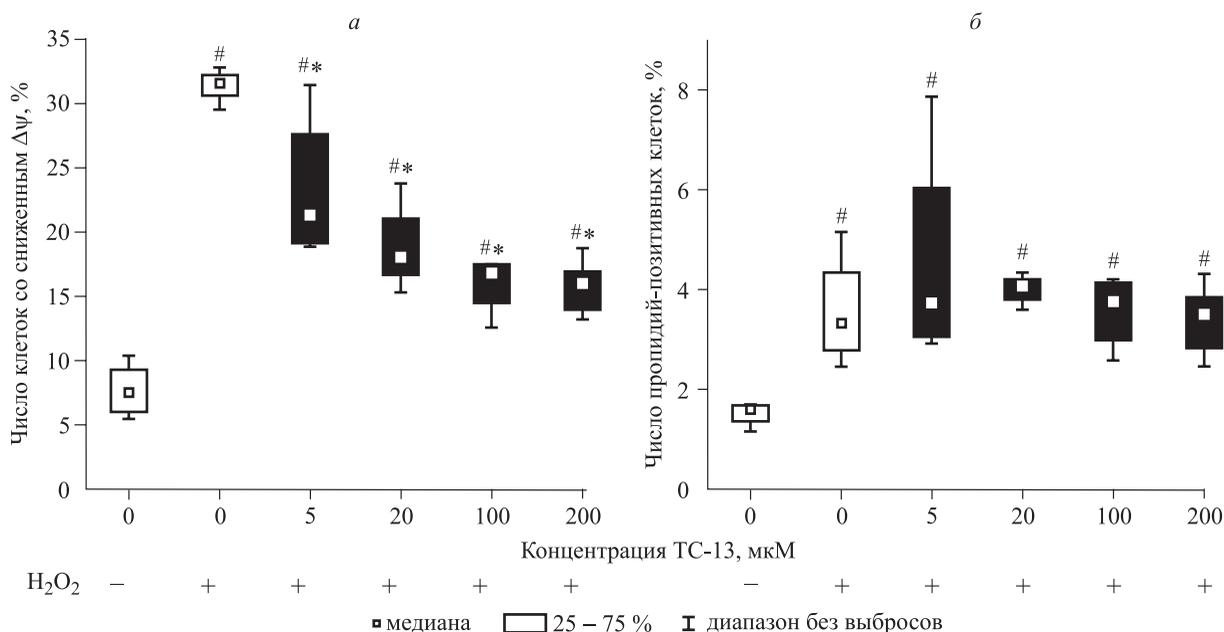


Рис. 4. Влияние ТС-13 на относительное количество клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом (а) и пропидий-позитивных клеток (б) (в % от общего количества проанализированных клеток)

ние ее к бензолному ядру (ТС-12) или замена на атом селена (СС-13) приводит к однозначному, но выраженному в разной степени увеличению токсичности соединения. При этом в малых дозах (до 200 мкМ) ТС-13 повышает жизнеспособность клеток *in vitro* как в нормальных условиях, так и при индукции окислительного стресса, что, очевидно, связано с его способностью подавлять развитие апоптоза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 14-04-00551а), с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты // Рос. хим. журн. 2007. 51. (1). 3–12.
2. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В. и др. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Биохимия. 2007. 72. (6). 790–798.
3. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. Структурно-функциональные особенности противовоспалительного действия новых водорастворимых серосодержащих

фенольных антиоксидантов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. (5). 521–524.

4. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publishing, 2012. 496 с.

5. Просенко А.Е., Клепикова С.Ю., Кандалинцева Н.В. и др. Синтез и исследование антиоксидантных свойств новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Бюл. СО РАМН. 2001. (1). 114–126.

6. Nury T., Zarrouk A., Vejux A. et al. Induction of oxiapoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: impairment by alpha-tocopherol // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. 446. 714–719.

7. Tailor N., Sharma M. Antioxidant hybrid compounds: a promising therapeutic intervention in oxidative stress induced diseases // Mini Rev. Med. Chem. 2013. 13. 280–297.

8. Van Meerloo J., Kaspers G.J., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay // Methods Mol. Biol. 2011. 731. 237–245.

9. Yoshida E., Watanabe T., Takata J. et al. Topical application of a novel, hydrophilic gamma-tocopherol derivative reduces photo-inflammation in mice skin // J. Invest. Dermatol. 2006. 126. 1633–1640.

EFFECT OF NOVEL WATER-SOLUBLE PHENOLIC ANTIOXIDANTS ON CELL VIABILITY: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS

**Anna Evgen'evna LEMZA¹, Viktor Olegovich TKACHEV^{1,2},
Nikolay Konstantinovich ZENKOV¹, Sergey Viktorovich KHOL'SHIN³,
Natal'ya Valer'evna KANDALINTSEVA³, Elena Bronislavovna MENSCHHIKOVA¹**

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

² *University of Michigan School of Medicine
MI 48109-5624, Ann Arbor, 1301 Catherine, USA*

³ *Novosibirsk State Pedagogical University
630126, Novosibirsk, Viluyanskaya str., 28*

In order to investigate cytotoxicity of structurally similar synthetic water-soluble sulfur- and selenium-containing monophenolic antioxidants, their effect on the viability of monocyte/macrophage U937 cells has been studied in normal conditions and under oxidative stress. All tested compounds showed low toxicity ($IC_{50} \geq 0.3$ mM), with the exception of selenium-containing analog ($IC_{50} = 80$ mM). At that, partially hindered phenol with one ortho-tert-butyl and a bivalent sulfur atom in the para-propyl substituent TS-13 at low doses increased the number of viable cells in vitro in normal conditions and when incubated with the cytotoxic concentrations of H_2O_2 , probably due to inhibition of the apoptotic processes.

Key words: synthetic antioxidants, viability, TS-13.

Lemza A.E. – candidate of biological sciences, researcher, e-mail: lemza.ae@yandex.ru

Tkachev V.O. – candidate of medical sciences, senior researcher, e-mail: victor.o.tkachev@gmail.com

Zenkov N.K. – doctor of biological sciences, leading researcher, e-mail: lemen@centercem.ru

Khol'shin S.V. – senior lecturer, e-mail: aquaphenol@mail.ru

Kandalintseva N.V. – candidate of chemical sciences, professor, e-mail: aquaphenol@mail.ru

Menschchikova E.B. – doctor of medical sciences, head of the laboratory, e-mail: lemen@centercem.ru

ВОЛНОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА НЕЛИНЕЙНЫХ КРЫС ПРИ БЛОКАДЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ И ЦЕНТРАЛЬНЫХ АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР

Евгения Владимировна КУРЬЯНОВА, Юлия Дмитриевна ЖУКОВА,
Нина Александровна ГОРСТ, Нина Владимировна ЖУКОВИНА

ФГБОУ ВПО Астраханский государственный университет
414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1

Исследовали изменения variability сердечного ритма (ВСР) при блокаде периферических β_1 -адренорецепторов (β_1 -АР) атенололом (2 мг/кг массы тела, 7 дней) и блокаде синтеза катехоламинов (БСК) альфа-метилтирозином (180 мг/кг массы тела, 3 дня) у нелинейных крыс-самцов половозрелого и 1,5-месячного возраста в состоянии спокойного бодрствования и острого стресса. БСК приводит к увеличению мощности и доли в спектре ВСР высокочастотных волн (HF) при уменьшении доли низко- (LF) и сверхнизкочастотных волн (VLF), а блокада β_1 -АР дает противоположный эффект в виде уменьшения доли HF и увеличения доли LF и VLF в спектре ВСР у половозрелых крыс в покое. Эффекты адренергических блокад сильнее проявляются у крысят, так как у них изменяется не только относительная, но и абсолютная мощность волн: на фоне атенолола снижается мощность HF-волн, а на фоне БСК – VLF-колебаний. В условиях стресса у крыс с блокадой β_1 -АР сильно падает мощность всех волн ВСР, особенно HF, но сохраняется высокая централизация управления ритмом сердца. На фоне БСК мощность HF остается высокой при неуклонном снижении мощности VLF-волн и ослаблении централизации управления в ходе стресса. Авторы полагают, что блокада центральных катехоламинергических структур вызывает более определенные и стойкие изменения ВСР и более эффективна для выявления роли адренергических механизмов в формировании волн ВСР (преимущественно VLF), нежели блокада β_1 -АР миокарда, которые, скорее всего, участвуют в формировании общей variability сердечного ритма.

Ключевые слова: variability сердечного ритма, спектральный анализ, высокочастотные волны HF, низкочастотные волны LF, сверхнизкочастотные волны VLF, блокада β_1 -адренорецепторов, атенолол, блокада синтеза катехоламинов, альфа-метилтирозин, стресс, возраст.

Анализ variability сердечного ритма (ВСР) активно применяется в качестве метода функциональной диагностики в медико-биологических и клинических исследованиях. При этом считается, что мощность высокочастотных волн HF отражает парасимпатические влияния, а мощность медленных волн LF – преимущественно симпатические влияния на сердце [1, 10, 13, 18, 19]. Однако такие трактовки нередко вступают в серьезные противоречия с экспериментальными данными. В работах с применением блокаторов β_1 -адренорецепторов (β_1 -АР) зачастую не удается получить стабильного эффекта в виде теоретически ожидаемого снижения мощности LF-волн [7–9, 14, 16]. Также не всегда обнаруживается рост мощности медленных волн при повышении активности симпатической нервной системы [12, 15]. Поэтому сторонники теории симпатической

природы медленных волн ВСР становится меньше [8, 11, 14], но вопрос о механизмах их формирования все же требует решения.

Ранее нами получены факты, свидетельствующие в пользу катехоламинергической природы VLF-волн ВСР [5]. В настоящем исследовании проведено сопоставление эффектов блокады β_1 -АР миокарда и блокады синтеза катехоламинов на ВСР нелинейных крыс разного возраста с целью выяснения роли периферических и центральных адренергических структур в формировании волн сердечного ритма.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на самцах крыс 3,5–4-месячного и 1,5-месячного возраста в соответствии с «Правилами проведения работ с

Курьянова Е.В. – д.б.н., проф. кафедры физиологии и морфологии человека и животных, e-mail: fyzevk@rambler.ru

Жукова Ю.Д. – магистрант 2-го года обучения по направлению «Медико-биологические науки»

Горст Н.А. – д.б.н., проф. кафедры физиологии и морфологии человека и животных

Жуковина Н.В. – магистрант 2-го года обучения по направлению «Медико-биологические науки».

использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и Европейской конвенцией по защите экспериментальных животных. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и корму.

Блокада β_1 -АР создавали атенололом («Pliva», Хорватия) в дозе 2 мг/кг массы тела внутрибрюшинно в течение 7 дней [6]. Снижение активности центральных катехоламинергических систем моделировали путем блокады синтеза катехоламинов (БСК) введением гидрохлорида D,L-альфа-метил-Р-тирозина метилового эфира («Sigma», Германия) в дозе 180 мг/кг массы тела внутрибрюшинно в течение 3 дней [5, 21]. Все препараты вводили ежедневно с 8 до 10 ч. Контрольные животные получали физиологический раствор из расчета 1 мл/кг массы тела в том же режиме, что опытные – препараты.

Часть животных каждой группы подвергали острому стрессу длительностью 1 ч по ранее описанной методике [4], сочетающей иммобилизацию крыс в плексигласовом пенале с электрокожным раздражением хвоста по стохастической схеме.

ЭКГ регистрировали у бодрствующих крыс на аппаратно-программном комплексе «Варикард» («Рамена», Россия) при помощи миниатюрных электродов-зажимов при местном обезболивании лидокаином [3–5]. ВСР исследовали в состоянии спокойного бодрствования до введения препаратов, через 1 ч после последнего введения препаратов, на 15-й, 30-й и 60-й минуте стресса.

Измерение R-R-интервалов и первичную обработку данных осуществляли с использованием компьютерной программы «ИСКИМ6» («Рамена», Россия). Для анализа из каждой записи обрабатывали непрерывные ряды из 400 R-R-интервалов у крысят и 300 R-R-интервалов у половозрелых крыс [6]. Определяли частоту сердечного ритма (ЧСР, уд./мин), индекс напряжения (ИН) по Р.М. Баевскому [1] при ширине класса гистограммы 7,8 мс: $ИН = (АМ_0/2 \times \Delta X \times M_0) \times (50/7,8) \times 1000$, где M_0 – мода (количество наиболее часто встречающихся RR-интервалов), $АМ_0$ – амплитуда моды (доля интервалов, соответствующих значению моды), ΔX – вариационный размах.

Спектральный анализ ВСР проводили в диапазонах: HF (0,9–3,5 Гц), LF (0,32–0,9 Гц), VLF (0,18–0,32 Гц). Определяли суммарную мощность спектра (ТР, мс²), абсолютную и относительную мощность волн в каждом диапазоне, индекс централизации IC ($IC = (LF + VLF)/HF$). В эксперимент брали животных, у которых в ис-

ходном состоянии ВСР была представлена преимущественно HF-волнами (более 38 % от суммарной мощности спектра) [3].

Математическую обработку результатов проводили в программе Statistica 6.0 с применением t-теста Стьюдента, корреляционного анализа. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У половозрелых крыс, получавших атенолол в течение 7 дней, ЧСР мало отличалась от контрольной, но имело место небольшое снижение мощности HF-волн ($p < 0,1$) при тенденции к росту мощности LF и VLF-волн, что обусловило увеличение IC ($p < 0,05$) (см. таблицу). БСК вызвала у половозрелых крыс более значительное снижение ЧСР (на 7 %, $p < 0,05$), чем блокада β_1 -АР (см. таблицу). При этом ИН снизился ($p < 0,05$) и оказался почти вдвое меньше контрольного ($p < 0,001$) при увеличении общей variability кардиоинтервалов ($p < 0,01$). Основной вклад в рост variability ритма внесло почти двукратное повышение мощности HF-волн ($p < 0,001$). Соответственно доля LF и VLF в спектре сократилась ($p < (0,05–0,001)$), а IC снизился ($p < 0,001$). У крысят, как известно, по мере роста и развития происходит возрастное урежение ЧСР и повышение variability кардиоинтервалов [2, 6]. По нашим наблюдениям, у крысят к 1,5-месячному возрасту ЧСР снизилась на 8–12 % ($p < 0,05$) и появились тенденции к уменьшению ИН и росту мощности волн в HF- и LF-диапазонах (см. таблицу) по сравнению с состоянием недель ранее.

На фоне введения атенолола у крысят урежение ЧСР было выражено слабо. Мощность волн HF упала вдвое ($p < 0,01$), а VLF – выросла ($p < 0,05$), что привело к повышению IC (в 2,3 раза, $p < 0,001$; $r = -0,51$, $p < 0,05$). Сердечный ритм крысят, получавших атенолол, был более напряженным, чем в контроле, из-за низкой мощности HF- и LF-волн ($p < 0,001$). На фоне БСК урежение ЧСР крысят составило 9,3 % от исходной ($p < 0,001$) (см. таблицу). Одновременно резко снизилась общая variability CP, а ИН увеличился ($p < 0,01$), превысив в 1,9 раза уровень контроля ($p < 0,001$). Причиной этого стало уменьшение мощности VLF-волн ($p < 0,01$) и отсутствие характерного для растущих животных усиления HF-волн, мощность которых оказалась на треть меньше ($p < 0,01$), чем у контрольных крысят.

Полученные данные свидетельствуют, что эффекты блокады β_1 -АР и блокады синтеза катехоламинов на ВСР не однозначны. Так, при блокаде

Таблица

Изменения параметров ВСП крыс после введения атенолола и блокатора синтеза катехоламинов ($M \pm m$)

Параметр ВСП	Группа крыс	Половозрелые крысы		Крысята	
		До введения	После введения	До введения	После введения
ЧСР, уд./мин	Контроль	319,1 ± 9,2	324,6 ± 8,9	412,0 ± 10,3	375,2 ± 8,6*
	Атенолол	325,3 ± 5,8	314,2 ± 6,5	406,4 ± 9,8	397,4 ± 6,3#
	БСК	325,8 ± 6,7	303,8 ± 5,2*	405,4 ± 5,5	367,6 ± 7,1***
ИН, отн. ед.	Контроль	28,6 ± 3,2	31,8 ± 2,5	45,6 ± 3,5	37,9 ± 3,5
	Атенолол	36,8 ± 3,3	43,4 ± 4,5#	41,9 ± 4,6	45,2 ± 3,2
	БСК	26,4 ± 3,3	15,5 ± 2,8*,###	48,6 ± 4,1	71,8 ± 5,6**,###
HF _{абс} , мс ²	Контроль	7,9 ± 0,8	8,2 ± 0,9	5,9 ± 0,7	7,5 ± 0,7
	Атенолол	7,6 ± 0,7	6,2 ± 0,5	4,6 ± 0,6	2,2 ± 0,4**,###
	БСК	7,4 ± 0,7	15,6 ± 1,8***,###	5,8 ± 0,5	5,2 ± 0,5##
LF _{абс} , мс ²	Контроль	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,5	2,3 ± 0,3	3,3 ± 0,3*
	Атенолол	2,5 ± 0,3	3,1 ± 0,4	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2##
	БСК	3,2 ± 0,3	3,9 ± 0,5	2,7 ± 0,4	2,6 ± 0,5
VLF _{абс} , мс ²	Контроль	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,3
	Атенолол	2,8 ± 0,4	3,4 ± 0,4	2,2 ± 0,2	3,0 ± 0,3*
	БСК	2,9 ± 0,4	3,1 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1**,###
HF, %	Контроль	56,9 ± 3,8	58,2 ± 4,1	57,3 ± 3,7	56,4 ± 4,9
	Атенолол	58,6 ± 3,7	48,8 ± 2,5*	52,5 ± 3,8	30,9 ± 1,9***,###
	БСК	55,0 ± 4,1	69,1 ± 4,8*	58,1 ± 4,5	61,2 ± 4,1
LF, %	Контроль	21,1 ± 2,5	20,3 ± 3,5	22,4 ± 1,3	24,8 ± 3,3
	Атенолол	19,6 ± 1,3	24,5 ± 2,4	23,0 ± 1,2	26,7 ± 2,2##
	БСК	24,0 ± 2,1	17,3 ± 1,5*	26,0 ± 2,4	30,6 ± 2,7
VLF, %	Контроль	22,0 ± 2,2	21,5 ± 2,5	20,3 ± 1,6	18,8 ± 1,0
	Атенолол	21,8 ± 2,4	26,7 ± 3,3	25,5 ± 1,7	42,4 ± 3,2***,###
	БСК	21,0 ± 1,8	13,6 ± 0,9***,##	15,9 ± 0,9	8,2 ± 0,1***,###
IC, отн. ед.	Контроль	0,66 ± 0,06	0,77 ± 0,09	0,75 ± 0,08	0,78 ± 0,06
	Атенолол	0,72 ± 0,09	1,41 ± 0,25*,#	0,93 ± 0,07	2,16 ± 0,14***,###
	БСК	0,85 ± 0,10	0,45 ± 0,06***,##	0,70 ± 0,07	0,63 ± 0,06

Примечание. В группе «Контроль» 15 самцов и 14 крысят, в группе «атенолол» 15 самцов и 13 крысят, в группе «БСК» 13 самцов и 12 крысят. Возраст крысят на момент регистрации данных после введения препаратов 1,5 мес. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей до введения препарата (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$) и группы контроля (# – при $p < 0,05$, ## – при $p < 0,01$, ### – при $p < 0,01$).

β_1 -АР отмечается в большей или меньшей мере снижение доли в спектре и абсолютной мощности HF-волн при повышении доли медленных волн и росте IC. В условиях блокады синтеза катехоламинов, напротив, мощность HF-волн повышается или остается высокой, но при этом уменьшается относительная и (или) абсолютная мощность VLF-волн, а IC снижается.

Основными стресс-индуцированными изменениями ВСП у половозрелых крыс контрольной группы были увеличение ЧСР (на 42 %, $p < 0,001$) и ИН ($p < 0,001$), ослабление HF-волн ($p < 0,01$), повышение мощности LF- и VLF-волн ($p < (0,05-0,001)$) и возрастание IC ($p < (0,05-0,001)$) (рис. 1). На фоне блокады β_1 -АР у половозрелых крыс стрессорная тахикардия была

сильно ослаблена, прирост ЧСР составил не более 24 % от исходной ($p < 0,001$). Мощность волн спектра ВСП уменьшилась (HF-волн – в 3,7 раза, $p < 0,001$, LF-волн – в 1,3 раза, $p < 0,05$) и оставалась на очень низком уровне на протяжении всего стресса. На фоне введения атенолола оказалось нивелированным характерное для стресса усиление мощности LF- и VLF-волн. Однако IC был высоким в ходе всего стресса ($p < 0,001$), что определялось резким ослаблением мощности волн HF.

При БСК стресс-индуцированный прирост ЧСР составил не более 25 % ($p < 0,001$) (см. рис. 1), но вариабельность CP проявляла тенденцию к росту. Мощность волн в диапазоне HF усиливалась ($p < 0,05 - p < 0,001$) и была значитель-

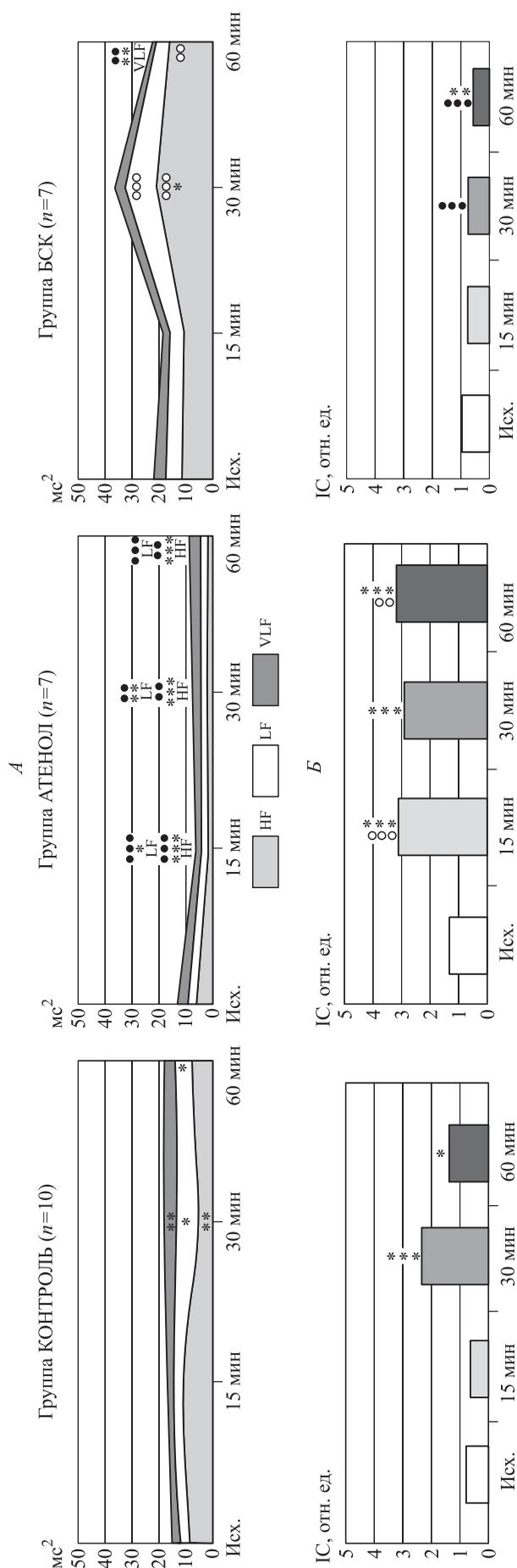


Рис. 1. Динамика стресс-индуцированных изменений показателей ВСП половозрелых крыс на фоне блокады β_1 -адренорецепторов (атенолол) и блокады синтеза катехоламинов (БСК). Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей в исходном состоянии (сплошное бодрствование) (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$) и группы контроля (○, ○○, ○○○ – выше контроля, соответственно $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$); ●, ●●, ●●● – ниже контроля, соответственно $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$)

но больше, чем у контрольных крыс ($p < 0,05 - p < 0,001$). При этом мощность VLF-волн в ходе стресса становилась все меньше, к 60-й минуте она снизилась в 3,5 раза ($p < 0,01$), а доля в спектре упала до 5,5 % ($p < 0,001$). Соответственно значительно уменьшился и IC ($p < 0,001$). У неполовозрелых крыс контрольной группы в ситуации стресса ЧСР повышалась на 27 % ($p < 0,001$) от исходной, а ИН – в 3,8 раза ($p < 0,001$). Высокая ригидность СР определялась ослаблением мощности всех волн, особенно HF (в 3,9 раза, $p < 0,001$), которая оставалась низкой на протяжении всего стресса (рис. 2).

У крысят с блокадой β_1 -АР, в отличие от одновозрастного контроля, в условиях стресса ЧСР снижалась ($p < 0,01$) (см. рис. 2). Реакция на стресс реализовывалась через падение мощности волн всех диапазонов спектра, что привело к росту ИН (2,8–1,9 раза, $p < 0,001$). Особенно сильно на 30–60-й минуте стресса снизилась мощность VLF-волн (в 2,8 раза, $p < 0,001$) и IC ($p < 0,001$). У крысят группы БСК в условиях стресса произошло стойкое повышение ЧСР на 21 % ($p < 0,001$), но ИН вырос незначительно (см. рис. 2). Мощность HF- и LF-волн практически не изменилась. В VLF-диапазоне мощность волн была особенно слабой, абсолютные величины не превышали 1 мC², а доля в спектре составляла 5–10 %, что было ниже контрольного значения в 3,3 раза ($p < 0,01$). Соответственно величина IC не превышала 1 отн. ед.

Следовательно, в ситуации острого стресса эффекты адренергических блокад в отношении ВСП проявляются в ослаблении медленных волн, уменьшении их доли в спектре ВСП. При блокаде β_1 -АР снижается или остается на низком уровне мощность не только HF-, но также LF- и VLF-волн, тем не менее централизация управления ритмом сердца остается высокой. Блокада синтеза катехоламинов отражается преимущественно на мощности VLF-волн, которая при стрессе неуклонно снижается, в то время как волны HF остаются хорошо выраженными или даже усиливаются, что определяет низкую централизацию управления сердечным ритмом.

реализация управления. На фоне БСК мощность HF остается высокой при неуклонном снижении мощности VLF-волн и ослаблении централизации управления в ходе стресса. Эти факты дают основание говорить о непосредственном участии центральных катехоламинергических нервных путей в торможении активности структур автономного контура регуляции и возникновении VLF-колебаний сердечного ритма при стрессе. В случае, когда уровень катехоламинов в мозге не изменен, а заблокированы только периферические β_1 -АР, недостаточный рост ЧСР при стрессе, по-видимому, компенсируется усилением ригидности ритма сердца за счет выраженной активации симпатических центров спинного мозга и торможения парасимпатических центров ствола мозга со стороны эрготропных зон гипоталамуса.

Известно, что на ранних этапах постнатального онтогенеза имеет место превалирование адренергических механизмов над холинергическими в регуляции сердечной деятельности [2, 6, 17]. Вероятно, этим можно объяснить тот факт, что эффекты примененных адренергических блокад существенно проявились у крысят, нежели у половозрелых крыс, и заключались в изменениях не только относительной, но и абсолютной мощности волн ВСР: при блокаде β_1 -АР – HF-волн, а при БСК – VLF-волн. Знание возрастных особенностей деятельности регуляторных систем позволило нам с большей уверенностью судить об изменениях ВСР в условиях адренергических блокад.

Таким образом, проведенные исследования показали, что центральные катехоламинергические регуляторные механизмы участвуют в формировании волн ВСР. Изменения ВСР при моделировании резкого дефицита катехоламинов в мозге позволяют предполагать, что катехоламинергические нервные пути тормозят структуры автономного контура, снижая высокочастотную модуляцию ритма сердца, и отвечают за формирование VLF-колебаний ВСР.

Периферические адreno-, а также холинорецепторы реализуют команды, источником которых могут выступать различные отделы ЦНС и рефлексогенные зоны, формирующие разнообразные по частотным характеристикам ритмы. Следовательно, периферические рецепторы к вегетативным медиаторам в той или иной мере вовлечены в формирование всех волн ВСР. В этой связи становится понятным, почему при значительном количестве работ по изучению ВСР с применением блокады периферических рецепторов до сих пор не сформировано четкого представления о природе медленных волн ВСР.

На основе сопоставления изменений ВСР при блокаде периферических и центральных адренергических структур можно заключить, что для выявления физиологической природы волн ВСР в эксперименте необходимо не только использовать блокаду и стимуляцию адreno- и холинорецепторов миокарда, но и моделировать воздействия, изменяющие активность тех или иных структур ЦНС, медиаторных систем мозга и т. п. Кроме того, важно использовать в качестве объектов животных разных возрастных групп, генетических линий, заведомо различающихся по активности регуляторных систем организма. В этом случае можно получить данные, которые позволят уточнить или раскрыть происхождение частотных характеристик колебаний сердечного ритма.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 14-04-00912).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В. и др. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем (методические рекомендации) // Вестн. аритмологии. 2001. (24). 65–87.
2. Зиятдинова Н.И., Зефирова А.Л., Зефирова Т.Л. Селективная блокада α_1 -адренорецепторов вызывает противоположные изменения хронотропии сердца крыс разного возраста // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2011. 152. (7). 22–24.
3. Курьянова Е.В. К вопросу о применении спектральных и статистических параметров вариабельности сердечного ритма для оценки нейровегетативного состояния организма в эксперименте // Бюл. СО РАМН. 2009. 140. (6). 30–37.
4. Курьянова Е.В. Основные типы стрессиндуцированных изменений вариабельности сердечного ритма и интенсивности свободнорадикальных процессов у нелинейных крыс в условиях острого напряжения // Там же. 2011. 31. (5). 47–55.
5. Курьянова Е.В., Теплый Д.Л. Влияние центральных нейромедиаторных процессов на вариабельность сердечного ритма нелинейных крыс в покое и в условиях острого стресса: к вопросу о природе очень медленноволновой компоненты спектра // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2010. 149. (1). 14–17.
6. Курьянова Е.В., Теплый Д.Л. Возрастные и половые особенности изменений вариабельности сердечного ритма при блокаде и стимуляции периферических адренорецепторов у нелинейных крыс // Там же. 2014. 157. (3). 284–288.

7. Сальников Е.В. Вариабельность сердечного ритма у крыс с экспериментальной хронической сердечной недостаточностью, длительно получавших бета-адреноблокаторы // Там же. 2009. 147. (2). 139–143.
8. Сергеева О.В., Акимова И.А., Антонов И.С., Лузина Л.С. и др. Влияние адреноблокаторов на медленные (LF) волны ритма сердца у кроликов // Там же. 2014. 157. (3). 268–271.
9. Сергеева О.В., Алипов Н.Н., Смирнов В.М. Влияние атропина, пропранолола и атенолола на волновую структуру колебаний ритма сердца у крыс // Там же. 2008. 145. (4). 364–367.
10. Altuncu M.E., Baspinar O., Keskin M. The use of short-term analysis of heart rate variability to assess autonomic function in obese children and its relationship with metabolic syndrome // *Cardiol. J.* 2012. 19. (5). 501–506.
11. Billman G.E. The LF/HF ratio does not accurately measure cardiac sympatho-vagal balance // *Front. Physiol.* 2013. 4. 26.
12. DeBeck L.D., Petersen S.R., Jones K.E., Stickland M.K. Heart rate variability and muscle sympathetic nerve activity response to acute stress: the effect of breathing // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010. 299. R80–R91.
13. Elghozi J.L., Julien C. Sympathetic control of short-term heart rate variability and its pharmacological modulation // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2007. 21. 337–347.
14. Goldstein D.S., Benth O., Park M.Y., Shara-bi Y. LF power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic outflows by baro-reflexes // *Exp. Physiol.* 2011. 96. 1255–1261.
15. Perini R., Veicsteinas A. Heart rate variability and autonomic activity at rest and during exercise in various physiological conditions // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2003. 90. (3–4). 317–325.
16. Rahman F., Pechnik S., Gross D. et al. LF power reflects baroreflex function, not cardiac sympathetic innervation // *Clin. Auton. Res.* 2011. V. 21. P. 133–141.
17. Robinson R.B. Autonomic receptor-effector coupling during post-natal development // *Cardiovasc. Res.* 1996. 31. E68–E76.
18. Song J.G., Hwang G.S., Lee E.H. et al. Effects of bilateral stellate ganglion block on autonomic cardiovascular regulation // *Circ. J.* 2009. 73. 1909–1913.
19. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use // *Circulation.* 1996. 93. 1043–1065.
20. Waki H., Katahira K., Polson J.W. et al. Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats // *Exp. Physiol.* 2006. 91. (1). 201–213.
21. Widerlov E., Lewander T. Inhibition of the vivo biosynthesis and changes of catecholamine levels in rat brain after alpha-methyl-p-tyrosine; time- and dose-response relationships // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1978. 304. (2). 111–123.

THE WAVE CHARACTERISTICS OF THE HEART RHYTHM OF NONLINEAR RATS AT BLOCKADE PERIPHERAL AND CENTRAL ADRENERGIC STRUCTURES

Eugeniya Vladimirovna KURYANOVA, Yuliya Dmitrievna ZHUKOVA,
Nina Aleksandrovna HORST, Nina Vladimirovna ZHUKOVINA

Astrakhan State University
414000, Astrakhan, Shaumyan sq., 1

The changes of heart rate variability (HRV) on introducing blockader of β_1 -adrenoreceptors (β_1 -AR) atenolol (2 mg/kg of b.w., 7 days) and blockader of catecholamines synthesis (BCS) alpha – methyltyrosine (180 mg/kg of b.w., 3 days) have been investigated in male adult rats and 1,5-month's rats under condition of quiet wake and acute stress. The BCS causes the increase in the high frequency (HF) waves' intensity and ratio in HRV spectrum along with the reduction in ratio of low frequency (LF) and very low frequency (VLF) waves. The β_1 -AR blockade performs the opposite effect as reduction in HF ratio and increases in LF and VLF ratio in HRV-spectrum in adult rats in rest. The effects of adrenergic blockade are more strongly pronounced in 5–6-week rats. As far as not only the relative capacity of HRV-waves but also the absolute capacity of waves have been changed in them: on the background of atenolol the HF waves' intensity was reduced and on the background of BCS the VLF intensity was reduced. Under stress in rats with blockade of β_1 -adrenoreceptors the capacity of all HRV-waves (especially HF) acutely fell down, but the high control for heart rhythm remained unchanged. On the background of BCS the capacity of HF-waves remained high, and the capacity of VLF-waves and control for heart rhythm was reduced under stress. It has been suggested that the blockade of central catecholaminergic structures causes the more pronounced and definite changes of HRV-waves, it is more effective for revealing the role of adrenergic mechanisms in formation of HRV-waves (mainly VLF), rather than blockade of myocardial β_1 -adrenoreceptors which most likely participate in formation of the general variability of heart rhythm.

Key words: heart rate variability, spectral analysis, High-frequency waves, HF, low-frequency waves, LF, VLF, blockade of β_1 -adrenoreceptors, atenolol, blockade of catecholamines synthesis, alpha-methyltyrosine, stress, age.

Kuryanova E.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for human and animal physiology and morphology, e-mail: fyzevk@rambler.ru

Zhukova Yu.D. – master's student of the 2 grade

Horst N.A. – doctor of biological sciences, professor of the chair for human and animal physiology and morphology

Zhukovina N.V. – master's student of the 2 grade

УЧАСТИЕ АКТИВИРОВАННЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ KEAP1/NRF2/ARE В РАЗВИТИИ ГРАНУЛЕМАТОЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА¹, Николай Константинович ЗЕНКОВ¹,
Антон Владимирович ЧЕЧУШКОВ¹, Петр Михайлович КОЖИН¹,
Лилия Александровна ЧЕРДАНЦЕВА¹, Татьяна Владимировна ШАРКОВА¹,
Оксана Валентиновна ПОТАПОВА¹, Геннадий Юрьевич ЛЮБИМОВ²,
Галина Алексеевна ЛЮБИМОВА², Семен Евгеньевич ЯГУНОВ³

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины (НИИЭКМ)
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

³ ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный педагогический университет
630126, г. Новосибирск, ул. Виллюйская, 28

На модели внутривенного введения мышам вакцины БЦЖ проведено исследование действия фенольного антиоксиданта 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфата натрия (ТС-13), активирующего редокс-чувствительную систему антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE. На 30-е сутки после инфицирования мышей линии BALB/c в печени формировались гранулемы преимущественно макрофагального типа, одновременно наблюдалось усиление свободнорадикальных окислительных процессов, активность которых прямо коррелировала с численной плотностью и диаметром гранул. У животных, получавших с питьевой водой антиоксидант ТС-13 из расчета 100 мг/кг массы тела, отмечалось достоверное снижение как активности свободнорадикальных процессов в печени, так и формирования гранул, при этом продукция активированных кислородных метаболитов фагоцитами перитонеального экссудата, напротив, увеличивалась. Полученные данные свидетельствуют об участии системы Keap1/Nrf2/ARE в гранулемогенезе и о дихотомии реакции на него организма.

Ключевые слова: гранулематозное воспаление, макрофаги, активированные кислородные метаболиты, система Keap1/Nrf2/ARE, ТС-13.

До появления в середине прошлого столетия специфических противотуберкулезных препаратов (в период с 1944 по 1966 г. разработаны стрептомицин, изониазид, этамбутол, рифампицин и пипразинамид) патогенетическая терапия, направленная на усиление иммунитета и коррекцию нарушенных процессов жизнедеятельности, являлась основным методом лечения больных

туберкулезом. Несомненные успехи антимикробактериальной терапии привели к забвению или отодвинули на задний план курортное лечение (морские и горные курорты), диеты с рыбьим жиром и печенью трески, богатыми витамином D, а также другие методы патогенетической терапии. Однако появление в последние годы лекарственно устойчивых форм туберкулеза, вызван-

Меньщикова Е.Б. – д.м.н., зав. лабораторией, e-mail: lemen@centercem.ru

Зенков Н.К. – д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: lemen@centercem.ru

Чечушков А.В. – научный сотрудник, e-mail: achechushkov@gmail.com

Кожин П.М. – научный сотрудник, e-mail: kozhinpm@gmail.com

Черданцева Л.А. – к.м.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: cherdanceff@yandex.ru

Шаркова Т.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: tasharkova@yandex.ru

Потапова О.В. – д.м.н., зав. лабораторией, e-mail: potapova@centercem.ru

Любимов Г.Ю. – к.м.н., научный сотрудник, e-mail: glubimov@rambler.ru

Любимова Г.А. – лаборант, e-mail: glubimov@rambler.ru

Ягунов С.Е. – аспирант, e-mail: semenyagunov@gmail.com

ных резистентными к антибиотикам штаммами микобактерий, заставило фтизиатров вспомнить о патогенетических средствах, влияющих на иммунный статус (левамизол, этимизол и др.), на формирование соединительной ткани (преднизолон, пирогенал, лидаза) и обладающих антиоксидантным и защитным действием (α -токоферол, тиосульфат натрия). Сегодня проводятся активные клинические исследования применения ИЛ-2 и кальцитриола (1,25-дигидроксивитамина D₃), оказывающих достоверный эффект на функцию Т-лимфоцитов и макрофагов [6], циклоферона, повышающего синтез интерферона- γ [7]. Несомненно, что применение патогенетической терапии в составе комплексного лечения больных туберкулезом способствует значительному повышению эффективности лечения и более совершенному восстановлению функционального состояния жизненно важных систем и организма в целом. Особого внимания заслуживает новое направление репрограммирования макрофагов в области туберкулезной гранулемы с помощью цитокинов и иммуномодуляторов, а также воздействий на определенные сигнальные системы и ключевые факторы транскрипции: NF- κ B, AP-1, STAT, PPAR γ и Nrf2 [2, 11, 17, 18].

На начальном этапе инфицирования (первые 30 дней) микобактерии переводят макрофаги в провоспалительное состояние M1, что необходимо для формирования гранулемы [10, 20]. Для классической активации макрофагов в состоянии M1 важны мембранные Toll-подобные рецепторы (TLR1, TLR2, TLR4 и TLR6) и факторы транскрипции (NF- κ B, AP-1, IRF3, IRF5 и IRF9) [10, 11, 16]. Обладая выраженной цитотоксической и антимикробной активностью, опосредованной продукцией активных форм кислорода и азота, провоспалительных цитокинов, макрофаги в состоянии M1 играют важную роль в защите от внутриклеточных патогенов, однако избыточная активность таких клеток может проявляться тканедеструктивным эффектом [9, 11, 15]. Поэтому для патогенетической терапии туберкулеза важной мишенью может служить редокс-чувствительная сигнальная система антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE, регулирующая гены антиоксидантной защиты и детоксикации ксенобиотиков, а также активность ферментативных механизмов продукции активированных кислородных метаболитов (АКМ) [1, 12, 17]. В этой связи мы провели исследование влияния серосодержащего фенольного антиоксиданта ТС-13, активирующего фактор транскрипции Nrf2 [13], на формирование БЦЖ-индуцированных гранул и продукцию АКМ у мышей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Водорастворимый фенольный антиоксидант 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия (ТС-13) синтезирован в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск, Россия), как описано ранее [4] (рис. 1).

Исследование проводили на мышах-самцах линии BALB/c двухмесячного возраста массой тела 18–22 г, содержащихся в виварии Института иммунологии СО РАМН (г. Новосибирск). Генерализованный туберкулезный гранулематоз моделировали однократным введением в хвостовую вену 0,5 мг вакцины БЦЖ в 0,2 мл изотонического раствора NaCl. Животные были разделены на три группы, по 6–10 особей в каждой: «контроль» (интактные мыши, которым внутривенно вводили 0,2 мл изотонического раствора NaCl), группа сравнения («БЦЖ» – мыши, инфицированные вакциной БЦЖ) и опытная группа («БЦЖ + ТС-13» – мыши, в течение 30 дней после инъекции вакцины БЦЖ получавшие с питьевой водой ТС-13 из расчета 100 мг/кг массы тела).

Мышей выводили из эксперимента путем дислокации позвонков в шейном отделе через 30 сут после инфицирования, когда в печени формировались типичные гранулемы. Получали перитонеальный экссудат промыванием брюшной полости холодной культуральной средой RPMI-1640 («Биолот», Россия) с 1 % фетальной бычьей сыворотки («Биолот»), затем вскрывали брюшную полость и проводили эвисцерацию печени. Печень взвешивали, забирали образцы тканей для гистологического исследования и приготовления гомогенатов.

Для светооптического исследования полученный материал после фиксации в 10%-м растворе нейтрального формалина обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ксилолов с последующим заключением в парафин. Из образцов печени изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм и окрашивали по стандартной

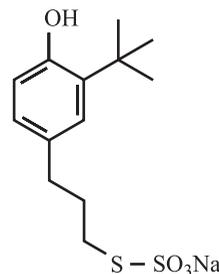


Рис. 1. Структура водорастворимого фенольного антиоксиданта 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфата натрия (ТС-13)

методике гематоксилином и эозином, наличие *Mycobacterium bovis* подтверждали с помощью специфического гистохимического метода окраски по Цилю – Нильсену. Методом морфометрии с помощью закрытой тестовой системы площадью $3,64 \times 10^5$ мкм² и инструментов программы AxioVision (rel. 4,7) на микроскопе AxioImager A1 («Carl Zeiss», Германия) определяли численную плотность (N_{ai}) и диаметр гранулем.

Для исследования продукции АКМ в гомогенатах печени при термостатировании (37 °С) регистрировали спонтанную хемилюминесценцию (ХЛ) гомогенатов печени (200 мг/мл бесцветной среды Хенкса), усиленную люминолом (5 нМ, «Serva», Германия) и H₂O₂-индуцированную (39,5 мМ) люминол-зависимую. Интенсивность ХЛ выражали в условных единицах (1 усл. ед. = 5 импульсов за 1 с), каждое значение усредняли. Спонтанную и индуцированную форбол-12-миристат-13-ацетатом (РМА, «Sigma») продукцию АКМ клетками перитонеального экссудата определяли по флуоресценции 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина DCF («Sigma», США), для чего их инкубировали в течение 15 мин в 1 мл бесцветной среды Хенкса с 10 мкМ диацетата DCF с последующим измерением спонтанной продукции АКМ (преимущественно H₂O₂), а также стимулированной 100 нМ РМА. Интенсивность DCF-зависимой флуоресценции ($\lambda_{Em} = 488$ нм, $\lambda_{Ex} = 520$ нм) измеряли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur («Becton-Dickinson», США). Результаты выражали в виде отношений величин интенсивности флуоресценции клеток к принятому за 100 % усредненному значению спонтанной DCF-зависимой флуоресценции в контроле.

Поскольку распределение величин в выборках отличалось от нормального, данные представлены в виде медианы (Me), межквартильного размаха (Q_1-Q_3) и диапазона без выбросов, различия между группами оценивали с помощью кри-

терия Манна – Уитни и считали значимыми при $p < 0,05$. Связь между признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе гистологических срезов печени мышей, полученных на 30 сутки после инфицирования вакциной БЦЖ, окрашенных гематоксилином и эозином, выявлено наличие диффузно, преимущественно периваскулярно расположенных макрофагальных гранулем со значительным содержанием лимфоцитов. Их морфометрическое исследование показало, что как численная плотность, так и размеры гранулем у животных, получавших ТС-13, были соответственно в 2,5 и 1,4 раза меньше, чем у животных без добавления ТС-13 в питьевую воду (см. таблицу). В гранулемах обеих групп исследования преобладали макрофаги, при этом у животных группы «БЦЖ + ТС-13» было статистически меньше эпителиоидных клеток (на 29,8 %) и нейтрофилов (почти полное отсутствие) (см. таблицу).

ХЛ анализ активности свободнорадикальных процессов в гомогенатах печени на 30 сутки после внутривенного введения вакцины БЦЖ показал выраженное увеличение интенсивности люминол-зависимой ХЛ (отражающей стационарную концентрацию H₂O₂) относительно величины соответствующего показателя в контроле (в 8,6 раза, $p = 0,025$), также значимо выше соответствующей контрольной величины была интенсивность индуцированной перекисью водорода люминол-зависимой ХЛ (рис. 2). В группе животных, получавших с питьевой водой ТС-13, в обоих случаях интенсивности люминол-зависимой ХЛ не отличались от значений контрольной группы и были значимо ниже значений группы «БЦЖ».

Таблица

Структурные изменения и клеточный состав гранулем в печени мышей через 30 дней после индукции гранулематоза внутривенным введением вакцины, Me (Q_1-Q_3)

Параметр исследования	Группа «БЦЖ»	Группа + «БЦЖ + ТС-13»
Численная плотность БЦЖ-гранулем (N_{ai}), в $3,64 \times 10^5$ мкм ²	0,86 (0,82–0,88)	0,34 (0,28–0,36) #
Диаметр БЦЖ-гранулем, мкм	71,90 (69,49–74,25)	51,63 (45,86–52,44) #
Макрофаги, %	55,90 (52,47–57,96)	56,17 (53,84–60,50)
Эпителиоидные клетки, %	14,61 (12,70–16,23)	10,26 (9,31–12,93) #
Лимфоциты, %	27,03 (23,75–31,05)	30,65 (23,05–34,88)
Нейтрофилы, %	1,45 (0,00–2,35)	0,00 (0,00–1,00) #
Фибробласты, %	2,17 (0,90–2,74)	2,07 (1,19–2,84)

Примечание. Здесь и на рис. 3 # – отличие от величины соответствующего параметра группы «БЦЖ» статистически значимо при $p < 0,05$.

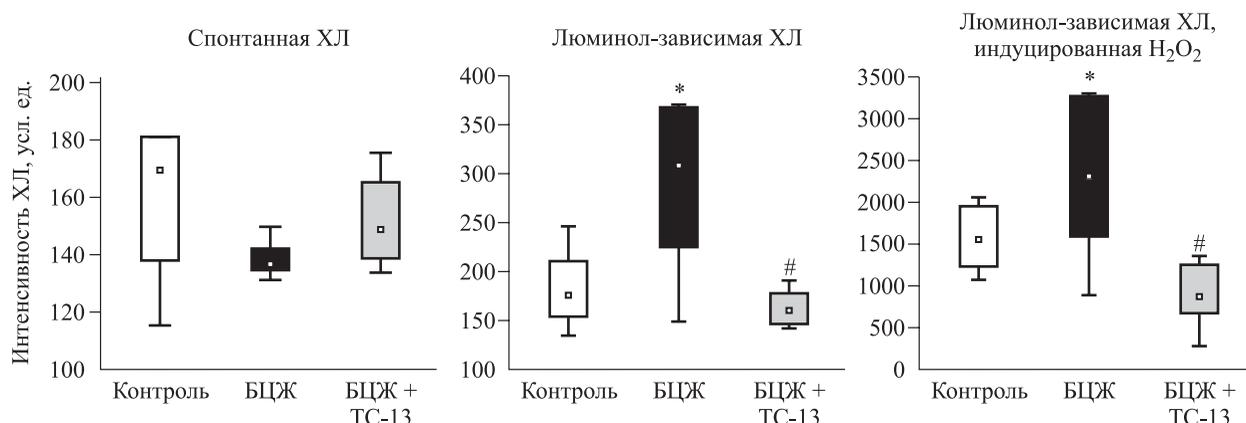


Рис. 2. Интенсивность ХЛ гомогенатов печени мышей через 30 дней после индукции гранулематоза внутривенным введением вакцины БЦЖ. Здесь и на рис. 3 обозначены медианы (квадратики), верхние и нижние квартили (прямоугольники), диапазоны без выбросов («усы»). Отмечены величины параметров, статистически значимо ($p < 0,05$) отличающиеся от величин соответствующих показателей групп «Контроль» (*) и «БЦЖ» (#)

Наблюдалась прямая корреляционная взаимосвязь между выраженностью гранулемообразования и интенсивностью свободнорадикальных окислительных процессов в печени: коэффициенты корреляции между численной плотностью и диаметром гранулем, с одной стороны, и люминол-зависимой ХЛ, с другой, составили соответственно 0,59 ($p = 0,012$) и 0,73 ($p = 0,001$), диаметром гранулем и люминол-зависимой H₂O₂-индуцированной ХЛ – 0,46 ($p = 0,002$). Это свидетельствует о том, что свободнорадикальные процессы с участием АКМ важны для формирования БЦЖ-индуцированных гранулем в печени, и о справедливости высказанного нами ранее предположения о возрастании в них стационарной концентрации пероксида водорода [14]. Так, в работе [8] также показано, что формирование индуцированной *Schistosoma mansoni* гранулемы в печени мышей сопровождается постепенным повышением генерации в ней H₂O₂. Посредством активации ферментов антиоксидантной защиты ТС-13 снижает продукцию АКМ и, как следствие, уменьшается численная плотность и диаметр формирующихся гранулем. Анализ клеточного состава гранулем (см. таблицу) выявляет значительное снижение содержания в них нейтрофилов, которые являются главным деструктивным фактором любого воспалительного процесса, в том числе и гранулематозного [3]. Выявленный факт позволяет утверждать, что редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE может служить эффективной фармакологической мишенью при терапии туберкулеза, поскольку формирование стабильной гранулемы является важнейшим фактором сдерживания инфекции в латентной форме.

При исследовании активности свободнорадикальных процессов в перитонеальном экссудате установлено, что через 30 суток после внутривенного введения микобактерий у мышей не изменена ни спонтанная, ни стимулированная РМА генерация АКМ гранулоцитами (рис. 3). В то же время если конститутивная продукция АКМ перитонеальными фагоцитами мышей, получавших ТС-13 после индукции гранулематозного воспаления, также не отличалась от значений групп «контроль» и «БЦЖ», то интенсивность дыхательного «взрыва» при стимуляции РМА была значимо выше, чем величина соответствующего показателя животных группы «БЦЖ».

Таким образом, в отличие от спонтанно протекающего БЦЖ-гранулематоза, при котором уменьшение масштаба генерализованного воспа-

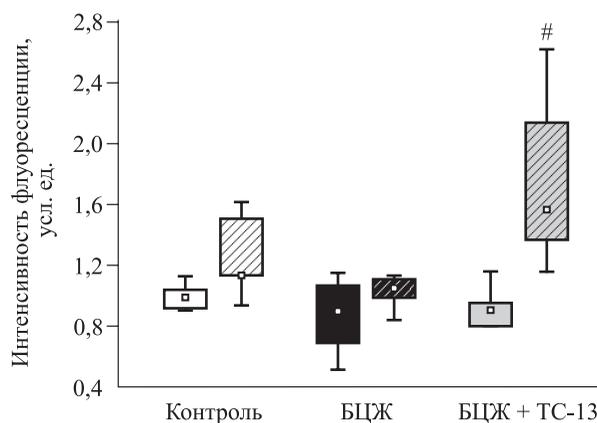


Рис. 3. Продукции АКМ клетками перитонеального экссудата мышей через 30 дней после индукции гранулематоза внутривенным введением вакцины БЦЖ (сплошная заливка – спонтанная, штриховка – стимулированная РМА)

ления предшествовало разрешению локального воспаления (активации процессов «диссоциации» и фиброзирования гранулем) [14], назначение ТС-13, напротив, способствовало угнетению гранулемогенеза, но увеличивало продукцию АКМ перитонеальными фагоцитами, т. е. на системном уровне. При этом выраженность дыхательного «взрыва» фагоцитов перитонеального экссудата находилась в обратной зависимости от количества и размеров гранулем (соответственно $r_S = -0,70$, $p = 0,003$; $r_S = -0,64$, $p = 0,007$), а также интенсивности свободнорадикальных процессов в печени ($r_S = -0,59$, $p = 0,006$ для люминол-зависимой ХЛ, $r_S = -0,62$, $p = 0,004$). Это показывает, что локальный воспалительный процесс в печени активирует всю систему мононуклеарных фагоцитов и индуцирует системный воспалительный процесс. Поэтому при воздействиях на сигнальные системы необходимо учитывать системный воспалительный ответ. Сегодня данный факт подтвержден множеством исследований, ярким примером которых служит широкое применение ингибиторов фактора некроза опухолей при лечении ревматоидных заболеваний, что повлекло за собой 3–7-кратное увеличение заболеваемости туберкулезом [5, 19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование влияния индуктора редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE ТС-13 на активность свободнорадикальных окислительных процессов при БЦЖ-индуцированном гранулемогенезе выявило, что назначение ТС-13 сопровождается угнетением продукции АКМ, снижением численной плотности и диаметра гранулем в печени, но усилением генерации фагоцитами перитонеального экссудата через 30 дней после инфицирования мышей линии BALB/c вакциной БЦЖ. Полученные данные свидетельствуют об участии системы Keap1/Nrf2/ARE в гранулемогенезе и дихотомии реакции на него организма.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-00551а) с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О.* Редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE как фармакологическая мишень // Биохимия. 2013. 78. (1). 27–47.
2. *Лямина С.В., Круглов С.В., Веденикин Т.Ю. и др.* Альтернативное репрограммирование M1/M2-фенотипа перитонеальных макрофагов мышей *in vitro* с помощью интерферона- γ и интерлейкина-4 // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. (4). 235–239.
3. *Маянский Д.Н.* Хроническое воспаление. М.: Медицина, 1991. 272 с.
4. *Просенко А.Е., Клепикова С.Ю., Кандалинцева Н.В. и др.* Синтез и исследование антиоксидантных свойств новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Бюл. СО РАМН. 2001. (1). 114–126.
5. *Сигидин Я.А., Лукина Г.В.* Риск развития туберкулеза при использовании ингибиторов фактора некроза опухоли-альфа // Рус. мед. журн. 2009. (21). 1438–1442.
6. *Скрягина Е.М., Гуревич Г.Л., Астровко А.П. и др.* Эффективные пути решения проблемы туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в республике Беларусь // Туберкулез и болезни легких. 2014. 91. (3). 18–23.
7. *Суханов Д.С.* Иммунотропная терапия туберкулезной инфекции // Терапевт. арх. 2013. (3). 110–117.
8. *Abdallahi O.M., Hanna S., De Reggi M., Gharib B.* Visualization of oxygen radical production in mouse liver in response to infection with *Schistosoma mansoni* // Liver. 1999. 19. 495–500.
9. *Deffert C., Schappi M.G., Pache J.C. et al.* Bacillus Calmette-Guerin infection in NADPH oxidase deficiency: defective mycobacterial sequestration and granuloma formation // PLoS Pathog. 2014. 10. e1004325.
10. *Fallahi-Sichani M., Kirschner D.E., Linderman J.J.* NF- κ B signaling dynamics play a key role in infection control in tuberculosis // Front. Physiol. 2012. 3. ID 170.
11. *Galvan-Pena S., O'Neill L.A.* Metabolic reprogramming in macrophage polarization // Front. Immunol. 2014. 5. ID 420.
12. *Kovac S., Angelova P.R., Holmstrom K.M. et al.* Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase // Biochim. Biophys. Acta. 2015. 1850. 794–901.
13. *Menshchikova E., Tkachev V., Lemza A. et al.* Water-soluble phenol TS-13 combats acute but not chronic inflammation // Inflamm. Res. 2014. 63. 729–740.
14. *Menshchikova E., Zenkov N., Tkachev V. et al.* Oxidative stress and free-radical oxidation in BCG granulomatous development // Oxid. Med. Cell Longev. 2013. 2013. ID 452546.
15. *Murray P.J., Wynn T.A.* Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // Nat. Rev. Immunol. 2011. 11. 723–737.
16. *Nicolle D., Fremont C., Pichon X. et al.* Long-term control of *Mycobacterium bovis* BCG infection in

the absence of Toll-like receptors (TLRs): investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4-deficient mice // *Infect. Immun.* 2004. 72. 6994–7004.

17. *Stefanson A.L., Bakovic M.* Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals // *Nutrients.* 2014. 6. 3777–3801.

18. *Tugal D., Liao X., Jain M.K.* Transcriptional control of macrophage polarization // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013. 33. 1135–1144.

19. *Winthrop K.L., Iseman M.* Bedfellows: mycobacteria and rheumatoid arthritis in the era of biologic therapy // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2013. 9. 524–531.

20. *Zuniga J., Torres-Garcia D., Santos-Mendoza T. et al.* Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis // *Clin. Dev. Immunol.* 2012. 2012. 193923.

THE INVOLVEMENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND REDOX-SENSITIVE SIGNALING SYSTEM KEAP1/NRF2/ARE IN THE DEVELOPMENT OF GRANULOMATOUS INFLAMMATION

Elena Bronislavovna MENSCHHIKOVA¹, Nikolay Konstantinovich ZENKOV¹, Anton Vladimirovich CHECHUSHKOV¹, Petr Mikhaylovich KOZHIN¹, Liliya Aleksandrovna CHERDANTSEVA¹, Tat'yana Vladimirovna SHARKOVA¹, Oksana Valentinovna POTAPOVA¹, Gennadiy Yur'evich LYUBIMOV², Galina Alekseevna LYUBIMOVA², Semen Evgen'evich YAGUNOV³

¹ *Research Institute of Experimental and Clinical Medicine 630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

² *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology 630099, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14*

³ *Novosibirsk State Pedagogical University 630126, Novosibirsk, Viluyskaya str., 28*

The effect of phenolic antioxidant 3-(3'-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl) propylthiosulphonate sodium (TS-13), which is an activator of redox-sensitive system Keap1/Nrf2/ARE, is investigated in the model of BCG vaccine intravenous injection. Granulomas of presumably macrophagic type were formed in liver of BALB/c mice at day 30 after infection, activity of free-radical oxidation processes in liver enhanced too and directly correlated with the granuloma numerical density and diameter. Activity of free-radical oxidation processes as well as granuloma formation significantly decreased in animals which received TS-13 (100 mg/kg body weight) in drinking water, whereas generation of reactive oxygen species by peritoneal exudate phagocyte increased. The data indicate the involvement of Keap1/Nrf2/ARE system in granulomogenesis and the dichotomy of the body reaction to it.

Key words: granulomatous inflammation, macrophage, reactive oxygen species, Keap1/Nrf2/ARE system, TS-13.

Menschchikova E.B. – doctor of medical sciences, head of the laboratory, e-mail: lemen@centercem.ru

Zenkov N.K. – doctor of biological sciences, leading researcher, e-mail: lemen@centercem.ru

Chechushkov A.V. – researcher, e-mail: achechushkov@gmail.com

Kozhin P.M. – researcher, e-mail: kozhinpm@gmail.com

Cherdantseva L.A. – candidate of medical sciences, leading researcher, e-mail: cherdanceff@yandex.ru

Sharkova T.V. – candidate of biological sciences, leading researcher, e-mail: tasharkova@yandex.ru

Potapova O.V. – doctor of medical sciences, head of the laboratory, e-mail: potapova@centercem.ru

Lyubimov G.Yu. – candidate of medical sciences, researcher, e-mail: glubimov@rambler.ru

Lyubimova G.A. – technician, e-mail: glubimov@rambler.ru

Yagunov S.E. – postgraduate student, e-mail: semenyagunov@gmail.com

СВЯЗЬ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ С ГЛИКИРОВАНИЕМ ГЕМОГЛОБИНА И ОБРАЗОВАНИЕМ МИКРОВЕЗИКУЛ

Григорий Яковлевич ЛЕВИН, Екатерина Геннадьевна СУХАРЕВА

ФГБУ Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр Минздрава России
603155, г. Нижний Новгород, Верхневолжская наб., 18/1

Цель исследования – изучение зависимости степени гликирования Hb и выраженности эритроцитарной микровезикуляции от изменения деформируемости эритроцитов. Материал и методы. Эритроциты хранили при +4 °C в течение 28 суток. Использовали методы ультрацентрифугирования, определения содержания гликированного гемоглобина HbA_{1c} и деформируемости эритроцитов. Результаты и их обсуждение. В процессе консервации эритроцитов содержание в них, в их мембранах и микровезикулах HbA_{1c} увеличивается. Выявлена корреляционная зависимость между степенью возрастания HbA_{1c}, микровезикуляцией и снижением деформируемости эритроцитов.

Ключевые слова: гликированный гемоглобин HbA_{1c}, деформируемость эритроцитов, эритроцитарные микровезикулы, консервация эритроцитов.

Гемоглобин (Hb) не только играет решающую роль в газообмене, но в значительной степени определяет также деформируемость эритроцитов, а значит, и микроциркуляцию. Нормальные эритроциты способны значительно деформироваться при прохождении через капилляры, не меняя при этом своего объема и площади поверхности, что поддерживает процессы диффузии газов на высоком уровне на протяжении всего микроциркуляторного русла различных органов [1]. Деформируемость эритроцитов обусловлена такими факторами, как внутренняя вязкость (концентрация внутриклеточного Hb), клеточная геометрия, эластические и вязкостные свойства мембраны, которые также в определенной степени связаны с наличием в ней Hb, особенно его гликированной формы. Известно, что в процессе старения эритроцита содержание в нем Hb изменяется, при этом концентрация HbA_{1c} нарастает [7]. Однако содержание HbA_{1c}, особенно внутримембранного, и связь его с деформируемостью эритроцитов в процессе консервации остается малоизученной.

В процессе старения эритроциты теряют часть мембраны за счет образования микровезикул (МВ). Ключевым событием в данном процессе является ослабление взаимодействия между цитоскелетом и плазматической мембраной [11]. Центральную роль в этом играет повышение

концентрации внутриклеточного Ca²⁺ с последующим ингибированием флиппазы, поддерживающей асимметрию липидов, активацией скрамблазы, ответственной за обмен липидов между внутренней и внешней сторонами мембраны [4]. Образование МВ, которое приводит к потере части мембраны, может являться, по-видимому, одной из причин ухудшения деформируемости эритроцитов при их консервации. Показано, что при хранении эритроцит теряет до 30 % своего объема и до 20 % Hb [3]. Известно, что *in vivo* МВ удаляются печенью, мышечной тканью, селезенкой, почками [13], однако при консервации эритроцитов, в условиях *in vitro*, МВ могут накапливаться и играть определенную роль в посттрансфузионных реакциях. Способствовать этим процессам может гликирование Hb, увеличение концентрации HbA_{1c}, особенно в мембранах эритроцитов, а также, что взаимосвязано, снижение деформируемости эритроцитов и изменение их морфологии. Эти вопросы остаются практически не изученными.

Целью настоящего исследования являлось изучение зависимости степени гликирования Hb, как внутриклеточного, так и внеклеточного, и выраженности эритроцитарной микровезикуляции в процессе консервации от изменения деформируемости эритроцитов.

Левин Г.Я. – д.м.н., проф., заслуженный деятель науки РФ, руководитель отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: levin@unn.ac.ru

Сухарева Е.Г. – младший научный сотрудник отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: ekaterina.syhareva@gmail.com

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Источником МВ являлись эритроциты, выделенные из крови 40 здоровых доноров следующим образом. Кровь заготавливали в растворе гемоконсерванта ЦФДА-1 (Green Cross Medical Corp., Республика Корея) в соотношении 4:1, центрифугировали в течение 7 минут при 300 g, удаляли обогащенную тромбоцитами плазму, оставшуюся кровь центрифугировали в течение 20 минут при 2500 g, отбирали оставшуюся плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку. Эритроцитарную массу делили на 2 части. В первую часть (неотмытые эритроциты) добавляли гемоконсервант в соотношении 4:1 и хранили при +4 °С в течение 7, 14, 21 и 28 суток. Вторую часть эритроцитарной массы трижды отмывали физиологическим раствором (центрифугировали при 2585 g в течение 20 минут). Затем в нее также добавляли гемоконсервант (4:1) и хранили в тех же условиях (отмытые эритроциты).

На 7, 14, 21, 28 сутки хранения выделяли эритроцитарные МВ. Для этого к эритроцитам добавляли 1 мл трис-НСl буфера (рН 7,4) и центрифугировали при 2585 g в течение 20 минут. Надосадочную жидкость очищали от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 15 минут при 5000 g [8]. МВ осаждали с помощью ультрацентрифугирования на центрифуге Sorvall MX 150 Micro-Ultracentrifuge (Thermo Scientific, США) при 100000 g в течение 60 минут [6], осадок растворяли в Гемолитике («ЭЛТА», Россия).

На 7, 14, 21, 28 сутки хранения из эритроцитов также выделяли их мембраны следующим образом. 0,5 мл эритроцитов лизировали в 1,5 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 21380 g в течение 20 минут. Затем надосадочную жидкость удаляли, вновь добавляли 1,5 мл дистиллированной воды, в ней ресуспендировали осадок и центрифугировали при тех же параметрах. Отмывание мембран от Hb таким образом повторяли 9 раз, пока надосадочная жидкость не становилась прозрачной.

Количество HbA_{1c} в эритроцитах, их мембранах и МВ определяли с помощью набора «Гликогемотест» («ЭЛТА», Россия) согласно инструкции, содержание Hb – гемихромным методом: 0,02 мл эритроцитарной массы, мембран или МВ растворяли в 5 мл 0,06%-го раствора додецилсульфата Na, через 20 минут после полного растворения регистрировали оптическую плотность при $\lambda = 540$ нм на спектрофотометре Spekol UV VIS (Zeiss, Германия).

Деформируемость эритроцитов определяли с помощью ригидометра [2]. Принцип его работы

заключается в следующем: суспензию эритроцитов помещают между двумя коаксиальными цилиндрами, создается ламинарный поток, в котором клетки деформируются (вытягиваются), и фиксируют в этом положении с помощью 0,8%-го раствора глутаральдегида. В поле зрения светового микроскопа подсчитывали количество деформированных (вытянутых) и недеформированных эритроцитов, степень их деформируемости выражали в процентах от общего числа подсчитанных клеток.

Морфологию эритроцитов определяли на микроскопе Primo Star (Carl Zeiss, Германия). В поле зрения подсчитывали 100 клеток в 3 параллельных пробах, изменение формы эритроцитов (количество дискоцитов, эхиноцитов, стоматоцитов, сфероцитов) в процессе хранения выражали в процентах от общего числа подсчитанных клеток.

Результаты исследований обработаны с использованием методов непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали содержание HbA_{1c} в г/л и в процентах (по отношению к общему содержанию Hb) при консервации эритроцитов в течение 28 суток при 4 °С как в самих красных клетках крови, так и в их мембранах, а также в выделенных из них МВ.

Установлено, что соотношение концентраций HbA_{1c} и общего Hb в эритроцитах значительно изменяется в процессе консервации. К 7 суткам хранения содержание HbA_{1c} по отношению к общему Hb увеличивалось как в неотмытых, так и в отмытых эритроцитах (табл. 1). Количество HbA_{1c}, выраженное в г/л, возрастает в процессе консервации эритроцитов в еще большей степени, причем разница в степени возрастания в отмытых и неотмытых эритроцитах еще более значительна (см. табл. 1).

В процессе консервации эритроцитов содержание в их мембранах HbA_{1c} также нарастает (как в процентах от общего Hb, так и в г/л) по сравнению с мембранами свежесыведенных клеток. Увеличение концентрации HbA_{1c} в мембранах неотмытых эритроцитов происходит в большей степени, чем в мембранах отмытых эритроцитов (табл. 2). Установлено, что степень нарастания содержания HbA_{1c} в процессе консервации в мембранах эритроцитов выше, чем в самих эритроцитах.

Таблица 1

Содержание Hb и HbA_{1c} в эритроцитах при их консервации

Время консервации, сут	Отмытые			Неотмытые		
	HbA _{1c} , %	Hb, г/л	HbA _{1c} , г/л	HbA _{1c} , %	Hb, г/л	HbA _{1c} , г/л
Контроль	6,33 ± 0,18	182 ± 7,3	11,5 ± 0,76	6,33 ± 0,15	182 ± 2,3	11,5 ± 0,22
1	6,88 ± 0,21*	221 ± 6,7*	15,2 ± 0,92*	6,74 ± 0,12*	186 ± 3,1	12,5 ± 0,27*
7	7,66 ± 0,24*	264 ± 3,2*	20,2 ± 0,88*	7,23 ± 0,23*	194 ± 4,4*	14,0 ± 0,78*
14	8,31 ± 0,12*	285 ± 5,4*	23,7 ± 1,11*	8,54 ± 0,14*	214 ± 6,5*	18,3 ± 0,49*
21	10,16 ± 0,54*	310 ± 5,3*	31,5 ± 2,04*	9,87 ± 0,30*	239 ± 2,1*	23,6 ± 0,37*
28	12,72 ± 0,63*	339 ± 7,5*	43,1 ± 2,48*	10,61 ± 0,04*	249 ± 4,3*	26,4 ± 0,54*

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

Таблица 2

Содержание Hb и HbA_{1c} в мембранах эритроцитов при их консервации

Время консервации, сут	Отмытые			Неотмытые		
	HbA _{1c} , %	Hb, г/л	HbA _{1c} , г/л	HbA _{1c} , %	Hb, г/л	HbA _{1c} , г/л
Контроль	6,15 ± 0,14	6 ± 0,3	0,37 ± 0,02	6,15 ± 0,10	6 ± 0,6	0,37 ± 0,05
1	6,99 ± 0,05*	8 ± 0,4	0,56 ± 0,05*	6,12 ± 0,07	13 ± 0,5*	0,80 ± 0,04*
7	7,10 ± 0,04*	12 ± 0,5*	0,85 ± 0,04*	6,55 ± 0,16*	16 ± 0,7*	1,03 ± 0,06*
14	7,92 ± 0,20*	14,0 ± 0,3*	1,13 ± 0,02*	6,90 ± 0,08*	19 ± 0,1*	1,31 ± 0,02*
21	8,84 ± 0,43*	21 ± 0,7*	1,84 ± 0,10*	8,00 ± 0,06*	22 ± 0,5*	1,73 ± 0,04*
28	9,97 ± 0,23*	23 ± 0,5*	2,29 ± 0,09*	11,16 ± 0,21*	26 ± 0,7*	2,94 ± 0,18*

Таблица 3

Содержание Hb и HbA_{1c} в МВ эритроцитов при их консервации

Время консервации, сут	Отмытые			Неотмытые		
	HbA _{1c} , %	Hb, г/л	HbA _{1c} , г/л	HbA _{1c} , %	Hb, г/л	HbA _{1c} , г/л
1	4,13 ± 0,26	3 ± 0,4	0,12 ± 0,05	4,04 ± 0,21	3 ± 0,2	0,12 ± 0,02
7	7,49 ± 0,19*	6 ± 0,5*	0,45 ± 0,04*	5,20 ± 0,19*	3 ± 0,3	0,18 ± 0,03*
14	7,85 ± 0,10*	8 ± 0,2*	0,60 ± 0,03*	7,08 ± 0,17*	5 ± 0,5*	0,35 ± 0,03*
21	10,23 ± 0,37*	11 ± 0,1*	1,12 ± 0,02*	8,93 ± 0,30*	7 ± 0,3*	0,62 ± 0,02*
28	10,20 ± 0,09*	12 ± 0,3*	1,26 ± 0,04*	9,86 ± 0,28*	8 ± 0,2*	0,78 ± 0,02*

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя на 1 сутки хранения статистически значимо при $p < 0,05$.

При изучении содержания HbA_{1c} в МВ, выделенных из эритроцитов в процессе их консервации, установлено, что она приближается к концентрации HbA_{1c} в мембранах эритроцитов (табл. 3), повышаясь по мере увеличения длительности консервации эритроцитов. Однако степень нарастания более выражена в МВ, выделенных из отмытых эритроцитов (см. табл. 3).

В связи с важной ролью Hb, а особенно HbA_{1c}, в деформируемости эритроцитов мы исследовали ее динамику в процессе консервации отмытых и неотмытых эритроцитов. Как показа-

ли проведенные исследования, деформируемость эритроцитов снижается уже к 7 суткам консервации, причем более значительно у предварительно отмытых красных клеток крови (на 30,4 % относительно контроля, $p < 0,05$). Это значение достигается у предварительно неотмытых эритроцитов лишь к 21 суткам ($p < 0,05$). В процессе консервации эритроцитов их деформируемость продолжает ухудшаться, а к 28 суткам она практически сравнивается у неотмытых и отмытых (в обеих пробах содержание деформированных клеток составляет в среднем 31 %).

Вопрос о роли увеличения концентрации внутримембранного Hb, прежде всего HbA_{1c}, в снижении взаимодействия между цитоскелетом и плазматической мембраной и образованием МВ остается малоизученным. Особенно важной становится эта проблема при консервации эритроцитов, при которой, как показано нами, происходит значительное увеличение везикуляции. Нами установлено, что количество МВ, выделенных из отмытых и неотмытых эритроцитов на 7 сутки консервации, соответственно в 2,7 и 2,0 раза больше, чем на первые сутки. В наших исследованиях показано, что в процессе консервации эритроцитов в них увеличивается концентрация HbA_{1c}, причем в большей степени в предварительно отмытых эритроцитах. Можно полагать, что это связано с повреждением эритроцитов при их многократном отмывании, а значит – с более ранними и более выраженными изменениями, происходящими в процессе консервации.

В мембранах неотмытых эритроцитов количество HbA_{1c} увеличивается в меньшей степени, чем в мембранах отмытых эритроцитов. Это могло быть связано со следующим. Образование МВ, по данным ряда авторов, представляет собой защитный механизм для удаления молекул, связанных с участками мембраны эритроцита, в том числе и измененного Hb и его токсических производных, что позволяет задерживать несвоевременное удаление здоровых эритроцитов из кровотока. Это приводит к продлению жизни эритроцитов *in vivo* [12]. Процесс везикуляции значительно сильнее в отмытых эритроцитах, при этом в большей степени удаляется из эритроцитов и переходит в МВ связанный с мембранами HbA_{1c}. Количество HbA_{1c} в МВ, выделенных из эритроцитов в процессе их консервации, постоянно нарастает. Однако принципиальной разницы в содержании HbA_{1c} (по отношению к общему Hb или выраженном в г/л) в МВ, выделенных из отмытых и неотмытых эритроцитов, не обнаружено. Связано это, прежде всего, с разницей в их концентрации. Количество МВ, выделенных из отмытых эритроцитов, в 1,3 раза превышает их количество из неотмытых эритроцитов на 7 сутки консервации и в 1,5 раза – на 28 суток консервации. При пересчете концентрации HbA_{1c} на равное число МВ оказывается, что она значительно больше в МВ, выделенных из отмытых эритроцитов.

Разница в степени увеличения концентрации HbA_{1c} в эритроцитах и в их мембранах, выраженной в г/л и в процентах по отношению к общему Hb, объясняется следующим. В процессе консервации размер эритроцитов существенно умень-

шается, к 28 суткам число сфероцитов достигает 27 %, следовательно, при центрифугировании суспензии эритроцитов осаждается большее число консервированных эритроцитов по сравнению со свежевыделенными. Поэтому увеличение концентрации HbA_{1c} в эритроцитах и их мембранах в процессе консервации, выраженное в г/л, происходит в большей степени, чем выраженное в процентах по отношению к общему Hb.

При исследовании динамики деформируемости эритроцитов в процессе их консервации установлено ее прогрессивное и значительное снижение, причем более выраженное в предварительно отмытых и хранящихся в консерванте эритроцитах. Одной из причин этой разницы является, по-видимому, нарушение структуры мембран эритроцитов, связанное с более значительным образованием МВ в отмытых эритроцитах, что указывалось ранее. В условиях банка крови на первый план в изменении деформируемости выступает уменьшение объема эритроцитов, связанное с потерей части мембраны на образование МВ.

При исследовании изменения морфологии эритроцитов установлено следующее. В процессе консервации прогрессивно уменьшается количество дискоцитов, нарастает число сфероцитов, эхиноцитов и в меньшей степени стоматоцитов. Уже в первую неделю консервации развивается выраженный анизоцитоз. При небольших сроках консервации диск-сферическая трансформация эритроцитов значительно более выражена в отмытых красных клетках крови ($p < 0,05$, в сравнении с контролем). В поздние сроки (к 21 суткам хранения) морфология отмытых и неотмытых эритроцитов практически сравнивается ($p < 0,05$, при сравнении процента содержания дискоцитов, эхиноцитов, стоматоцитов и сфероцитов в отмытой и неотмытой пробах).

Известно, что деформируемость эритроцитов зависит от сложного взаимодействия клеточного объема, площади поверхности, внутриклеточной вязкости и вязкоэластических свойств мембраны [5, 9]. Ухудшение деформируемости эритроцитов в процессе консервации происходит параллельно с нарастанием количества МВ, а также с увеличением гликирования Hb как в самих эритроцитах, так и в их мембранах. Показано, что существенным фактором ухудшения деформируемости эритроцитов при сахарном диабете является значительное увеличение внутриэритроцитарной вязкости, связанное с изменением свойств Hb вследствие его гликирования [10]. Такой же процесс происходит и при консервации эритроцитов. Не менее важную роль в снижении деформиру-

емости эритроцитов играет повышение содержания HbA_{1c} в мембранах эритроцитов при их консервации, что обуславливает ухудшение их вязкоэластических свойств. Нами установлена высокая корреляционная взаимосвязь между изменением деформируемости эритроцитов, количеством МВ и содержанием HbA_{1c} как в самих эритроцитах, так и в их мембранах. В процессе консервации красных клеток крови наибольшая корреляция выявлена между динамикой деформируемости эритроцитов в процессе консервации и содержанием HbA_{1c} как в самих эритроцитах, так и в мембранах отмытых эритроцитов – $r_s = -0,95$ ($p < 0,05$). Коэффициент корреляции между этими показателями в неотмытых эритроцитах был чуть меньше $r_s = -0,87$ ($p < 0,05$). Кроме того, обнаружена тесная корреляционная зависимость между числом МВ и динамикой деформируемости эритроцитов в процессе консервации, $r_s = -0,93$ ($p < 0,05$). Таким образом, доказана четкая взаимосвязь между гликированием Hb в процессе консервации эритроцитов, ухудшением деформируемости красных клеток крови и образованием эритроцитарных МВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе консервации эритроцитов содержание в них и в их мембранах HbA_{1c} прогрессивно увеличивается, причем в большей степени в предварительно отмытых красных клетках крови. Это является одной из важных причин повышения количества выделяющихся из эритроцитов МВ и нарастания концентрации в них HbA_{1c}. При консервации эритроцитов значительно снижается деформируемость эритроцитов, причем в большей степени при их предварительном отмывании. Выявлена тесная корреляционная зависимость между степенью снижения деформируемости эритроцитов в процессе их консервации и степенью возрастания в них HbA_{1c}. Резкое снижение деформируемости эритроцитов при их консервации обусловлено не только ухудшением вязкоэластических свойств их мембраны, но также повышением внутриклеточной вязкости и нарушением геометрии красных клеток крови. Можно заключить, что гликирование Hb и увеличение его содержания, прежде всего в мембранах эритроцитов, является важной причиной возрастания микровезикуляции и снижения деформируемости эритроцитов в процессе их консервации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты // Успехи физиол. наук. 2001. 32. (3). 66–78.
2. А.с. № 1363065. Россия. Устройство для деформации эритроцитов в сдвиговом потоке / Г.Я. Левин, В.Г. Яхно, Н.Н. Царевский, Н.П. Котяева; опубл. 30.12.87.
3. Bosch F.H., Were J.M., Roerdinkholder-Stoelwinder B. et al. Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counter flow centrifugation and Percoll separation // Blood. 1992. 79. 254–260.
4. Cerella C., Diederich M., Ghibelli L. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival // Int. J. Cell Biol. 2010. 2010. doi: 10.1155/2010/546163.
5. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow // Ann. Rev. Physiol. 1987. 49. 177–192.
6. Chung S.-M., Bae O.-N., Lim K.-M. et al. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007. 27. S414–S421.
7. Cohen R.M., Franco R.S., Khera P.K. et al. Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA_{1c} // Blood. 2008. 112. (10). 4284–4291.
8. Dey-Hazra E., Hartel B., Kirsch T. et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing // Vasc. Health Risk Manag. 2010. 6. 1125–1133.
9. Mohandas N., Chasis J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids // Semin. Hematol. 1993. 30. 171–192.
10. Sorette M.R., Lavenant M.G., Clark M.R. Ektacytometric measurement of sickle cell deformability as a continuous function of oxygen tension // Blood. 1987. 69. (1). 316–323.
11. Tissot J.-D., Rubin O., Canellini G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells // Cur. Opin. Hematol. 2010. 17. 571–577.
12. Willekens F.L.A., Werre J.M., Groenen-Döpp Y.A.M. et al. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? // Br. J. Haematol. 2008. 141. 549–556.
13. Willekens F.L.A., Werre J.M., Kruijt J.K. et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors // Blood. 2005. 105. 2141–2145.

RELATIONSHIP BETWEEN ERYTHROCYTE DEFORMABILITY WITH GLYCATION OF HEMOGLOBIN AND THE FORMATION OF MICROVESICLES

Grigory Yakovlevich LEVIN, Ekaterina Gennad'evna SUKHAREVA

*Privolzhsky Federal Research Medical Centre of Minzdrav of Russia
603155, Nizhny Novgorod, Verhne-Volzhsкая nab., 18/1*

Purpose of the research: to study the level of dependence of hemoglobin glycation and erythrocyte microvesiculation severity on changes in erythrocytes. Materials and Methods: erythrocytes were stored at 4 °C for 28 days. The methods of ultracentrifugation, determination of HbA_{1c} and deformability of erythrocytes have been used.. Results: The content of HbA_{1c} in the erythrocyte, in their membranes and in the micro vesicles has been increased in the process of erythrocytes conservation. The correlation between the degree of increase of HbA_{1c}, microvesiculation and decrease of erythrocyte deformability has been revealed.

Key words: glycated hemoglobin, erythrocyte deformability, erythrocyte micro vesicles, conservation of erythrocytes.

Levin G. Ya. – doctor of medical sciences, professor, honored worker of science, head of department of gravitation surgery and hemodialysis

Sukhareva E. G. – junior researcher of department of gravitation surgery and hemodialysis

СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА У КРЫС ПРИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

Владимир Юрьевич НИКОЛАЕВ^{1,2}, Игорь Ильич ШАХМАТОВ^{1,2},
Валерий Иванович КИСЕЛЕВ^{1,2}, Светлана Валерьевна МОСКАЛЕНКО¹

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

² ФГБНУ НИИ физиологии и фундаментальной медицины (НИИФФМ)
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Цель исследования – провести анализ состояния реакции системы гемостаза у крыс на протяжении длительного гипертермического воздействия. Материал и методы. В работе использовались крысы-самцы (120 особей) линии Вистар. Гипертермия моделировалась помещением животных на определенное время в тепловую камеру (термостат) с температурой воздуха внутри +45 °С. Результаты и их обсуждение. Установлено, что эффект долговременной адаптации системы гемостаза происходит лишь по истечении 30 суток ежедневного гипертермического воздействия. Экспериментальное воздействие на седьмой день сопровождается повышением активности тромбоцитарного и плазменного гемостаза и антикоагулянтной системы, а также угнетением фибринолитической системы крови. По истечении 30 дней отмечается снижение активности тромбоцитарного и плазменного гемостаза, активность антикоагулянтной системы крови нормализуется, а фибринолитической – увеличивается.

Ключевые слова: гемостаз, общее перегревание, хронический эксперимент, адаптация.

Система крови играет существенную роль в формировании адаптивного ответа при действии на организм различных по своей природе чрезвычайных факторов [3]. Ранее установлено, что в зависимости от интенсивности и длительности стрессорных воздействий реакция со стороны системы крови и, в частности, системы гемостаза, определяющей ее реологические характеристики, может быть как адаптивной, так и дизадаптивной [8].

Высокая температура окружающей среды является неблагоприятным физическим фактором, который действует на организм человека как в естественных условиях, так и в обстановке специфического производства, приводя к нарушению функционирования различных органов и систем [4, 9]. Кроме того, гипертермия рассматривается учеными как один из перспективных методов профилактики и лечения онкологических [10, 11, 12], инфекционных, вирусных [2, 6] и других заболеваний.

Известно, что функционирование организма в экстремальных гипертермических условиях со-

провождается развитием общего адаптационного синдрома [2, 6], что проявляется в восстановлении температуры тела, «температурной топографии» и массы тела экспериментальных животных [7]. В то же время в литературе отсутствует описание состояния системы гемостаза при длительном воздействии гипертермии на организм, характеризующее статус системы в рамках долговременной адаптации.

Таким образом, целью работы явилось изучение адаптивной реакции системы гемостаза у крыс после воздействия многократного гипертермического воздействия в хроническом эксперименте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 120 белых половозрелых крысах-самцах линии Wistar средней массой $231,0 \pm 14,5$ г, разделенных на 8 групп по 15 крыс (4 опытные и 4 контрольные). Подопытные и контрольные животные до эксперимента содержались в одинаковых условиях.

Николаев В.Ю. – аспирант кафедры нормальной физиологии, младший научный сотрудник,
e-mail: nvu11@mail.ru

Шахматов И.И. – д.м.н., проф., старший научный сотрудник, e-mail: iish59@yandex.ru

Киселев В.И. – д.м.н., проф., член-кор. РАН, зав. кафедрой нормальной физиологии, зав. лабораторией,
e-mail: vik@agmi.ru

Москаленко С.В. – студентка лечебного факультета, e-mail: sunrisemsv@gmail.com

В ходе экспериментов крысы опытных групп ежедневно помещались в воздушный термостат при температуре +45 °С на 19 минут. Условием для прекращения гипертермического воздействия являлось повышение ректальной температуры у крыс, измеряемой с помощью электронного термометра, до +41,7 °С (стадия двигательного возбуждения). Данная стадия выбрана нами, исходя из результатов ранее проведенных исследований [5], показавших развитие при ней максимально выраженных изменений в состоянии системы гемостаза, характеризующихся развитием претромботического состояния; длительность нахождения в термостате для достижения стадии двигательного возбуждения (в среднем 19 минут) основана на литературных данных и подтверждена в ходе предварительных экспериментов [1, 5]. Животных выводили из эксперимента на 1, 7, 15 и 30 сутки после гипертермического воздействия. В группах контроля животные находились в термостате при комнатной температуре на протяжении такого же времени, что и опытные. Кровь для исследования в объеме 5–6 мл забиралась сразу по истечении времени нахождения в термостате под эфирным наркозом из печеночного синуса.

Комплекс методик, позволяющий оценить состояние системы гемостаза, включал исследование агрегационной активности тромбоцитов, коагуляционного звена гемостаза, антикоагулянтной и фибринолитической систем. В качестве наборов для оценки системы гемостаза были выбраны диагностические наборы фирмы «Технология-Стандарт» (Россия) с использованием коагулометра «Минилаб» (Россия). Определение показателя гематокрита и подсчет количества тромбоцитов периферической крови проводился при помощи гематологического анализатора Drew3-РАС (Великобритания).

Данные исследований представлены в виде (m [25–75 %]), где m – медиана в выборочной совокупности, [25–75 %] – 25-й и 75-й процентиль. Исходя из того, что не все наблюдаемые признаки подчинялись нормальному распределению, достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ результатов исследования показателей тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза, зарегистрированных через различные промежутки времени с момента окончания воздействия гипертермии, приведен в таблице.

На протяжении всего периода гипертермического воздействия прогрессивно происходило снижение количества тромбоцитов. Агрегация тромбоцитов, повышавшаяся на протяжении первых 7 суток, к 30 суткам снижала свою активность. Состояние плазменного звена системы гемостаза после многократного ежедневного перегревания характеризовалось с 1 по 7 день гиперкоагуляцией, однако уже с 15 дня регистрировалась гипокоагуляция по внутреннему пути свертывания. На внешнем пути активации гемостаза на 15 сутки отмечалась гиперкоагуляция, также сменявшаяся к 30 суткам гипокоагуляцией. Следует отметить, что ярко выраженная гиперкоагуляция на конечном этапе свертывания крови (см. таблицу, активированное парциальное тромбопластиновое время АПТВ, протромбиновое время, тромбиновое время и время полимеризации растворимых фибрин-мономерных комплексов ВПФМ) наблюдалась лишь по истечении 7-го дня гипертермического воздействия.

Концентрация растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) и фибриногена превышала контрольные величины также лишь в течение первых 7 суток. В дальнейшем, по мере увеличения времени экспериментального воздействия, достоверных изменений этих показателей отмечено не было. Со стороны антикоагулянтного звена системы гемостаза однократная гипертермия сопровождалась снижением уровня антитромбина III, которое в дальнейшем сменялось его повышением на протяжении первых 15 суток эксперимента и восстановлением к 30 суткам (см. таблицу). Фибринолитическая система крови реагировала на многократную гипертермию выраженным угнетением на протяжении первых 15 суток с последующей (к 30-му дню) активацией (уменьшением продолжительности эуглобулинового фибринолиза) (см. таблицу).

Таким образом, в ходе экспериментов установлено, что к 30-м суткам происходила долговременная адаптация системы гемостаза к многократному гипертермическому воздействию, которая выражалась в снижении активности и количества тромбоцитов, гипокоагуляции по обоим путям плазменного гемостаза, восстановлении концентрации РФМК и фибриногена, а также выраженной активации фибринолитической системы крови.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов экспериментов по оценке влияния многократного гипертермического воздействия на систему гемостаза показал, что увеличение количества тренировок оказывает

Таблица

Состояние системы гемостаза на протяжении тридцатидневного ежедневного перегревания (m [25–75 %])

Показатель	1 день	7 дней	15 дней	30 дней
Содержание тромбоцитов, $\times 10^9$ /л	489,0* [476,0–493,5] (–9 %)	481,0* [473,0–486,0] (–9 %)	481,0* [475,0–494,8] (–18 %)	458,5* [425,0–486,8] (–18 %)
Агрегация, макс. знач.	45,2* [42,6–49,7] (+47 %)	37,9* [33,4–38,8] (+34 %)	29,9* [26,3–25,0] (–15 %)	22,9* [22,4–23,3] (–29 %)
АПТВ, с	10,8** [9,0–11,1] (–33 %)	13,8** [13,2–14,9] (–16 %)	17,1** [16,3–17,4] (+8 %)	19,1* [17,3–20,1] (+15 %)
Протромбиновое время, с	20,7* [18,2–21,4] (–6 %)	22,2 [21,4–22,9]	24,3* [23,8–25,0]	25,4** [25,0–25,8] (+11 %)
Тромбиновое время, с	25,5* [23,7–26,0] (–15 %)	25,6 [25,4–26,4]	24,3 [24,0–24,8]	26,5** [26,3–27,0] (–10 %)
ВПФМ, с	51,6* [50,5–55,0] (–9 %)	37,1** [35,5–37,7] (–35 %)	50,3** [49,2–53,2] (–12%)	53,7 [51,2–56,0]
Содержание РФМК, мг/100 мл	7,4* [6,3–7,4] (+147 %)	4,5* [3,9–5,1] (+50 %)	3,0 [3,0–3,0]	3,0 [3,0–3,0]
Содержание фибриногена, г/л	3,4* [3,0–3,9] (+17 %)	3,2* [3,1–3,3] (+10 %)	2,9 [2,7–3,0]	3,0 [2,7–3,3]
Содержание антитромбина III, %	90,1 [87,4–92,5] (–10 %)	110,9** [109,6–114,6] (+10 %)	119,6** [118,5–120,0] (+22 %)	98,7 [91,2–99,7]
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	690,0** [690,0–750,0] (+31 %)	900,0** [900,0–900,0] (+76 %)	900,0** [840,0–930,0] (+76 %)	330,0** [292,5–360,0] (–52 %)

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от соответствующих показателей группы контроля: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$; в скобках приведены статистически значимые изменения величин показателей относительно величин в контроле (в процентах).

значительное влияние на изменение первоначального состояния оцениваемых параметров, наблюдаемых при однократном воздействии. При этом наиболее неустойчивым звеном в системе является конечный этап свертывания плазменно-гемостаза.

Можно предположить, что непродолжительный период тренировок (7 суток) вызывает повышение как коагулянтной, так и противосвертывающей активности плазмы крови. Такие изменения в системе гемостаза могут расцениваться как защитная приспособительная реакция организма в ходе «срочной» адаптации. Однако, благодаря многократным гипертермическим нагрузкам, на пятнадцатый день теплового воздействия отмечается снижение активности тромбоцитарного и плазменного гемостаза. На тридцатые сутки экспериментального воздействия зафиксирована нормализация антикоагулянтной и активация фибринолитической систем плазмы крови. Исходя из полученных результатов можно утверждать, что описанное изменение показателей системы гемостаза характеризует ее состояние в рамках долговременной адаптации организма.

Стоит учитывать, что в ходе адаптации к высокой температуре происходит комплексная перестройка в организме, в том числе в системе гемостаза, которая снижает степень физиологического напряжения, вызванного действием внешнего тепла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализируя материал, полученный в ходе ежедневных гипертермических тренировок, можно сделать вывод, что многократное воздействие одинакового по силе гипертермического раздражителя устраняет рассогласование в отдельных звеньях системы гемостаза, зарегистрированное при однократном воздействии.

Установлено, что в ходе ежедневных гипертермических тренировок сначала снижаются, а к 30 дню и полностью исчезают признаки тромбоцитической готовности, зафиксированные при однократном воздействии, регистрируется снижение коагулянтной и рост фибринолитической активности крови.

Установлено, что долговременная адаптация организма на гипертермическое воздействие со стороны системы гемостаза регистрируется лишь по истечении тридцатикратных ежедневных тренировок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боженкова М.В. Морфофункциональные изменения слюнных желез белых крыс в условиях воздействия высокой внешней температуры (экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук. Смоленск, 2008. 182 с.
2. Верецагин И.П., Верецагин Е.И. Ксенотемпературы в медицинской практике: от гипотермии к гипертермии. Новосибирск, 2013. 184 с.
3. Долотина Н.В. Реакция костного мозга при воздействии общей гипертермии в эксперименте: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2012.
4. Козлов Н.Б. Гипертермия: биохимические основы патогенеза, профилактики, лечения. Воронеж, 1990. 104 с.
5. Николаев В.Ю., Шахматов И.И., Киселев В.И., Вдовин В.М. Система гемостаза у крыс при различных режимах однократной гипертермической нагрузки // *Соврем. пробл. науки и образования*. 2014. (4). 102–108.
6. Сувернев А.В., Иванов Г.В., Василевич И.В. и др. Пути практического использования интенсивного теплечения. Новосибирск: Гео, 2009. 109 с.
7. Тен В. Влияние на организм многократных воздействий высокой температуры // *Физиологические адаптации к теплу и холоду*. Л.: Наука, 1969. 105–120.
8. Шахматов И.И., Киселев В.И. Влияние различных стрессирующих воздействий, наблюдающихся при природно-техногенных катастрофах, на систему гемостаза // *Успехи соврем. естествознания*. 2006. (4). 108–111.
9. Rousakow S. The history of hyperthermia rise and decline // *Conference Papers in Medicine*. 2013. 2013. 58.
10. Song C.W., Griffin R., Park H.J. Influence of tumor pH on therapeutic response // *Cancer Drug Discovery and Development: Cancer Drug Resistance*. Ed. B.A. Teicher. Humana Press, 2006. 21–42.
11. Wust P., Hildebrandt B., Sreenivasa G., Rau B. Hyperthermia in combined treatment of cancer // *Oncology*. Vol. 3. August 2002. 487–488.
12. Xiaoming H. Thermostability of Biological Systems: Fundamentals, Challenges, and Quantification // *The Open Biomedical Engineering Journal*. 2011. 47–73.

THE HEMOSTATIC SYSTEM IN RATS AT LONGTIME HYPERTHERMIC LOAD

Vladimir Yurevich NIKOLAEV^{1,2}, Igor Il'ich SHAKHMATOV^{1,2}, Valeri Ivanovich KISELEV^{1,2}, Svetlana Valerevna MOSKALENKO¹

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

² Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4

Goal: To analyze the state of the reaction of hemostatic system in rats during long-term exposure to hyperthermia. Material and methods: Wistar rats-males (120 animals) have been used. Hyperthermia was simulated by the laboratory animals introducing into the thermal chamber (thermostat) with the inside air temperature of +45 °C at the certain time. Results and discussion: It is established that the effect of long-term adaptation of hemostasis occurs only after 30 days of daily hyperthermic exposure. Daily experimental impact on the seventh day is accompanied by increased activity of the platelet and plasma hemostasis, increased anticoagulant and inhibition of fibrinolytic system of blood. After 30 days there is a decrease in the activity of platelet and plasma hemostasis, normalization of anticoagulant and activation of the fibrinolytic system of blood.

Key words: hemostasis, general overheating, chronic experiment, adaptation.

Nikolaev V.Yu. – postgraduate student of the chair for normal physiology, junior researcher, e-mail: nvu11@mail.ru
Shakhmatov I.I. – doctor of medical sciences, professor, senior researcher, e-mail: iish59@yandex.ru
Kiselev V.I. – doctor of medical sciences, corresponding member of RAS, head of the chair for normal physiology, e-mail: vik@agmu.ru
Moskalenko S.V. – student, e-mail: sunrisemsv@gmail.com

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СОРБЕНТЫ
ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**

**Любовь Никифоровна РАЧКОВСКАЯ, Андрей Юрьевич ЛЕТЯГИН,
Василий Александрович БУРМИСТРОВ, Максим Александрович КОРОЛЕВ,
Наталья Евгеньевна ГЕЛЬФОНД, Юрий Иванович БОРОДИН,
Владимир Иосифович КОНЕНКОВ**

*ФГБНУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии (НИИКЭЛ)
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Сорбенты широко используют в медицинской практике для детоксикации организма при профилактике и лечении различных заболеваний. Саногенное действие сорбентов можно усилить, если на их поверхность нанести биологически активные вещества (ферменты, клетки и др.). При этом сорбент выступает одновременно как в роли носителя для доставки активных веществ, например, в нужные отделы желудочно-кишечного тракта, так и в качестве детоксиканта. Этот подход позволил создать модифицированные сорбенты для пролонгированной доставки таких компонентов, как литий и серебро. Литий важен для коррекции психоэмоционального состояния. Серебро является эффективным антибактериальным и противовирусным и противогрибковым средством при инфекциях.

Ключевые слова: сорбенты, детоксикация, пролонгирование, литий, серебро.

Бурное развитие промышленности привело к антропогенному перераспределению химических соединений, изменению материального состава окружающей среды, что, безусловно, негативно повлияло на биосферу Земли, условия существования и жизнедеятельности человека, в частности, нарушило сложившиеся взаимодействия организма человека с окружающей средой. Увеличение в России и во всем мире количества техногенных, экологических катастроф и чрезвычайных ситуаций оказывает сильное воздействие как стрессовые психотравмирующие факторы: опасные токсические агенты; радиация; чрезмерные физические нагрузки; страх заразиться инфекционными болезнями, страх потерять работу и т.д. Возникают состояния с расстроенным сознанием, обострения прежних заболеваний, в том числе и психических, с агрессивной и суицидальной настроенностью. Известно, что тревожные и депрессивные состояния и связанные с ними психические расстройства представляют собой существенную медико-биологическую и соци-

альную проблему как для России, так и для всего мира [10, 25]. В настоящее время только в России официально зарегистрировано около 4 млн психически больных. Считается, что до 40 % больных общесоматической сети имеют показания к лечению психотропными средствами как профилактической, так и лечебной направленности.

Возникающие в связи с техногенными и природными катаклизмами ситуации опасны не только психическими расстройствами, но распространенностью кишечных инфекций различной природы на больших территориях, что может вылиться в глобальную катастрофу. По данным ВОЗ, ежегодно в мире погибает до 5 млн детей от кишечных инфекций различной этиологии. В мире и у нас в стране постоянно регистрируются новые вспышки кишечных инфекций как локального, так и масштабного характера. Так, эпидемия весной 2011 г. в ряде стран Евросоюза, вызванная антибиотикоустойчивым штаммом кишечной палочки, привела к гибели более 50 человек. Вышесказанное подтверждает необходи-

Рачковская Л.Н. – к.х.н., e-mail: noolit@niikel.ru

Летягин А.Ю. – д.м.н., проф., e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Бурмистров В.А. – к.х.н.

Королев М.А. – к.м.н., e-mail: kormax@bk.ru

Гельфонд Н.Е. – к.х.н., e-mail: gelfn@yandex.ru

Бородин Ю.И. – академик, e-mail: lymphology@niikel.ru

Коненков В.И. – академик, e-mail: konenkov@niikel.ru

мость разработки новых высокоэффективных препаратов для профилактики и лечения психосоматических патологических состояний.

Токсические агенты (химические вещества, микробные клетки и т. д.), попадая в организм, приводят к нарушению гомеостаза и возникновению состояния, называемого эндогенной интоксикацией. Этиологическими факторами, обуславливающими появление эндогенной интоксикации, являются нарушение функции органов детоксикации и экскреции, повреждение эпителиальных покровов и массивные нарушения тканей, ишемия органов и тканей, экзотоксикозы, иммуносупрессия, недостаточность системы неспецифической резистентности [21]. Развитие эндогенной интоксикации связывают с образованием средне- и высокомолекулярных веществ пептидной природы при различных заболеваниях. Эндотоксинами могут выступать и естественные соединения, участвующие в метаболизме и появляющиеся в тканях и биологических жидкостях [1, 3, 7]. К ним относят продукты естественного обмена в высоких концентрациях, активированные ферменты, способные повреждать ткани, медиаторы воспаления, перекисные продукты, неоднородные по составу ингредиенты нежизнеспособных тканей, агрессивные компоненты комплексов, бактериальные токсины (экзо- и эндотоксины).

Среди широко применяемых *сорбционных методов* в зависимости от способа и принципов выведения токсических агентов различают гемо-, лимфо-, плазмо-, ликворо-, энтеросорбцию, иммуносорбцию, аппликационную сорбцию [1, 3, 7, 15]. В настоящее время чаще всего отдают предпочтение методу энтеросорбции, как неинвазивному и простому в исполнении. Интерес к сорбционным методам не ослабевает, так как эфферентные методы с использованием сорбентов основаны на выведении из организма ядовитых, балластных веществ экзо- и эндогенной природы, при этом ослабляется нагрузка на органы, обеспечивающие детоксикацию (печень, почки, иммунная система).

Требования к сорбентам для медицины. Они должны быть механически прочными, химически стойкими, обладать заданными стандартизованными гранулометрическими и текстурными параметрами, иметь определенный химический состав, минимально травмировать биологические ткани, не оказывать токсического воздействия на органы и ткани, не поглощать белок и кислород из крови и лимфы, не нарушать минерального баланса в организме, быть селективными в отношении определенных классов соединений, иметь оптимальную сорбционную емкость, «работать»

на протяжении всего желудочно-кишечного тракта, хорошо и полностью эвакуироваться из него [1, 3, 5, 7, 15].

Перечень заболеваний, при которых показаны сорбционные технологии. Это – острые отравления, аллергические заболевания, болезни печени и желчных путей, болезни почек, болезни легких, острые воспалительные и гнойно-септические заболевания, психоневрологические и психические заболевания, абстинентные синдромы у наркоманов и алкоголиков, иммунозависимые заболевания, последствия травм, острые нарушения кровообращения, нарушения основных видов обмена, онкозаболевания, лучевые поражения, кожные заболевания, эндокринные заболевания и другие. Так, при патологиях печени сорбенты выводят из организма билирубин, аммиак, желчные кислоты, бактериальные токсины, среднемолекулярные пептиды и другие; при заболеваниях почек – продукты белкового и пуринового обмена (мочевина, мочевая кислота, креатинин), среднемолекулярные пептиды, электролиты, биогенные амины, катехоламины; при бронхолегочных заболеваниях – кинины, катехоламины, биогенные амины, регуляторные пептиды, гормоны, простагландины и другие биологически активные вещества; при заболеваниях желудочно-кишечного тракта – бактериальные токсины, индол, скатол, желчные кислоты, регуляторные пептиды, гормоны, конечные и промежуточные продукты основных видов обмена.

Механизм лечебного действия сорбентов. Механизм сорбции связан с прямым и опосредованным эффектом. Прямое действие сорбентов – это сорбция токсинов, поступающих *per os*, ядов, выделяемых в хилус с секретом слизистых оболочек, печени, поджелудочной железы, эндогенных продуктов секреции и гидролиза, сорбция биологически активных веществ (нейропептидов, простагландинов, серотонина, гистамина), патогенных бактерий и их токсинов, газов, а также раздражение зон желудочно-кишечного тракта. На примере энтеросорбции можно более наглядно представить себе этот механизм. Токсины, прежде чем покинуть организм, многократно всасываются и вновь экскретируются кишечной системой. Это многократное действие сильно отравляет организм. Энтеросорбент прерывает возникший порочный круг, фиксируя токсины на своей поверхности и выводя их из организма естественным путем [8]. Опосредованное действие – это предотвращение или ослабление токсико-аллергических реакций, профилактика экзотоксикоза, снижение метаболической нагрузки на органы экскреции и детоксикации, коррекция обменных процессов, восстановление целостно-

сти и проницаемости слизистых оболочек, улучшение кровоснабжения, стимуляция моторики кишечника.

Модифицированные сорбенты. Понятно, что саногенное воздействие сорбента на органы и ткани возрастает в тех случаях, когда на его поверхность наносятся лечебные, биологически активные вещества (антибиотики, ферменты, клетки и др.). Сорбционные методы вполне можно применить для введения лечебных препаратов при условии обратимости сорбции веществ-модификаторов. Сорбент предварительно насыщают необходимыми препаратами, и систему применяют в режиме десорбции [9]. По существу, сорбент не только выполняет детоксицирующую функцию, но и одновременно служит средством доставки модификаторов (антибиотиков, клеток и др.) в организм. Так, сорбент СУМС-1 с иммобилизованными на его поверхности бифидобактериями является биоэнтеросорбентом, который наряду с детоксикацией восстанавливает нормальную флору в кишечнике, при этом предохраняет от разрушения бифидобактерии в кислой среде желудка, доставляя их в достаточном количестве в нужные отделы желудочно-кишечного тракта, обеспечивая сохранность микробного пейзажа [6, 12]. Исследования при лечении ожоговых и гнойных ран показали эффективность применения аппликаций сорбента с иммобилизованными на его поверхности метронидазолом, липооризином, антибиотиком при разных фазах заживления раневой поверхности [13].

Логично, что должны появиться препараты нового поколения, не только выполняющие функции сорбентов, но и обладающие специфическим действием за счет пролонгированного высвобождения необходимого выбранного компонента в биологическую среду. Интерес представляют препараты лития и серебра. Судя по литературным данным, препараты этих элементов должны быть пролонгированно поставляемыми в биосреду для эффективного терапевтического действия: литий, в силу его быстрого всасывания и связанных с этим побочных эффектов при лечении психоэмоциональных расстройств; серебро – его терапевтический (антибактериальный и вирулицидный) эффект достигается как за счет высвобождения с поверхности в объем биологической среды, так и при точечном контакте биосреды с поверхностью [16].

Накопленный опыт работы с сорбентами позволяет сделать предположение, что наиболее приемлемыми для целей иммобилизации лекарственных препаратов являются сорбенты с мезо-, макропористой структурой разного гранулометрического состава (например, СУМС-1, СИАЛ),

позволяющие как сорбировать, так и десорбировать иммобилизованные активные соединения [5, 15]. Сорбенты имеют величину удельной поверхности до 250 м²/г, достаточный объем пор (до 0,45 см³/г) с размером до 10 и 1000 нм, доступных для сорбции различных токсических агентов. Для сорбции водорастворимых солей лития с целью возможного пролонгированного высвобождения Li с поверхности потребовалось «замуровывание» соединения лития кремнийорганическим полимером в поровом объеме матрицы [5]. Аналогичной процедуры для серебра не требовалось, так как использовали комплекс нанокластерного серебра (размер частиц 2–5 нм) с полимерным соединением – поливинилпирролидоном (Арговит).

Литийсодержащий сорбент. Представленный выше подход позволил получить литийсодержащий препарат Ноолит на основе сорбента, который изучали в сравнении с применяющимся в медицине карбонатом лития в эксперименте на крысах [19]. Экспериментальные данные показали, что из соединения лития, иммобилизованного на поверхности сорбента СИАЛ, он медленнее, чем из применяющегося на практике карбоната лития (в 5 раз – при однократном введении, в 3 – при курсовом), всасывается из желудочно-кишечного тракта и формирует в крови более низкие концентрации с меньшими колебаниями их значений.

Литийсодержащий препарат на основе сорбента показал высокую эффективность в модельных условиях стресса как нормотимик и анксиолитик как в профилактическом, так и лечебном отношении (модель сенсорного контакта по Н.Н. Кудрявцевой) [24, 26]. Влияние литийсодержащего препарата на поведение животных выявляли при сравнении с особями, которым в том же режиме вводили плацебо. Установлено, что время иммобильности мышей в тесте Порсолта было достоверно более низким (т.е. животные демонстрировали более активную стратегию избегания) после хронического введения Ноолита, чем у особей, которым вводился растворитель, и у интактных. Поведение субмиссивных животных в тесте Порсолта при превентивном введении Ноолита на фоне продолжающегося угнетающего воздействия также показало более активную «стратегию избегания» по сравнению с животными как группы «плацебо», так и с интактными [17, 20, 24].

Литийсодержащий сорбент, высвобождая литий в раствор, одновременно проявляет и сорбционные свойства. Для примера на рис. 1 представлена микрофотография глобул стафилококка на поверхности сорбента, из которого видно, что агрегированные глобулы (более светлого тона)

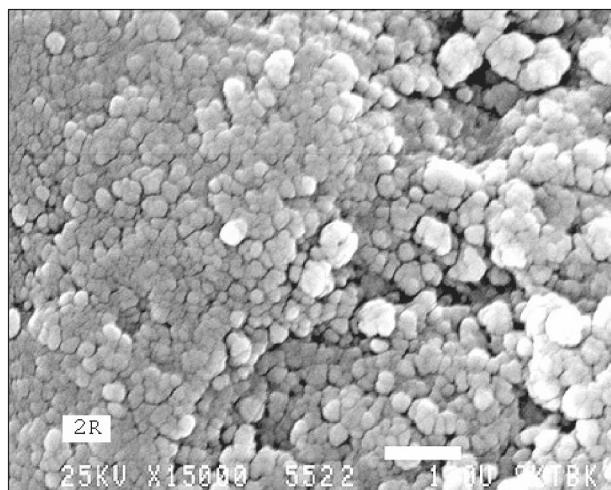


Рис. 1. Сорбция золотистого стафилококка на поверхности литийсодержащего сорбента [5]

располагаются в крупных порах, выходящих на поверхность сорбента [5]. Исследования показали, что сорбция микробных клеток на поверхности сорбентов не лишает их возможности деления в благоприятных условиях, т.е. у сорбентов отсутствует специфическая антимикробная и противовирусная активность.

Серебросодержащий сорбент. Присутствие на поверхности сорбента антибактериального агента – наноразмерных частиц серебра – подавляет активность к делению сорбированных клеток. При этом важно, чтобы серебро не только обеспечивало контактное действие на поверхности, но и пролонгированно переходило в объем биологической жидкости, осуществляя терапевтический эффект, например, при различных кишечных инфекциях.

К препаратам серебра в настоящее время проявляется большой интерес как к альтернативе антибиотикам. Известно, что использование антибиотиков выявило ряд негативных факторов: во-первых, это быстрое появление и распространение антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов; во-вторых, антибиотики негативно влияют на микробиоценоз, вызывают дисбактериозы, нарушают процессы всасывания и усваивания различных нутриентов, снижают иммунитет; в-третьих, антибиотики не действуют на вирусы. Возможно, именно благодаря неоправданно широкому использованию антибиотиков вирусные заболевания и получили столь большое распространение. Так, по данным ВОЗ, в настоящее время заболевания вирусной этиологии уже составляют более 75 % от всех случаев инфекционных заболеваний. Считается доказанным вирусное происхождение многих онкологических заболеваний. Некоторые виды сердечно-сосуди-

стой патологии также обязаны своим происхождением различным инфекционным агентам. В частности, в этиологии таких распространенных заболеваний, как ревмокардит и неревматический миокардит, существенную роль играют кардиотропные энтеровирусы и вирус Коксаки. Значительное число патологий либо обусловлено, либо сопровождается и усугубляется различными инфекционными заболеваниями [14].

Особенностью кишечных инфекций является то, что при сходных основных симптомах (диарея, токсикозы и т.п.) они вызываются очень широким кругом возбудителей, для которых желудочно-кишечный тракт – входные ворота инфекции. В качестве основных возбудителей можно отметить бактерии (кишечная палочка, сальмонеллы, шигеллы, иерсинии, холерный вибрион и т.д.), вирусы (ротавирусы, энтеровирусы, парвовирусы и т.д.), а также бактериальные токсины и микотоксины. На практике точное установление этиологии заболевания (бактериальная, вирусная), типа возбудителя, его чувствительности к антибиотикам и противовирусным препаратам – достаточно трудоемкая процедура, не всегда быстро выполняемая. Инфекция же развивается очень быстро, и для ее подавления необходимы срочные меры. Для профилактики и лечения таких смешанных инфекций и сложных «инфекционно-соматических» заболеваний требуются новые подходы и новые препараты, отличающиеся по механизму действия от антибиотиков, обладающие дополнительно к антибактериальной высокой противовирусной активностью. По этой причине возрастает интерес к препаратам серебра. Бактерицидные свойства коллоидного серебра с большим размером частиц (Колларгол, Протаргол, рис. 2) успешно применялись в медицине с 20–40-х годов прошлого столетия и используются сейчас [22, 23]. Появившиеся в последнее десятилетие новые препараты на основе коллоидного серебра наноразмеров расширили возможности создания серебросодержащих сорбционных материалов, в которых размер пор сопоставим с размерами частиц Ag [22]. На рис. 2 представлены электронномикроскопические сравнительные фотографии (оригинальные данные) частиц коллоидного серебра в препаратах Арговит, Колларгол и Протаргол. Размер частиц иммобилизованного серебра значительно влияет на проявление бактерицидных свойств.

В табл. 1 показано влияние размера частиц Ag, иммобилизованных на носителе, на антибактериальную активность в эксперименте с тест-штаммом *Escherichia coli* по стандартной методике на питательной среде (согласно Государственной Фармакопее XI). Из табл. 1 вид-

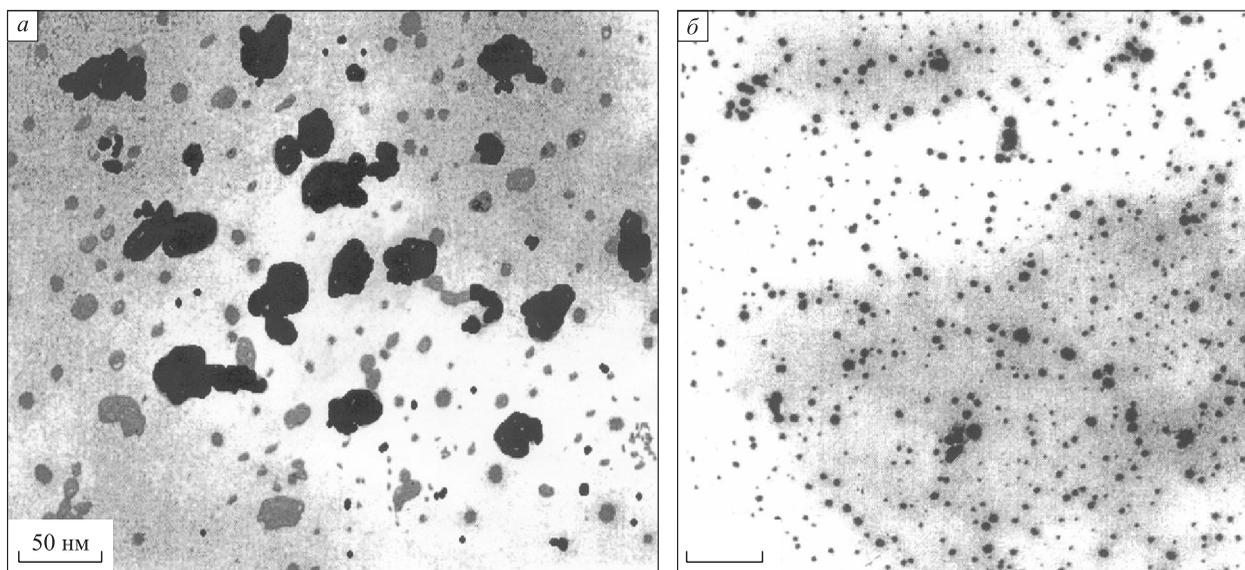


Рис. 2. Электронно-микроскопические фотографии растворов Колларгола (Протаргола) (а) и Арговита (оригинальные данные) (б)

но, что антимикробная активность препаратов на основе носителя с иммобилизованными на его поверхности комплексами серебра падает с увеличением размера частиц серебра. Доза серебросодержащего сорбента в 1 мг/мл колонии полностью подавляет микроорганизмы в случае препарата с меньшим размером частиц. При этом токсичность нанокластерного серебра (Арговит) меньше (в 3–5 раз), чем использующихся препаратов – Колларгола и Протаргола (табл. 2).

Важным условием успешного применения нанокластерного серебра в композиции с сорбентом является высвобождение Ag с поверхности при контакте с жидкой средой. Исследование кинетики высвобождения Ag с поверхности сорбента СУМС-1 в водный раствор показало постепенное увеличение содержания нанокластерного серебра в растворе в течение длительного времени – до 24 ч. За 12 ч десорбции в раствор высвободилось 70 % серебра, за 24 ч – 78 %.

Таблица 1

Сравнение антимикробной активности серебросодержащих препаратов (инкубация 20 ч) в эксперименте с тест-штаммом *E. coli* [2]

Препарат	Исходная концентрация клеток (КОЕ/мл)	Концентрация клеток (КОЕ/мл) при различных дозах препарата (мг/мл)			
		0	1,0	0,5	0,25
Контроль питательной среды	4×10^2	$9,9 \times 10^8$	–	–	–
Контроль носителя	4×10^2	–	–	$1,0 \times 10^9$	–
Ag-2нм/носитель	4×10^2	$9,9 \times 10^8$	0	$1,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^8$
Ag-500нм/носитель	4×10^2	$9,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$

Примечание. Препараты приготовлены с использованием нанокластерного серебра Арговит и сорбента.

Таблица 2

Острая токсичность серебросодержащих препаратов при внутрибрюшинном введении

Летальная доза	Доза, мг/кг массы тела животного				
	Мыши		Крысы		
	Арговит	Протаргол	Арговит	Протаргол	Колларгол
LD ₅₀	700	180	500	150	90
LD ₁₀₀	1400	300	1200	400	–

Таблица 3

Содержание бактерий (КОЕ/мл) при различных навесках сорбента через 4 и 24 ч культивирования [18]

Препарат	0 (контроль)		1 мг/мл		5 мг/мл		10 мг/мл	
	4 ч	24 ч						
<i>S. aureus</i> , исходная посевная доза $2,0 \times 10^4$ КОЕ/мл								
Ag/СИАЛ	$5,8 \times 10^5$	$6,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^1$	$3,3 \times 10^8$	0	0	$8,5 \times 10^3$	0
Ag/Каолин			0	$2,5 \times 10^8$	0	$1,7 \times 10^7$	0	0
Смекта			$6,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^8$	$5,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$4,8 \times 10^7$
<i>E. coli</i> , исходная посевная доза $1,0 \times 10^5$ КОЕ/мл								
Ag/СИАЛ	$3,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^9$	0	$1,3 \times 10^8$	0	0	0	0
Ag/Каолин			0	$1,8 \times 10^8$	0	0	0	0
Смекта			$7,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^9$	$5,1 \times 10^6$	$4,8 \times 10^9$	$2,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^8$
<i>C. albicans</i> , исходная посевная доза $1,5 \times 10^4$ КОЕ/мл								
Ag/СИАЛ	$3,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^8$	$4,3 \times 10^4$	$4,5 \times 10^6$	$6,1 \times 10^3$	$4,2 \times 10^5$	$4,7 \times 10^3$	0
Ag/Каолин			$1,1 \times 10^4$	$4,7 \times 10^6$	$6,0 \times 10^2$	$4,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4$
Смекта			$3,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^7$	$3,4 \times 10^5$	$4,2 \times 10^7$

Известно сравнительное изучение антибактериальной активности тонкодисперсных серебро-содержащих сорбентов Ag/СИАЛ и Ag/Каолин (при одинаковом содержании серебра), полученных на матрицах-носителях – сорбентах СИАЛ и Каолин (последний – фармакопейный препарат) и противодиарейного аптечного препарата ®Смекта на стандартных жидких питательных средах [18]. Для исследований использовали бактериальные культуры *Staphylococcus aureus* (грамположительная неспороносная бактерия), *E. coli* (грамотрицательная неспороносная бактерия), *Candida albicans* (дрожжи, эукариотический тип строения клеток). Как видно из табл. 3, препарат ®Смекта какой-либо значимой антибактериальной активностью не обладает. Модифицирование сорбентов наносеребром придает им ярко выраженное антибактериальное действие – как бактериостатическое (титры падают в сравнении с контролем на порядки), так и, при увеличении концентрации сорбента или длительности культивирования, бактерицидное (нулевые значения титров). Оценивая общую картину антибактериального действия серебросодержащих сорбентов на исследованных штаммах, можно утверждать, что по антибактериальной активности сорбенты Ag/Каолин и Ag/СИАЛ практически сопоставимы, последний несколько уступает. Возможно, это коррелирует с прочностью связывания наночастиц серебра с указанными сорбентами и, соответственно, с их способностью десорбировать частицы Ag в культуральный раствор. Тест-штаммы различались по чувствительности к действию наносеребра: наименее устойчивыми оказались бактерии *E. coli*, наиболее – грибы *C. albicans*. В целом можно заключить, что модифицирование

сорбентов кластерным серебром придает им новое качество – специфическую антимикробную активность в отношении патогенных бактерий, и, что очевидно, специфическая антибактериальная активность будет способствовать существенно повышению терапевтической эффективности при использовании таких комплексных серебро-содержащих препаратов на основе сорбентов для профилактики и лечения кишечных инфекций различной этиологии [11].

Следует подчеркнуть, что во всех вышерассмотренных композициях с литием и серебром, наряду с пролонгированным высвобождением активных компонентов в жидкую среду, сорбенты проявляют достаточно высокую сорбционную активность, сопоставимую с активностью СУМС-1, что подтверждено на примере сорбции маркера среднемолекулярных токсинов – красителя метиленового голубого ($17\text{--}29$ мг/г сорбента).

Модифицированные порошкообразные сорбенты. Используемые подходы модифицирования сорбентов оказались полезными для получения целого ряда сорбентов-пудр марки СИАЛ для косметологии. Пудры этой серии сертифицированы (сертификат соответствия РОСС RU.АЕ96.С05293 № 1076512). Это тонкодисперсные сорбенты (размер частиц до 40 мкм), модифицированные серебром, цинком, медью, селеном, витаминами, биофлавоноидами, растительными экстрактами.

Пудры этой серии являются сорбентами по отношению к молекулам разного размера и массы, не обладают собственной токсичностью. Важным свойством пудр-сорбентов является трансдермальный эффект, который заключается в способности препарата, с одной стороны, очи-

щать кожу, поглощая и удерживая молекулы вредных веществ, накапливаемые в раневой поверхности, а с другой стороны – прицельно, на уровне клетки, поставлять в кожу микроэлементы (Zn, Cu, Ag, Se) и биологически активные вещества растительных экстрактов, за счет которых препараты данной серии проявляют антиоксидантный эффект, обладают бактерицидным действием в отношении ряда возбудителей, а также свойством повторной эпителизации. Исследования, проведенные в различных медицинских учреждениях, показали их мягкое воздействие на кожу с лечебным эффектом. При воспалительных заболеваниях кожи, сопровождающихся нарушением целостности покровов, появлении мокнутия, отделяемого гнойного характера, применение пудр-сорбентов серии СИАЛ в комплексной терапии позволяет ускорить выздоровление, избежать нежелательных явлений, а также повысить качество жизни пациентов с разными формами пиодермий. Показано более быстрое восстановление поврежденной поверхности кожи, заживление ран, ожогов, воспалительных процессов, потертостей, опрелостей. Сорбенты хорошо подсушивают проблемную поверхность кожи, предотвращая развитие инфекции и оказывая противовоспалительное действие [4].

На основании вышеизложенного следует отметить неисчерпаемость сорбционного направления в медицине и смежных областях. Новые разработки позволили лишь наметить ориентиры для дальнейшего развития направления в этой области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Беляков Н.А.* Энтеросорбция. Л., 1991. 328 с.
2. *Богданчикова Н.Е., Бурмистров В.А., Одегова Г.В. и др.* Сравнительная оценка антимикробной активности серебросодержащих цеолитов // Серебро и висмут в медицине: мат. науч.-практ. конф. Новосибирск, 2005. 105–113
3. *Бородин Ю.И.* Лимфатические структуры при токсикозе и сорбентной детоксикации // Морфология. 2000. 117. (3). 25.
4. *Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н., Бурмистров В.А., Репина В.В.* Использование серебросодержащих композиций в лечебной косметологии, медицине // Применение серебра в медицине: мат. науч.-практ. конф. Новосибирск, 2003. 25–30.
5. *Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н., Дарнева И.С., Новоселова Т.И.* Энтеросорбент Ноолит. Для физической и психологической реабилитации. Новосибирск, 2006. 220 с.
6. *Бородин Ю.И., Солдатова Г.С., Бурмистров В.А. и др.* Препарат Биосорб-Бифидум для нормализации внутренней среды организма // Проблемы лимфологии и эндоэкологии внутренней среды: мат. междунар. симп. Новосибирск, 1998. 58–59.
7. *Бородин Ю.И., Труфакин В.А., Любарский М.С. и др.* Сорбционно-лимфатический дренаж в гнойно-септической хирургии. Бишкек; Новосибирск, 1996. 345 с.
8. *Григорьев В.Н.* Концепция взаимодействия энтеросорбентов с внутренней средой организма // Применение энтеросорбента СУМС-1 в клинической практике: мат. науч.-практ. конф. Новосибирск, 1994. 9–14.
9. *Джиордано К.* Сорбенты и их клиническое применение. Киев, 1989. 400 с.
10. *Казаковцев Б.А.* Организация психологической, психиатрической и социальной помощи в учреждениях социального обслуживания // Психиатрическое здоровье. 2010. (4). 3–17.
11. *Коненков В.И., Бородин Ю.И., Бурмистров В.А. и др.* Препараты высокодисперсного серебра для оздоровительных программ // Лечебная и восстановительная медицина. Новосибирск, 2009. 8–11.
12. *Лосева М.И., Солдатова Г.С., Поспелова Т.И. и др.* Оценка эффективности энтеросорбентов в реабилитации больных гемобластозами с повреждением желудочно-кишечного тракта // Проблемы экспериментальной, клинической и профилактической лимфологии: мат. междунар. симп. Новосибирск, 2000. 179–182.
13. *Любарский М.С., Летягин А.Ю., Габитов В.Х. и др.* Сорбционно-лимфатический дренаж в лечении гнойно-септических процессов брюшинного пространства. Новосибирск; Илим, 1997. 97 с.
14. *Михайленко А.А., Коненков В.И., Базанов Г.А., Покровский В.И.* Руководство по клинической иммунологии, аллергологии, иммуногенетике и иммунофармакологии (для врачей общеклинической практики). Тверь, 2005.
15. *Рачковская Л.Н.* Углеродминеральные сорбенты для медицины. Новосибирск, 1996. 234 с.
16. *Рачковская Л.Н., Бгатова Н.П., Бородин Ю.И., Коненков В.И.* Протекторные свойства сорбентов, возможности применения в лимфологии // Лимфология. Новосибирск, 2012. 1063–1091.
17. *Рачковская Л.Н., Бгатова Н.П., Робинсон М.В.* Физико-химические свойства энтеросорбента Ноолит и эффективность его использования в условиях стресса // Бюл. СО РАМН. 2005. (1). 105–111.
18. *Рачковская Л.Н., Бурмистров В.А., Попова Т.В. и др.* Сравнительное изучение антибактериальной активности тонкодисперсных серебросодержащих сорбентов // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: мат. XI Междунар. конф. Новосибирск: Манускрипт, 2013. 264–268.

19. Суслов Н.И., Федоров А.А., Першина О.В. и др. Влияние Ноолита, нового препарата лития, на показатели электрофизиологической активности коры головного мозга крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2004. (2). 178–181.

20. Тендитник М.В. Психотропные и иммуно-тропные эффекты литийсодержащего энтеросорбента: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2005.

21. Топорова С.Г., Свиридкина Л.П., Семендяева М.Е. и др. Эндозеологическая реабилитация в лечении хронического холецистита // Проблемы лимфологии и интерстициального массопереноса: мат. науч. конф. с междунар. участием. Новосибирск, 2004. Ч. 2. 109–113.

22. Юдин А.М. Краткий обзор работ доктора Н.И. Соловьева по применению эларгола // Сере-

бро в медицине, биологии и технике. Новосибирск, 1996. 206 с.

23. Юдин А.М., Родионов П.П., Родионов Т.П. Из истории применения препаратов серебра // Серебро в медицине, биологии и технике. Новосибирск, 1996. 206 с.

24. Borodin Yu.I., Kudryavtseva N.N., Tenditnik M.V. et al. Behavioral effects of novel enterosorbent Noolit on mice with mixed depression/anxiety like state // Pharmacol. Biochem. Behav. 2002. 72. 131–141.

25. Kovacsics C.E., Gould T.D., Gottesman I.I. Lithium's antisuicidal efficacy // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2009. 49. 175–98.

26. Kudryavtseva N.N. A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice // Aggress. Behav. 1991. 17. (5). 285–291.

MODIFIED SORBENTS FOR PRACTICAL PUBLIC HEALTH

Lyubov Nikiforovna RACHKOVSKAYA, Andrey Yurevich LETYAGIN, Vasily Aleksandrovich BURMISTROV, Maksim Aleksandrovich KOROLEV, Natalya Evgenievna GELFOND, Yuriy Ivanovich BORODIN, Vladimir Iosifovich KONENKOV

*Scientific Institute of Clinical and Experimental Lymphology (SICEL)
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

Sorbents are widely used in medical practice for detoxification in the prevention and treatment of various diseases. The sorbents sanative effect can be strengthened by applying the biologically active substances (enzymes, cells, etc.) to their surface. Thereby the sorbent acts simultaneously as the carrier of active substances for instance to the required segments of gastrointestinal tract and as the detoxicant. This approach has allowed creating the modified sorbents for prolonged delivery of such components as lithium and silver. Lithium is important to correct the psychoemotional state. Silver is the effective antibacterial, antiviral and antifungal remedy for infections.

Key words: sorbents, detoxification, prolongation, lithium, silver.

Rachkovskaya L.N. – candidate of chemical sciences, head of laboratory for lymphoregulation, e-mail: noolit@soramn.ru

Letyagin A.Yu. – doctor of medical sciences, professor, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Burmistrov V.A. – candidate of chemical sciences, senior researcher of laboratory for lymphoforegulation

Korolev M.A. – candidate of medical sciences, e-mail: kormax@bk.ru

Gelfond N.E. – candidate of chemical sciences senior researcher of laboratory for lymphoregulation, e-mail: gelfn@yandex.ru

Borodin Yu.I. – academician, e-mail: lymph@oramn.ru

Konenkov V.I. – academician, e-mail: konenkov@soramn.ru

ПРОФИЛАКТИКА ИНТРАОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕПЕРФОРИРУЮЩИХ АНТИГЛАУКОМАТОЗНЫХ ОПЕРАЦИЙ

Элеонора Валентиновна ЕГОРОВА, Алла Валентиновна СИДОРОВА,
Анна Владимировна ОПЛЕТИНА, Ирина Леонидовна ЕРЕМЕНКО,
Ирина Николаевна ШОРМАЗ

*ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России
127486, г. Москва, Бескудниковский б-р, 59А*

Цель – изучить эффективность способа профилактики осложнений, обусловленных перфорацией трабекуло-десцеметовой мембраны в ходе неперфолирующих операций. Материал и методы: в 25 случаях микроперфорации при выполнении непроникающей глубокой склерэктомии в переднюю камеру вводили 0,2 мл вискоэластика и под поверхностный склеральный лоскут вводили 0,1 мл имплантата HealaFlow. Результаты: случаев гипотонии, отслойки сосудистой оболочки не было, через 12 месяцев после операции внутриглазное давление в среднем составило $18,3 \pm 3,1$ мм рт. ст. Обсуждение: предложенный способ восстановления передней камеры создает оптимальные условия для фильтрации внутриглазной влаги, препятствуя смещению корня радужки и блокаде трабекуло-десцеметовой мембраны.

Ключевые слова: непроникающая глубокая склерэктомия, вискоэластики, осложнения антиглаукоматозных операций.

Внедрение микроинвазивных операций и разработка хирургических вмешательств неперфолирующего типа определили новый этап в развитии хирургического лечения первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ). Предложенная в 1984 г. академиком С.Н. Федоровым и профессором В.И. Козловым непроникающая глубокая склерэктомия (НГСЭ) доказала возможность сокращения или исключения операционных и послеоперационных осложнений, а также возможности сохранения и восстановления зрительных функций у большинства больных [2, 3, 5, 7, 10, 12, 13, 15].

Однако в ходе проведения операций возможны случаи микроперфораций, которые фактически исключают одно из основных преимуществ неперфолирующих операций и могут сопровождаться срывом механизмов адаптации глаза и послеоперационной гипотонией. И даже при отсутствии клинически диагностированных осложнений послеоперационный период не исключает возникновения специфических патофизиологи-

ческих реакций, способствующих развитию пролиферативных процессов в структурах дренажной системы, созданной микроинвазивной НГСЭ.

Кроме того, возникающее при перфорации трабекуло-десцеметовой мембраны (ТДМ) измельчение передней камеры может приводить к контакту корня радужки и ТДМ с последующей ее блокадой, что отрицательно сказывается на фильтрующей функции ТДМ и может приводить к активации пролиферативного процесса. Не всегда четко фиксируется возникновение микроперфорации, и о произошедшем осложнении нередко судят по частоте блокады ТДМ корнем радужки. Блокада корнем радужки ТДМ и образование спаек в углу передней камеры является одной из основных причин снижения гипотензивного эффекта неперфолирующих операций [2, 3, 6, 7, 12, 13, 15].

Цель исследования – изучить эффективность способа профилактики осложнений, обусловленных перфорацией трабекуло-десцеметовой мембраны в ходе неперфолирующих операций.

Егорова Э.В. – заслуженный деятель науки РФ, проф., зав. отделом хирургического лечения глаукомы, e-mail: ev_egorova@rambler.ru

Сидорова А.В. – офтальмохирург отдела хирургии глаукомы, e-mail: sidorovamntk@gmail.com

Оплетина А.В. – аспирант, e-mail: anna.mntk@mail.ru

Еременко И.Л. – аспирант, e-mail: eil-86@mail.ru

Шормаз И.Н. – врач-офтальмолог, e-mail: irishor@yandex.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование базируется на анализе 25 операций (25 глаз) больных с ПОУГ, при которых в ходе проведения микроинвазивной НГСЭ произошла микроперфорация ТДМ. Среди оперированных было 11 мужчин и 14 женщин. Средний возраст больных составил $69,7 \pm 6,75$ года. Начальная стадия ПОУГ наблюдалась у семи, развитая – у 10 и далеко зашедшая – у восьми больных. Внутриглазное давление (ВГД) медикаментозно, на комбинированной гипотензивной терапии, перед операцией снижено до $25,9 \pm 3,7$ мм рт. ст.

Стандартное офтальмологическое обследование, которое включало визометрию, тонометрию, периметрию, офтальмометрию, гониоскопию, было дополнено оптической когерентной томографией (ОКТ) переднего отрезка глаза с помощью томографа Visante™ OCT (Carl Zeiss, Германия). При оценке дренажной системы методом ОКТ переднего отрезка глаза оценивали следующие зоны сформированных операцией дренажных путей: состояние фильтрационной подушки (высота), склерального лоскута (толщина, гидратация), интрасклеральной полости (высота, протяженность, наличие включений), ТДМ (толщина, протяженность, профиль), угла передней камеры (степень открытия, положение корня радужки).

В случае интраоперационной микроперфорации ТДМ выполняли парацентез роговицы ножом 20 G в сегментах 9 или 15 ч и в переднюю камеру с помощью канюли 27 G вводили 0,2–0,3 мл вискоэластика (1%-й гиалуронат натрия). Под склеральный лоскут вводили 0,1 мл дренажного имплантата HealaFlow, который заполнял углубление удаленного внутреннего склерального лоскута и сохранял форму овала. Сверху HealaFlow накрывали поверхностным склеральным лоскутом, фиксируя его к склеральному ложу одним узловым швом (8-0). Рану герметизировали наложением одного узлового шва на конъюнктиву (8-0). Операцию завершали инъекцией дексаметазона и антибиотика под конъюнктиву (Заявка на изобретение № 2013115436 от 8.04.2013).

В послеоперационном периоде пациентам однократно назначали ацетазоламид в дозировке 250 мг с учетом соматического статуса пациента. Результаты оценивали через 4 часа после операции, на 1, 3, 7 сутки, 1, 3, 6, 12, 18 месяцев. Срок наблюдения составил от 3 до 18 месяцев. При выполнении статистической обработки результатов исследования вычисляли среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$.

Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В раннем послеоперационном периоде во всех случаях признаков воспалительной реакции не наблюдалось. Наличие субстанции HealaFlow не сказывалось на реакции глазного яблока. Во всех случаях отмечена разлитая фильтрационная подушка с тенденцией к медленному уплощению в течение первых недель после операции. Глубина передней камеры не уменьшалась, в четырех случаях в передней камере наблюдались мелкоочечные включения форменных элементов крови, которые резорбировались в течение первых трех дней после операции. Случаев гипотонии и цилиохориоидальной отслойки не было, в одном случае отмечен отек сосудистой оболочки, купированный консервативной терапией. В трех случаях в первые 12 ч возникала реактивная гипертензия, вызванная нахождением вискоэластика в передней камере, при которой ВГД составило 22, 25 и 26 мм рт. ст. У двух пациентов гипертензия купирована назначением гипотензивных препаратов, а в одном случае выполнена частичная эвакуация вискоэластика из передней камеры через парацентез роговицы.

Во всех случаях отмечена равномерная глубина передней камеры, соответствовавшая дооперационной. Наличие вискоэластика в передней камере практически не визуализировалось. В отдельных случаях наблюдалась точечная взвесь в передней камере в течение первых 2–3 дней. ВГД через 4 ч после операции варьировало от 12 до 26 мм рт. ст. (в среднем $13,2 \pm 3,4$ мм рт. ст.) с постепенной тенденцией к снижению. Через сутки после операции ВГД составило $8,6 \pm 1,9$ мм рт. ст. ($p < 0,001$), на седьмые сутки – $10,1 \pm 1,4$ мм рт. ст., через 1 месяц – $14,3 \pm 1,7$ мм рт. ст., без гипотензивной терапии (рис. 1).

По данным ОКТ, в первые сутки после операции вискоэластик в передней камере определялся в виде мелкодисперсной взвеси, угол передней камеры оставался открытым на всем протяжении, смещения радужки к зоне операции и контакта корня радужки с ТДМ не отмечалось. Практически во всех случаях визуализировалось перфорационное отверстие в ТДМ. ТДМ имела ровный контур без проминенции в интрасклеральную полость или переднюю камеру, толщина ее находилась в диапазоне 0,05–0,08 мм (рис. 2). Интрасклеральная полость на всех глазах представляла собой пространство без включений в виде неправильного овала высотой от 0,37 до 0,67 мм.

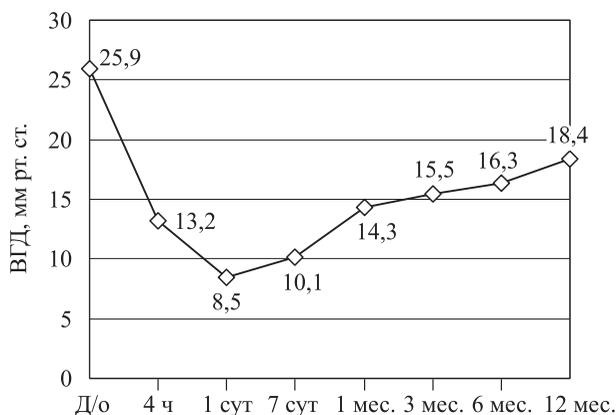


Рис. 1. Динамика ВГД в послеоперационном периоде

Фильтрационная подушка имела мелкоячеистую структуру с отдельными микрополостями, высотой до 1,2 мм.

При выполнении первой операции по предложенной технологии под склеральный лоскут не был имплантирован имплантат HealaFlow, при обследовании в первые 7 дней у данного пациента по данным ОКТ визуализировалась проминенция ТДМ в интрасклеральную полость с частичным ее контактом со склеральным лоскутом, который сохранился до 6 месяцев наблюдения. Через 11 месяцев после операции пациенту была выполнена лазерная десцеметогониопунктура, после которой ВГД составило 15 мм рт. ст.

Во все сроки наблюдения по данным ОКТ переднего отрезка глаза отмечено сохранение объ-

емных параметров в структурах сформированных путей оттока. Угол передней камеры во все сроки наблюдения сохранялся открытым, ТДМ имела ровный контур (рис. 3).

К 12 месяцам ВГД в среднем составило $18,3 \pm 3,1$ мм рт. ст., у 18 пациентов ВГД было компенсировано без гипотензивной терапии, у семи пациентов – на монотерапии, четырем пациентам проведена лазерная десцеметогониопунктура, с последующей компенсацией ВГД без гипотензивных препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные литературы показали, что использование вискоэластиков для восстановления передней камеры в ходе перфорирующих операций снижает количество интра- и послеоперационных осложнений [1, 4, 8, 9, 11, 14, 15]. Также имеются указания о введении стерильного воздуха в сочетании с физиологическим раствором для стабилизации ВГД в случае интраоперационной перфорации ТДМ при проведении микроинвазивной НГСЭ [10].

Вискоэластик (1%-й гиалуронат натрия), введенный в переднюю камеру во время операции, восполняет необходимый объем передней камеры, не вызывая гипертензии, и предупреждает прилегание корня радужки к зоне операции, а наличие субстанции HealaFlow под склеральным лоскутом препятствует проминенции ТДМ в интрасклеральную полость.



Рис. 2. ОКТ изображение зоны операции через одну неделю после НГСЭ по предложенной методике больного А, 75 лет, с ПОУГ I стадии. ВГД 10 мм рт. ст. Угол передней камеры открыт, ТДМ тонкая – 0,05 мм, профиль линейный, визуализируется перфорационное отверстие; интрасклеральная полость высотой до 0,62 мм, склеральный лоскут толщиной 0,3 мм, гидратирован, фильтрационная подушка 1,12 мм

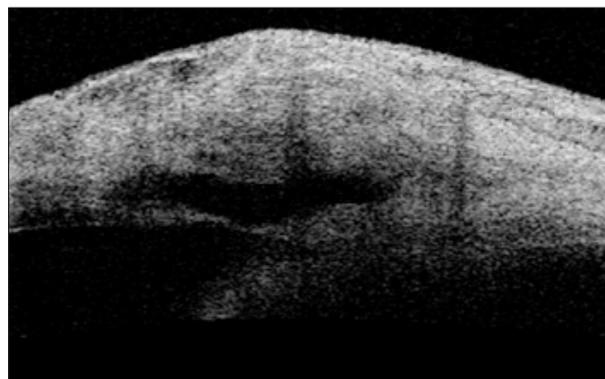


Рис. 3. ОКТ изображение зоны операции через 6 месяцев после НГСЭ по предложенной методике больного С, 69 лет, с ПОУГ II стадии. ВГД 16 мм рт. ст. Угол передней камеры открыт на всем протяжении, ТДМ тонкая – 0,06 мм, профиль линейный. Интрасклеральная полость высотой до 0,52 мм, без включений; фильтрационная подушка 1,07 мм, визуализируются интрасклеральные и субконъюнктивальные пути оттока

Эвакуация вискоэластика из передней камеры происходит в течение первых 3–5 дней после операции. Большое количество вискоэластика, введенного в переднюю камеру глаза, может способствовать проминенции тонкой ТДМ в интрасклеральную полость, в связи с этим предложенная технология включает введение 0,2–0,3 мл вискоэластика, которое не вызывает гипертензии в послеоперационном периоде.

Дополнительное заполнение объема внутреннего склерального лоскута субстанцией HealaFlow позволяет тампонировать ТДМ сверху, не допуская ее проминенции в интрасклеральную полость.

ВЫВОДЫ

Интраоперационное введение вискоэластика в переднюю камеру при перфорации ТДМ во время проведения микроинвазивной НГСЭ обеспечивает профилактику послеоперационной гипотонии и отслойки сосудистой оболочки.

Введение дренажного имплантата HealaFlow в интрасклеральную полость обеспечивает правильное положение ТДМ без ее проминенции.

Предложенная методика восстановления передней камеры в ходе неперфорирующих операций при микроперфорации ТДМ способствует неосложненному течению операции и создает оптимальные условия для фильтрации внутриглазной влаги, препятствуя смещению корня радужки и блокаде ТДМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев И.Б., Узунян Д.Г., Аксирова М.М. Способ хирургического лечения закрытоугольной глаукомы // Глаукома. 2004. (1). 38–43.
2. Бабушкин А.Э., Матюхина Е.Н. Непроницающая глубокая склерэктомия и ее варианты в лечении первичной открытоугольной глаукомы (обзор литературы) // Восток-Запад: мат. конф. с междунар. участием. Уфа, 2013. 170–173.
3. Басинский С.Н. Частота осложнений и сравнительная эффективность хирургического лечения первичной открытоугольной глаукомы // Клин. офтальмология. 2011. 12. (2). 67–70.
4. Гусев Ю.А., Трубилин, В.Н., Семин С.Б. Вискохирургия в лечении глаукомы // Актуальные про-

блемы офтальмологии: мат. Юбилейного симп. М., 2003. 260.

5. Егорова Э.В., Козлова Е.Е., Еременко И.Л. и др. Оптимизация репаративных процессов в структурах дренажной системы после МНГСЭ в ранние сроки после операции // Практ. медицина. 2013. (1–3). 39–41.

6. Ерескин Н.Н., Магарамов Д.А. Основные причины недостаточной эффективности операции НГСЭ и их устранение // Новые технологии микрохирургии глаза: мат. 6-й науч.-практ. конф. офтальмологов. Оренбург; Орск, 1998. 25–26.

7. Козлов В.И., Козлова Е.Е., Сосколовская Т.В., Сидорова А.В. Причины повышения внутриглазного давления в ближайшие и отдаленные сроки после непроницающей глубокой склерэктомии // Перспективные направления в хирургическом лечении глаукомы: сб. науч. ст. М., 1997. 50–53.

8. Онищенко А.Л., Савиных В.И. Экспериментальное обоснование применения вискоэластиков в хирургии глаукомы // Бюл. СО РАМН. 2005. (2). 100–103.

9. Онищенко А.Л., Пластинина С.Л. Применение вископротекторов в лечении некоторых осложнений хирургии глаукомы // Глаукома. 2007. (3). 35–36.

10. Пат. 2344796 РФ. Способ дозированной стабилизации внутриглазного давления во время проведения микроинвазивной антиглаукоматозной операции / Х.П. Тахчиди, Е.С. Иванова, Э.Э. Фаражева, Т.С. Любимова; опубл. 12.07.2007.

11. Пахтаев Н.П., Скворцов В.В., Арсюттов Д.Г., Горбунова Н.Ю. Временное вискодrenирование в ходе антиглаукоматозных операций с целью профилактики ранних послеоперационных осложнений // Глаукома: теории, тенденции, технологии. НРТ клуб Россия – 2006: сб. науч. ст. М., 2006. 267–270.

12. Тахчиди Х.П., Егорова Э.В., Узунян Д.Г. Ультразвуковая биомикроскопия в диагностике патологии переднего сегмента глаза. М., 2007. 128 с.

13. Федоров С.Н., Козлов В.И., Тимошкина Н.Т. и др. Непроницающая глубокая склерэктомия при открытоугольной глаукоме // Офтальмохирургия. 1989. (3–4). 52–55.

14. Hosada S., Yuki K. Ono T., Tsubota K. Ophthalmic viscoelastic device injection for treatment of flat anterior chamber after trabeculectomy: a case series study // Clin. Ophthalmol. 2013. 7. 1781–1785.

15. Mermoud A. Non-penetrating glaucoma Surgery. N.Y., 2001. 193 p.

PREVENTION OF INTRAOPERATIVE COMPLICATIONS DURING NON-PENETRATING GLAUCOMA OPERATIONS

Eleonora Valentinovna EGOROVA, Alla Valentinovna SIDOROVA,
Anna Vladimirovna OPLETINA, Irina Leonidovna EREMENKO,
Irina Nikolaevna SHORMAZ

*The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution
127486, Moscow, Beskudnikovskiy boulevard, 59A*

Objective: To study the effectiveness of the method of preventing complications caused by perforation of trabecular-descemet's membrane during non-perforating surgery. Material and methods: 25 cases of micro-perforation of trabecular-descemet's membrane during non-penetrating deep sclerectomy. The anterior chamber was filled with 0.2 ml viscoelastic and the HealaFlow 0.1 ml was injected under the sclera flap. Results: The cases of hypotension and choroidal detachment were not revealed. The intraocular pressure was on average 18.3 ± 3.1 at 12 months after surgery. Discussion: The suggested technique of anterior chamber restoration produces optimum conditions for aqueous humor filtration, prevents a displacement of iris root and the trabeculum descemet's membrane block.

Key words: non-penetrating deep sclerectomy, viscoelastic, complications of glaucoma operations.

Egorova E.V. – honored scientist of the RF, professor, head of department of glaucoma surgery,
e-mail: ev_egorova@rambler.ru

Sidorova A.V. – ophthalmosurgeon of department of glaucoma surgery, e-mail: sidorovamntk@gmail.com

Opletina A.V. – postgraduate student, e-mail: anna.mntk@mail.ru

Eremenko I.L. – postgraduate student, e-mail: eil-86@mail.ru

Shormaz I.N. – ophthalmologist, e-mail: irishor@yandex.ru

ПРИМЕНЕНИЕ ИМПЛАНТАТА ДЛЯ РАСШИРЕНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ ОБЪЕМА ШЛЕММОВА КАНАЛА В ХИРУРГИИ ГЛАУКОМЫ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Иван Александрович ЛИХ, Владимир Васильевич КАШНИКОВ

ООО Офтальмологическая клиника «Эксиммер»
630005, г. Новосибирск, ул. Семьи Шамшиных, 58

Разработано устройство для расширения и поддержания объема шлеммова канала и оценена возможность его применения в хирургическом лечении первичной открытоугольной глаукомы. Имплантат из никелида титана в виде разомкнутого кольца диаметром 11 мм представляет собой полую трубку с многочисленными перфорациями различной площади. Внешний диаметр стента – 245 мкм, внутренний – 150 мкм. Выполняли стандартную непроникающую глубокую склерэктомия, в устье шлеммова канала вводили 1,4%-й раствор гиалуроната натрия, проводили бужирование просвета венозного синуса и имплантировали стент. Изучение макропрепарата выявило отсутствие повреждений трабекулярной сети и дефектов в десцеметовой мембране. Во всех случаях имплантат полностью находился в просвете шлеммова канала.

Ключевые слова: открытоугольная глаукома, шлеммов канал, никелид титан, стент.

Глаукома относится к социально значимым заболеваниям, занимая второе место среди причин слепоты. По данным Н.А. Quigley с соавторами, предположительно в 2040 г. будет насчитываться около 111,8 млн человек по всему миру с верифицированным диагнозом «глаукома» [15]. В Российской Федерации глаукома занимает одно из первых мест по причинам инвалидности, связанной со зрительным аппаратом, – 28 % от общего количества слепых и слабовидящих людей. Отмечалось увеличение распространенности глаукомы с 0,5 до 0,6 на 10 000 взрослого населения в период с 2001 по 2006 г. [2].

Глаукома относится к прогрессирующим заболеваниям, приводящим к слепоте. Применение местного медикаментозного лечения не во всех случаях эффективно в достижении давления цели. Замечено, что длительное применение гипотензивных препаратов снижает эффективность последующей антиглаукоматозной операции [11]. С момента появления таких операций, как синусотомия и непроникающая глубокая склерэктомия [1, 8], удалось уменьшить частоту осложнений, ассоциированных с фистулизирующими операциями [17, 18]. Но, устраняя блоки прохождения внутриглазной жидкости на уровне шлеммова канала и глубоких слоев трабекулярного аппарата [3], непроникающие операции ухудшают функцию естественных дренажных путей [3, 9, 14].

Первым, кто попытался решить данную проблему, был R. Stegmann, разработавший и внедривший в клиническую практику вискоканалостомию [16]. С целью устранения реколлапса шлеммова канала после вискоканалостомии в просвет венозного синуса склеры стали вводить полипропиленовую нить 10-0. Методика получила название каналопластики [13].

Идея повышения функциональной активности шлеммова канала и коллекторных канальцев нашла свое применение и в динамически развивающемся направлении микроинвазивной хирургии глаукомы (MIGS), где используется имплантат iStent (Glaukos, США), исследуется клиническая значимость имплантата Hydrus (Ivantis, США). Свое решение данной проблемы предложили В. Кумар с соавторами, использовав спираль из медицинской стали длиной 5–6 мм для расширения просвета шлеммова канала. Авторы отмечают, что только в 14,7 % случаев удалось полностью имплантировать стент, и лишь в 50 % – достигнуть давления цели без применения дополнительных гипотензивных препаратов [10].

В настоящее время большое внимание уделяется использованию никелида титана в качестве дренажа при хирургии глаукомы. I. Grierson с соавторами провели исследование по биосовместимости дренажа из никелида титана, который был имплантирован в просвет шлеммова канала глаз

Лих И.А. – аспирант кафедры офтальмологии НГМУ, e-mail: Likh80@mail.ru

Кашников В.В. – д.м.н., академик РАЕН, e-mail: vova-kash@yandex.ru

обезьян и интрасклерально в глазах кроликов. Электронная микроскопия и гистологическое исследование не выявили выраженного острого и хронического воспаления, отсутствовала грануляционная ткань, а также фиброз в просвете шлеммового канала и окружающей ткани [12]. В литературе представлены гистоморфологические и иммунологические исследования воздействия нитинола на живой организм [5, 6].

Можно утверждать, что вопрос о разработке и внедрении в клиническую практику устройства для расширения и поддержания функциональной активности шлеммова канала и коллекторных канальцев остается актуальным. При этом изделие должно быть не только функциональным, но и удобным в практическом применении. В связи с этим целью нашего исследования явилась разработка оптимального устройства для расширения и поддержания объема шлеммова канала собственной конструкции и оценка возможности его применения в эксперименте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования выбран сплав эвтектичного состава никеля и титана – нитинол. Никелид титана уже длительное время применяется в медицине, в том числе и в офтальмологии [7]. Имплантат представляет собой полую трубку с многочисленными перфорациями различной площади. Его внешний диаметр составляет 245 мкм, внутренний – 150 мкм. Имплантату придана форма разомкнутого кольца диаметром 11 мм. Материал разрешен для медицинского применения, получен патент на полезную модель [4]. В качестве инструмента для бужирования шлеммова канала выбрано изделие Glaucolight (DORC, Нидерланды). Оптическое волокно имеет диаметр основной части 150 мкм, светорассеивающий кончик – 250 мкм. Устройство позволяет эффективно визуализировать прохождение бужа на всем протяжении венозного синуса склеры.

Изучение технической возможности имплантации представленного стента выполнено на двух энуклеированных глазах с терминальной глаукомой, на которых ранее не проводилось медикаментозное лечение или любое хирургическое вмешательство. Глаза фиксировались в держателе для глазного яблока, разработанном ООО Научно-экспериментальное производство Микрохирургия глаза. В ходе исследования внутриглазное давление контролировалось пальпаторно на уровне нормотензии.

Оперативное пособие осуществлялось следующим образом: выполнялась непроникающая глубокая склерэктомия по стандартной техно-

логии, предложенной С.Н. Федоровым и соавт. [8]. После обнажения периферического участка десцеметовой оболочки и удаления эндотелия и юкстаканаликулярной ткани в устье шлеммова канала вводили вискоэластичную субстанцию (1,4%-й гиалуронат натрия). Далее проводились бужирование шлеммова канала на всем протяжении и имплантация стента после предварительного нанесения вискоэластика на его поверхность.

Ультразвуковая биомикроскопия (Sonomed Escalon™, США) проводилась для определения положения имплантата. На макропрепарате изучено расположение стента, оценивалась целостность трабекулярной сети.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Представленное изделие из никелида титана имеет гибкую структуру, перфорации не изменяют форму имплантата. Предлагаемый стент прочен при избыточном сгибании и разгибании.

При проведении бужирования шлеммова канала не возникло трудности с прохождением оптоволоконка. Предварительное расширение диаметра шлеммова канала изделием Glaucolight, по нашему мнению, обеспечило более безопасное проведение имплантата внутри склерального синуса, так как диаметр светорассеивающего кончика оптоволоконка незначительно превышает внешний диаметр стента из никелида титана и оптоволоконно более эластично, чем нитинол. В ходе имплантации стента выявлены трудности при его введении в виде целого кольца, что, возможно, связано с ригидностью нитинола, наличием остаточных септ внутри шлеммова канала, попаданием изделия в устье коллекторного канальца.

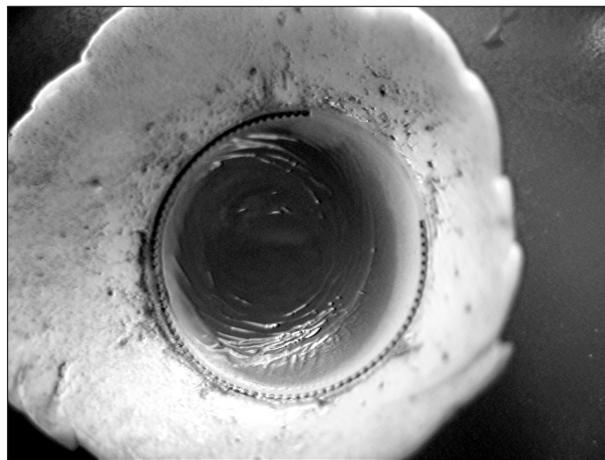


Рис. 1. Макропрепарат. Стент находится в просвете шлеммова канала. Целостность трабекулярной сети сохранена, отслойки десцеметовой мембраны нет

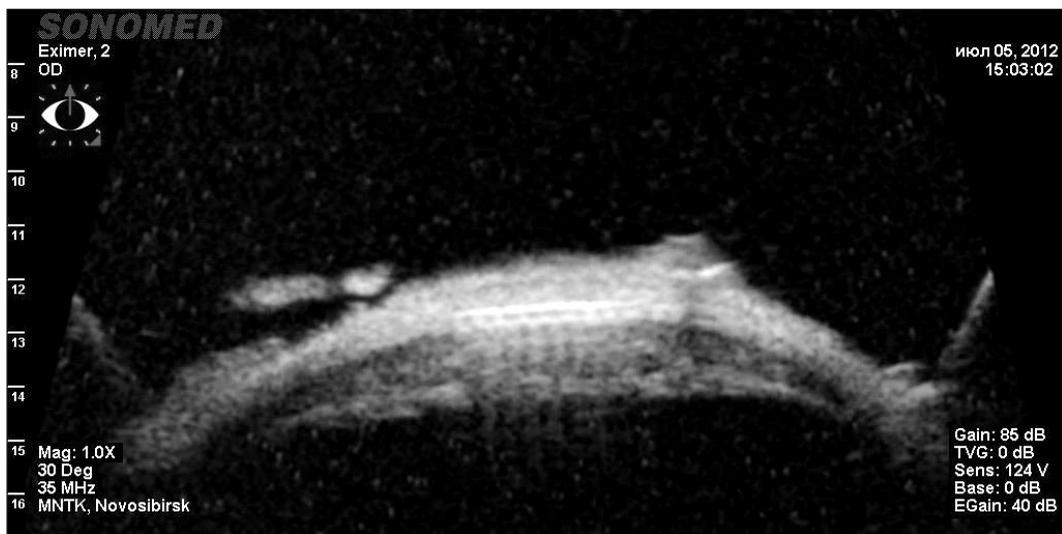


Рис. 2. Стент находится в просвете шлеммова канала, хорошо визуализируется его перфорированная структура

В этом случае кольцо делилось на два сегмента, которые последовательно имплантировали в носовую и височную части венозного синуса, начиная от зоны склерэктомии. В ходе эксперимента не было формирования ложного хода, разрыва трабекулярной сети, отслойки десцеметовой оболочки.

Изучение макропрепарата выявило отсутствие сквозного повреждения трабекулярной сети и дефектов в десцеметовой мембране. Во всех случаях имплантат полностью находился в просвете шлеммова канала (рис. 1). Ультразвуковая биомикроскопия на двух глазах выявила правильное положение имплантата на всем протяжении канала (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эксперименте доказана возможность имплантации дренажа из никелида титана предложенной нами конструкции в глаза при диагнозе «терминальная глаукома», на которых ранее не выполнялось хирургическое вмешательство, не проводилось медикаментозное лечение. Имплантация стента возможна после предварительной вискоканалостомии и бужирования шлеммова канала. Размер и форма предлагаемого нами изделия (внешний и внутренний диаметры 245 и 150 мкм соответственно, разомкнутое кольцо диаметром 11 мм), по нашему мнению, являются оптимальными для расширения и поддержания объема шлеммова канала с минимальным риском деформации и повреждения окружающих тканей. В ходе эксперимента стент был разделен на два сегмента для оптимизации прохождения в просвете склерального синуса. Полученные данные

являются основой для проведения дальнейших клинических исследований по оптимизации методов хирургического лечения глаукомы.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность директору НФ ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Минздрава России д.м.н., профессору В.В. Черных и врачу-офтальмологу М.А. Диковской за помощь в проведении ультразвукового исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краснов М.М. Синусотомия при глаукоме // Вестн. офтальмологии. 1964. (2). 37–41.
2. Либман Е.С., Шахова Е.В. Слепота и инвалидность вследствие патологии органа зрения в России // Вестн. офтальмологии. 2006. (1). 35–37.
3. Нестеров А.П. Глаукома. М., 2008. 357 с.
4. Пат. 126593 РФ. Расширительное устройство для снижения избыточного внутриглазного давления / И.А. Лих, К.Б. Першин, В.В. Кашников; опубл. 04.09.2012.
5. Стеблюк А.Н., Колесникова Н.В. Локальный цитокиновый статус лабораторных животных при экспериментальной интрасклеральной имплантации дренажа на основе никелида титана // Междунар. конгр. «Глаукома: теории, тенденции, технологии». М., 2013. 250–253.
6. Стеблюк А.Н., Могильная Г.М. Сравнительная морфогистохимическая характеристика тканей глаза при имплантации монолитного и пористого никелида титана в эксперименте на кроликах // Офтальмол. ведомости. 2012. 3. 29–35.

7. Федоров А.В., Коллеров М.Ю., Рудаков С.С., Королев П.А. Применение нанотехнологически структурированного никелида титана в медицине // Хирургия. 2009. (2). 71–74.
8. Федоров С.Н., Козлов В.И., Тимошкина Н.Т. и др. Непроницающая глубокая склерэктомия при открытоугольной глаукоме // Офтальмохирургия. 1989. (3). 52–55.
9. Шмырева В.Ф. К патогенетическому обоснованию эффекта действия основных микрохирургических и консервативных методов лечения глауком: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1988.
10. Кумар В., Фролов М.А., Божок Е.В., Душина Г.Н. Применение устройства собственной конструкции в хирургии шлеммова канала. Предварительные результаты // Междунар. конгр. «Глаукома: теории, тенденции, технологии». М., 2013. 184–187.
11. Broadway D., Grierson I., O'Brien C., Hitchings R. Adverse effects of topical antiglaucoma medications. The outcome of filtration surgery // Arch. Ophthalmol. 1994. 112. 1437–1440.
12. Grierson I., Saheb H., Kahook M.Y. et al. A novel Schlemm's canal scaffold: Histologic observations // J. Glaucoma. 2013. [Epub ahead of print]. doi 0.1097/IJG.0000000000000012.
13. Grieshaber M.C., Pienaar A., Olivier J. et al. Canaloplasty for primary openangle glaucoma: long-term outcome // Br. J. Ophthalmol. 2010. 94. (11). 1478–1482.
14. Johnson D.N., Matsumoto Y. Schlemm's canal becomes smaller after successful filtration surgery // Arch. Ophthalmol. 2000. 118. 1251–1256.
15. Quigley H.A., Tham Y.C., Li X. et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis // Ophthalmology. 2014. 121. 2081–2090.
16. Stegmann R., Pienaar A., Miller D. Viscocanalostomy for open-angle glaucoma in black African patients // J. Cataract. Refract. Surg. 1999. 25. (3). 316–322.
17. Tornqvist G., Drolsum L.K. Trabeculectomies. A long-term study // Acta Ophthalmol. (Copenh). 1991. 69. 450–454.
18. Watson P.G., Jakeman C., Ozturk M. et al. The complications of trabeculectomy (a 20-y follow-up) // Eye. 1990. 4. 425–438.

THE USE OF THE IMPLANT FOR THE EXPANSION AND MAINTENANCE OF SCHLEMM'S CANAL IN SURGERY OF GLAUCOMA (EXPERIMENTAL STUDY)

Ivan Aleksandrovich LIKH, Vladimir Vasil'evich KASHNIKOV

*Ophthalmologic Clinic «Excimer»
630005, Novosibirsk, Semyi Shamshinyh str., 58*

The device for expanding and maintaining of Schlemm's canal has been developed and its application to the surgical treatment of primary open-angle glaucoma has been estimated. The titanium nickelide implant in the form of the open ended ring with the diameter of 11 mm is made as the hollow tube with multiple perforations of different sizes. The stent external diameter is 245 μm , the internal – 150 μm . The standard non-penetrating deep sclerectomy has been carried out; 1.4 % sodium hyaluronate solution was introduced into the Schlemm's canal mouth, the bouginage of the venous sinus lumen was conducted and stent was implanted. The gross specimen examination revealed the trabecular reticulum and Descemet's membrane integrity. In all cases, the implant was entirely in Schlemm's canal.

Key words: open-angle glaucoma, Schlemm's canal, titanium nickelide, stent.

*Likh I.A. – postgraduate student, e-mail: Likh80@mail.ru
Kashnikov V.V. – doctor of medical sciences, e-mail: vova-kash@yandex.ru*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИСПАНСЕРИЗАЦИИ РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Елена Валерьевна ГАЛКИНА¹, Александр Юрьевич БЫКОВ¹,
Галина Александровна ДЮБАНОВА¹, Никита Львович ТОВ²,
Наталья Николаевна ПИКАЛОВА², Елена Анатольевна МОВЧАН²

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

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

Результаты диспансерного наблюдения реципиентов почечного трансплантата в Новосибирском областном нефрологическом центре за 2001–2013 гг. изучены у 201 пациента. Рассчитаны выживаемость пациентов, выживаемость трансплантата и показатели связанного со здоровьем качества жизни по опроснику SF-36. Пятилетняя выживаемость пациентов была на уровне среднего российского показателя (93,5 %), пятилетняя выживаемость трансплантата превышала средний российский показатель (89,5 %). Эффективность диспансеризации реципиентов почечного трансплантата в Новосибирском областном нефрологическом центре подтверждается данными о качестве жизни пациентов.

Ключевые слова: терминальная почечная недостаточность, аллотрансплантация почки, выживаемость почечного аллотрансплантата, выживаемость реципиентов почечного трансплантата, качество жизни реципиентов почечного трансплантата.

Данные мировой статистики свидетельствуют, что ежегодное увеличение числа больных с терминальной почечной недостаточностью (ТПН) в пять раз превышает темпы роста населения мира. Такому интенсивному росту способствуют глобальное старение населения, распространенность сахарного диабета и артериальной гипертензии, а также повышение продолжительности жизни больных с ТПН при использовании различных видов заместительной почечной терапии [2]. Аллотрансплантация почки (АТП) обеспечивает лучшую долговременную выживаемость пациентов с ТПН при наиболее низких совокупных затратах на лечение по сравнению с диализными методами и признана одним из главных достижений современной медицины [1, 4]. В то же время отдаленные результаты лечения в различных центрах существенно различаются.

До настоящего времени эффективность диспансерного наблюдения реципиентов почечного трансплантата (РПТ) в нефрологических центрах Сибирского региона не изучалась.

Наряду с объективными показателями здоровья, все большую актуальность приобретает субъективная оценка качества жизни (КЖ) реципиентами почечного трансплантата. Качество жизни отражает не только соматическое состояние и эффективность лечения пациентов, но является также предиктором долгосрочной выживаемости и отторжения трансплантата независимо от клинических и социально-демографических факторов риска [8]. Работы, характеризующие КЖ российской популяции больных после АТП, единичны [3, 6].

Целью настоящего исследования явилось изучение эффективности диспансерного наблюдения

Галкина Е.В. – зав. отделением нефрологии, главный нефролог Новосибирской области,
e-mail: galkina@oblmed.nsk.ru

Быков А.Ю. – зав. отделением по пересадке органов, главный трансплантолог Новосибирской области,
e-mail: Aklbykov@yandex.ru

Дюбанова Г.А. – к.м.н., врач-нефролог, e-mail: dugali@ngs.ru

Тов Н.Л. – д.м.н., проф., зав. кафедрой внутренних болезней, e-mail: nikita.tov@gmail.com

Пикалова Н.Н. – аспирант кафедры внутренних болезней, e-mail: picnata@mail.ru

Мовчан Е.А. – д.м.н., проф. кафедры внутренних болезней, e-mail: eamovchan@gmail.com

РПТ в Новосибирской области с учетом выживаемости пациентов и почечного трансплантата, а также качества жизни, связанного со здоровьем.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены данные о 201 РПТ, находившихся на диспансерном наблюдении в Областном нефрологическом центре на базе ГБУЗ НСО Государственная Новосибирская областная клиническая больница на 31.12.2013. Диспансеризация проводилась по общепринятому стандарту медицинской помощи больным с трансплантированными органами и (или) тканями (приказ Минздравсоцразвития РФ № 702 от 14.11.2007). РПТ получали современную иммуносупрессивную терапию, в большинстве случаев (82 % пациентов) по трехкомпонентной схеме, включающей ингибиторы кальциневрина (циклоsporин, такролимус), микофенолаты (микофеноловая кислота, микофенолата мофетил) и глюкокортикостероиды.

В процессе наблюдения у 44 РПТ диагностирована утрата функции трансплантата и осуществлен возврат на гемодиализ (в последующем 11 из них была выполнена повторная пересадка почки), 12 больных умерли от разных причин, трое сменили место жительства. Возраст пациентов колебался от 15 до 68 лет (в том числе от 15 до 18 лет – 3,6 %, 19–44 лет – 74,1 %, 45–64 лет – 21,8 % и 65–68 лет – 0,5 %). Мужчин было 133 человека (66,2 %), женщин – 68 (33,8 %). Жителями города являлись 66 % наблюдающихся, 34 % проживали в районах области. 88 % РПТ были прооперированы в ГБУЗ НСО Государственная Новосибирская областная клиническая больница и 12 % – в других трансплантационных центрах РФ (в том числе в Новосибирском НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина МЗ России) и за границей (Германия, Казахстан, Китай, Израиль). 14 реципиентов (7 %) получили трансплантат от живого родственного донора. После повторных АТП наблюдалось 11 человек (5,5 %). 16 пациентам (8 %) была выполнена додиализная АТП.

Для расчета 5-летней выживаемости РПТ и выживаемости трансплантата использовали метод Каплана – Мейера. Учитывали прошедшее время в месяцах, начиная с 3-го месяца от АТП до наступления критического события (соответственно смерть пациента или утрата функции трансплантата с возвратом на программный диализ).

Из общей группы по критериям включения/исключения были отобраны 86 РПТ (основная группа) и 76 гемодиализных пациентов (группа сравнения). Критериями включения явились под-

писанное информированное согласие, возраст от 18 до 59 лет, наличие ТПН, длительность заместительной почечной терапии методом трансплантации почки или программного гемодиализа не менее 6 месяцев, критериями исключения – злокачественные новообразования IV степени, патологические переломы, ограничивающие самообслуживание, психические заболевания, госпитализация в круглосуточный стационар на момент исследования, осложненный сосудистый доступ (в том числе сосудистый протез) у гемодиализных пациентов. Больные на гемодиализе были сопоставимы по полу и возрасту с основной группой. В обеих группах проведено одномоментное анкетирование с использованием русскоязычной версии опросника «The Medical Outcomes Study 36-Item Short-Form Health Survey» (SF-36). Для оценки качества жизни, связанного со здоровьем, 36 пунктов опросника сгруппированы в 8 шкал: физическое функционирование, т. е. способность выдерживать физические нагрузки (ФФ); ролевое физическое функционирование, отражающее влияние физического состояния на повседневную деятельность (РФФ); интенсивность боли и ее влияние на повседневную деятельность (Б); общее состояние здоровья (ОЗ); общая активность, витальность (энергичность) (Э); социальное функционирование (СФ); ролевое эмоциональное функционирование, характеризующее влияние эмоционального состояния на повседневную деятельность (РЭФ); психическое здоровье (ПЗ). На основе полученных данных рассчитывались интегральные параметры физического компонента здоровья (ФКЗ) и психического компонента здоровья (ПКЗ) [5]. У 8 пациенток с ТПН оценка КЖ выполнена на этапе диализного лечения и через 6–16 мес. после АТП.

При выполнении статистической обработки результатов рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (σ). Достоверность различий между двумя группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента и теста Манна – Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие службы трансплантации органов и тканей на территории Новосибирской области обеспечивало ежегодный прирост числа РПТ, требующих долгосрочного наблюдения и лечения. В итоге, если в 2001 г. на диспансерном учете находилось 27 человек, то в 2013 г. – 201 пациент. Таким образом, за последние 13 лет обеспеченность жителей Новосибирской области функционирующим почечным аллотрансплан-

Таблица 1

Распределение пациентов с функционирующим почечным трансплантатом по срокам наблюдения ($n = 201$)

Срок наблюдения, лет	Количество пациентов с функционирующим почечным трансплантатом	
	n	%
Менее 1	20	9,9
1–2	26	12,9
2–3	31	15,4
3–5	67	33,4
5–10	37	18,5
Более 10	20	9,9
Всего	201	100

татом увеличилась с 1,1 до 72,2 на 1 млн населения. Это практически в 2 раза превышает уровень обеспеченности в среднем по России – 41,5 на 1 млн населения [1]. На момент проведения исследования диспансерная группа РПТ Новосибирской области была представлена пациентами с различными сроками функционирования почечного трансплантата (табл. 1). У значительного числа больных (67 пациентов, 33,4 %) срок наблюдения после пересадки почки составил от 3 до 5 лет. Расчет пятилетней выживаемости реципиентов почечного трансплантата показал, что данный показатель в Новосибирской области соответствует среднему по Российской Федерации (соответственно 93,5 и 93,9 %, $p > 0,05$) [1].

За период наблюдения умерло 12 реципиентов трупного трансплантата. Структура летальности РПТ в Новосибирской области не отличается от таковой в Российской Федерации. Основной причиной смерти, прежде всего в первый год после пересадки почки, явились тяжелые инфекционные осложнения (восемь человек, из них четыре случая вирусно-бактериальных пневмоний). У двоих РПТ смерть наступила от фатальных сердечно-сосудистых осложнений (инфаркт миокарда и нарушения ритма). У одного больного летальный исход последовал в результате уремии и отказа пациента вернуться на гемодиализ и в одном случае причиной смерти явился цирроз печени с профузным кровотечением из варикозно-расширенных вен пищевода. Превалирование инфекций и сердечно-сосудистых заболеваний характеризует летальность реципиентов почечного трансплантата не только у нас в стране, но и в мире [2, 4, 8].

Пятилетняя выживаемость почечного аллотрансплантата в Новосибирской области дости-

Таблица 2

Причины утраты функции почечного аллотрансплантата ($n = 44$)

Причина утраты функции АТП	Число пациентов	
	n	%
Острый криз отторжения	2	4,6
Хроническое отторжение	12	27,3
Хроническая трансплантационная нефропатия	8	18,2
Хронический гломерулонефрит (возвратный и <i>de novo</i>)	7	15,9
Тромботическая микроангиопатия	4	9,1
Первичный оксалоз	3	6,8
Острый пиелонефрит	1	2,2
ВКВ-нефропатия	4	9,1
Неуточненная	3	6,8
Всего	44	100

гает 89,5 %. В среднем по Российской Федерации этот показатель несколько ниже и равняется 82,9 % [1].

Самой частой причиной утраты функции почечного аллотрансплантата (у 27,3 % больных) являлось хроническое отторжение (табл. 2). Основную роль в прекращении функции пересаженной почки играли хроническая трансплантационная нефропатия и гломерулонефриты трансплантата (соответственно 18,2 и 15,9 % пациентов). Обращает на себя внимание наличие в структуре причин гибели трансплантата почки таких трудных для диагностики и лечения заболеваний, как тромботическая микроангиопатия и ВКВ-нефропатия (по 9,1 %). Аналогичные причины развития почечной недостаточности трансплантата отмечали и другие авторы [7].

Результаты анкетирования группы респондентов – реципиентов почечного аллотрансплантата – и сопоставление полученных данных с уровнем качества жизни пациентов, получающих программный гемодиализ в условиях Областного диализного центра, обобщены в табл. 3. Реципиенты почечного аллотрансплантата давали более высокую, превышающую в среднем 50 баллов, оценку своему здоровью по всем шкалам опросника SF-36. Значимые различия между основной группой и группой сравнения касались выраженности болевого синдрома и его влияния на повседневную деятельность по шкале общего здоровья, характеризующей «здоровье в целом», а также энергичности и социального функционирования, т.е. оценке ограничений, накладываемых болезнью и методом лечения на социальную жизнь пациента. Наблюдение за восемью пациентами

Таблица 3

Показатели КЖ реципиентов почечного трансплантата в сравнении с пациентами на ПГД ($M \pm \sigma$)

Показатель шкалы опросника SF-36, баллы	Группа больных		
	РПТ ($n = 86$)	ПГД ($n = 76$)	p
ФФ	74,5 ± 19,9	69,3 ± 21,3	0,115
РФФ	48,8 ± 40,0	48,7 ± 41,8	0,971
Б	76,8 ± 24,1	58,0 ± 25,7	0,001
ОЗ	56,1 ± 18,2	47,5 ± 17,4	0,001
Э	65,8 ± 15,9	56,6 ± 20,4	0,002
СФ	77,1 ± 20,9	68,4 ± 24,2	0,024
РЭФ	68,2 ± 38,9	64,9 ± 41,8	0,717
ПЗ	67,6 ± 14,6	66,5 ± 16,0	0,499
ФКЗ	48,4 ± 8,0	46,5 ± 7,6	0,126
ПКЗ	48,4 ± 9,0	46,9 ± 9,4	0,217

на этапе диализного лечения и через 6–16 мес. после пересадки почки подтвердило обнаруженную закономерность и показало, что улучшение качества жизни наступает уже в ранние сроки после операции. Достоверно и объяснимо по сравнению с периодом диализной терапии повышаются оценки по физическим шкалам: боли (с $55,6 \pm 18,1$ до $86,1 \pm 17,7$ балла, $p = 0,012$) и общего здоровья (с $48,9 \pm 9,4$ до $72,1 \pm 10,4$ балла, $p = 0,012$). Безусловно, это связано со значительными позитивными изменениями в объективных параметрах здоровья у больных ТПН после АТП. Важно, что на обратную тесную связь качества жизни с исходами АТП указывают результаты проспективных многолетних исследований [7, 8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на территории Новосибирской области сложилась целостная система оказания помощи больным ТПН, включающая аллотрансплантацию донорской почки и последующее диспансерное наблюдение реципиентов. Результативность проводимой работы подтверждается данными о выживаемости реципиентов и выживаемости почечных аллотрансплантатов,

которые являются одними из самых высоких в Российской Федерации.

Наряду с указанными объективными показателями, оценка качества жизни, даваемая пациентами с пересаженной почкой в ходе диспансерного наблюдения и лечения в Областном нефрологическом центре, подтверждает адекватность, высокий уровень и эффективность комплекса проводимых организационных и лечебно-диагностических мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. Заместительная терапия больных с хронической почечной недостаточностью методами перитонеального диализа и трансплантации почки в Российской Федерации в 1998–2011 г. // Нефрология и диализ. 2014. 16. (2). 208–223.
2. Гарсия Г.Г., Харден П., Чапман Д. Глобальная роль пересадки почки // Нефрология и диализ. 2011. 13. (4). 382–387.
3. Гендлин Г.Е., Тронина О.А., Сторожаков Г.И. и др. Исследование качества жизни пациентов, получающих заместительную почечную терапию гемодиализом и после АТП, с помощью универсального опросника SF-36 // Нефрология и диализ. 2005. 7. (3). 284–285.
4. Готье С.В., Мойсюк Я.Г., Хомяков С.Н., Ибрагимова О.С. Органное донорство и трансплантация в Российской Федерации в 2011 г. VI сообщение регистра Российского трансплантологического общества // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. 2012. 3. 6–18.
5. Новик А.А., Матвеев Т.И., Ионова Т.И. и др. Оценка качества жизни больного в медицине // Клиническая медицина. 2000. (2). 10–13.
6. Петров Н.Н. Концепция качества жизни у больных на заместительной почечной терапии // Нефрология и диализ. 2002. 4. (1). 9–14.
7. Griva K., Davenport A., Newman S.P. Health-related quality of life and long-term survival and graft failure in kidney transplantation: a 12-year follow-up study // Transplantation. 2013. 95. (5). 740–774.
8. Monlar-Varga M., Monlar M. Z., Szeifert L. et al. Health-related quality of life and clinical outcomes in kidney transplant recipients // Am. J. Kidney Dis. 2011. 58. (3). 444–452.

EFFICIENCY OF CLINICAL OBSERVATION OF RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS IN THE NOVOSIBIRSK REGION

Elena Valeryevna GALKINA¹, Aleksandr Yuryevich BYKOV¹,
Galina Aleksandrovna DYUBANOVA¹, Nikita Lyvovich TOV²,
Natalia Nikolaevna PIKALOVA², Elena Anatolyevna MOVCHAN²

¹ State Novosibirsk Regional Clinical Hospita
630087, Novosibirsk, Nemirovich-Danchenko str., 130

² Novosibirsk State Medical University
630091, Novosibirsk, Krasniy av., 52

The result of clinical observation of renal transplant recipients in the Novosibirsk Regional Nephrology Center for 2001–2013 was studied in 201 patients. The patient survival, allograft survival and indicators of health-related quality of life questionnaire SF-36 have been evaluated. Five-year survival of renal transplant recipients was at the level of average Russian rate (93.5 %). Five-year allograft survival exceeded the national average rate (89.5 %). The efficiency of clinical observation of renal transplant recipients in the Novosibirsk Regional Nephrology Center is supported by the data on the quality of life of patients.

Key words: chronic renal failure, end-stage kidney (renal) disease, kidney allograft, survival of renal allograft, survival of kidney transplant recipients, the quality of life of renal transplant recipients.

Galkina E.V. – head department of nephrology, chief nephrologist of Novosibirsk Region,
e-mail: galkina@oblmed.nsk.ru

Bykov A.Yu. – head of department of organ transplant, chief transplantologist of Novosibirsk Region,
e-mail: Aklbykov@yandex.ru

Dyubanova G.A. – candidate of medical sciences, nephrologist, e-mail: dugali@ngs.ru

Tov N.L. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of internal medicine,
e-mail: nikita.tov@gmail.com

Pikalova N.N. – postgraduate student of the department of internal medicine, e-mail: picnata@mail.ru

Movchan E.A. – doctor of medical sciences, professor of the department of internal medicine,
e-mail: eamovchan@gmail.com

КОНЦЕНТРАЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И ЦИТОКИНОВ В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОАРТРОЗОМ ПРИ НАЛИЧИИ И ОТСУТСТВИИ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ СИНОВИТА

Марина Владимировна ЧЕПЕЛЕВА, Наталья Владимировна САЗОНОВА,
Елена Ивановна КУЗНЕЦОВА

ФГБУ Российский научный центр Восстановительная травматология и ортопедия
им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России
640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6

Изучено содержание цитокинов и иммуноглобулинов в синовиальной жидкости 46 пациентов на ранних и поздних стадиях остеоартроза (ОА) коленного сустава при наличии и отсутствии клинических признаков синовита. Количественное определение концентраций IgA, IgM, IgG, IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10, IL-8, IFN γ осуществлялось иммуноферментным методом. Наиболее выраженные иммунологические изменения были выявлены у пациентов с наличием синовита. При этом у больных с ранней стадией ОА и клиническими признаками острого синовита в синовиальной жидкости определялись более высокие концентрации иммуноглобулинов и цитокинов, чем при остеоартрозе II–III стадии при отсутствии синовита. Наиболее информативными в плане диагностики воспалительного процесса в околосуставных тканях оказались IgG, IL-1 β , IL-6. Полученные данные можно использовать в качестве диагностических и прогностических критериев развития воспалительного процесса в околосуставных тканях у пациентов на этапах амбулаторно-поликлинического и хирургического лечения ОА.

Ключевые слова: остеоартроз, синовит, иммуноглобулины, цитокины.

Несмотря на современные достижения медицины, до настоящего времени лечение больных с патологией крупных суставов остается актуальной проблемой. Остеоартроз (ОА) поражает синовиальные суставы и характеризуется уменьшением массы гиалинового хряща с remodelированием субхондральной кости, формированием остеофитов и воспалением синовиальной мембраны [1].

Синовит при ОА характеризуется повышенным образованием провоспалительных цитокинов, в том числе TNF α , простагландинов, лизосомальных ферментов, металлопротеиназ и других ферментов, которые не только поддерживают воспаление в суставе, но и усиливают катаболические процессы в хрящевой и субхондральной костной ткани сустава [5]. Сложная сеть взаимодействий цитокинов, ферментов, свободных радикалов и продуктов распада матрикса приводит к уменьшению содержания протеогликанов в хряще (молекулярный уровень), нарушению архитектоники матрикса (макромолекулярный

уровень), появлению микротрещин (микроскопический уровень) и надрывам хряща (макроскопический уровень). Согласно литературным данным, уровень цитокинов и иммуноглобулинов в синовиальной жидкости пациентов с ОА повышен. При этом отсутствует сравнительная характеристика концентраций цитокинов в зависимости от стадии ОА и наличия воспалительных осложнений.

Цель настоящей работы – изучить содержание иммуноглобулинов и цитокинов в синовиальной жидкости больных ОА в зависимости от стадии заболевания, а также наличия и отсутствия синовита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 16 пациентов с остеоартрозом I стадии и острым синовитом коленного сустава (I группа), 10 пациентов с ОА коленного сустава II стадии, осложненным хроническим синовитом (II группа) и 20 больных ОА коленного сустава

Чепелева М.В. – к.м.н., старший научный сотрудник научно-клинической лаборатории микробиологии и иммунологии, e-mail: Vladi_2000@hotmail.ru

Сазонова Н.В. – д.м.н., зав. консультативно-диагностическим отделением, e-mail: nv.sazonova@yandex.ru

Кузнецова Е.И. – младший научный сотрудник научно-клинической лаборатории микробиологии и иммунологии, e-mail: citoz@mail.ru

II–III стадии без признаков синовита (III группа) в возрасте от 30 до 55 лет. Больные распределены по стадиям артроза согласно рентгенологическим признакам [2]. Синовит коленного сустава был установлен на основании клинических данных (дефигурация контуров коленного сустава, увеличение объема мягких тканей пораженного сустава в сравнении с интактным) и данных ультразвукового исследования (расширения верхнего заворота коленного сустава, утолщения синовиальной оболочки более 1,0 мм). Все обследуемые предъявляли жалобы на боли в коленных суставах, иррадиирующие на переднюю поверхность голени, на быстро появляющееся чувство усталости в икроножных мышцах и голеностопных суставах. Давность заболевания в I группе составляла от одного дня до одного месяца, во II группе – от трех месяцев до двух лет, в III группе – более пяти лет. В анамнезе пациентов I группы отмечались травмы, ушибы коленных суставов при падении, занятиях спортом. При этом температура и показатели клинического анализа крови были в пределах нормы. Во II группе регистрировались в детстве лечение по поводу остеохондропатии бугристости большеберцовой кости, подвывихи надколенника, в III группе – работа в сельском хозяйстве и на тяжелом промышленном производстве.

Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное добровольное согласие на медицинское вмешательство и публикацию данных, полученных в результате исследования, без идентификации личности.

Концентрацию IgA, IgM, IgG, IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10, IL-8, IFN γ в синовиальной жидкости определяли иммуноферментным мето-

дом на иммуноферментном анализаторе BIO-TEK Instruments Inc, ELx808 (США) (рег. ФС № 2006/2919 от. 26.12.2006) с использованием набора реагентов ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск. Забор синовиальной жидкости производили в стерильную пробирку во время хирургического вмешательства.

Полученные результаты обработаны с помощью методов непараметрической статистики с использованием U-критерия Вилкоксона для независимых выборок, поскольку наблюдаемые признаки не подчинялись нормальному распределению. Результаты представлены в виде медиан и интерквартильных размахов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В норме в синовиальной жидкости иммуноглобулины классов А и М не обнаруживаются, определяются незначительные количества иммуноглобулинов класса G (не более 0,5 мг/мл) [3]. У пациентов с ОА II–III стадии независимо от наличия или отсутствия синовита в очень небольших количествах был выявлен IgA (основной иммуноглобулин секретов слизистых оболочек) (см. таблицу). Более высокие его концентрации определялись в синовиальной жидкости больных ОА I стадии с сопутствующим синовитом. IgM был обнаружен в синовиальной жидкости пациентов всех исследуемых групп, но в разных концентрациях: у больных с ОА без клинических признаков синовита IgM – в очень малых, практически следовых количествах, а наиболее высокое содержание IgM регистрировалось при ОА I стадии с клиническими признаками острого синовита.

Таблица

Содержание иммуноглобулинов и цитокинов в синовиальной жидкости больных с остеоартрозом

Показатель (содержание)	ОА II–III стадии без признаков синовита	ОА I стадии с острым синовитом	ОА II стадии с хроническим синовитом
IgA, мг/мл	0,25 (0,10–0,46)	0,50* (0,41–0,85)	0,26+ (0,15–0,48)
IgM, мг/мл	0,15 (0,08–0,30)	0,51* (0,38–0,60)	0,33+ (0,20–0,40)
IgG, мг/мл	3,2 (2,29–5,20)	7,51* (5,71–12,10)	5,73+ (3,90–6,60)
IL-1 β , пг/мл	0,0 (0,0–0,3)	9,0* (1,2–19,6)	0+ (0,0–5,2)
IL-4, пг/мл	0,6 (0,0–0,9)	0,4 (0,9–1,9)	0,5 (0,0–1,0)
IL-6, пг/мл	73,9 (39,2–242,8)	500,0** (336,0–525,0)	270,53+ (129,1–345,0)
IL-8, пг/мл	12,9 (4,5–38,7)	202,6* (80,2–250,0)	17,4+ (8,9–133,7)
IL-10, пг/мл	1,4 (0,0–6,6)	4,1* (1,0–16,3)	0 (0–3,9)
TNF α , пг/мл	0,23 (0,0–2,9)	2,6* (1,3–5,1)	2,8 (0,0–3,5)
IFN γ , пг/мл	6,1 (2,1–15,3)	31,8* (16,0–282,1)	6,4+ (3,6–10,2)

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей больных ОА без признаков синовита (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$) и больных с острым синовитом (+ – при $p < 0,05$).

Возрастание концентрации данной фракции может свидетельствовать о развитии первичного воспаления и о вовлечении в процесс острофазовых белков, что объясняет наиболее высокое содержание IgM в синовиальной жидкости пациентов с острым воспалительным процессом в околосуставных тканях. Кроме того, наличие IgM в синовиальной жидкости пациентов с длительным течением заболевания может свидетельствовать еще и о наличии постоянной аутоиммунной агрессии, что играет важную роль в патогенезе ОА. Дегенерация хряща сопровождается активным поступлением в синовиальную жидкость продуктов деградации, которые обладают антигенными свойствами и индуцируют выработку аутоантител [10]. В качестве собственных антигенов могут выступать фрагменты молекул протеогликанов и коллагена, мембран хондроцитов и др. Специфические макромолекулы хряща, такие как коллаген II типа и протеогликаны, разрушающиеся при активном синовите, травматизации или микротравматизации, могут восприниматься как чужеродный материал и провоцировать воспалительный процесс.

IgG-антитела преобладают на поздних этапах первичного иммунного ответа или при вторичном иммунном ответе. У пациентов с острым синовитом мы наблюдали наиболее высокие концентрации IgG, которые практически приближались к нормативным показателям сыворотки крови. Достаточно высокое содержание IgG было выявлено в синовиальной жидкости больных ОА II–III стадии (более выраженное при наличии хронического синовита).

Среди медиаторов, ответственных за прогрессирование остеоартроза, ключевое значение имеет IL-1 β . Его мишенями могут быть синовиальные клетки, а также хондроциты и остециты, с чем связана способность разрушать хрящевые и костные ткани при их вовлечении в воспалительный процесс и наоборот [4]. Известно, что в реализации прогрессирования патологических изменений при первичном ОА решающую роль играет гиперпродукция хондроцитами и другими клетками матричных металлопротеиназ (MMPs), включая коллагеназы (MMP-1, -8, -13), ADAMTS (ADAMTS4 и ADAMTS5), стромелизины (MMP-3) и желатиназы (MMP-2, -9) [8]. IL-1 β угнетает экспрессию ингибиторов MMPs, синтез коллагена и протеогликанов, способствует продукции активатора плазминогена и в то же время стимулирует синтез и высвобождение некоторых эйкозаноидов, включая простагландины (PGE) и лейкотриены. IL-1 β стимулирует продукцию активных форм кислорода, способных повреждать суставной хрящ, способствует усиле-

нию апоптоза хондроцитов [9]. IL-1 β и TNF α синергично воздействуют на определенные тканевые структуры, усиливая продукцию коллагеназы хондроцитами хряща, вызывают изменения в субхондральной зоне. Данный эффект обусловлен способностью влиять на формирование остеокластов, способствуя тем самым костной резорбции. Оба цитокина усиливают экспрессию адгезивных молекул на эндотелии венул, способствуя миграции воспалительных клеток и лимфоцитов из сосудистого русла [12, 14].

Вопреки распространенному мнению о высоких концентрациях IL-1 β и TNF α в синовиальной жидкости при ОА, увеличение уровня данных цитокинов мы наблюдали только у пациентов с острым синовитом (см. таблицу). В этой группе также отмечалось максимальное содержание IL-8, главной мишенью которого являются нейтрофилы.

IL-6 в большом количестве выявлялся во всех группах, но наиболее высоким его содержание было в синовиальной жидкости пациентов с острым синовитом. IL-6 – ключевой цитокин, который сочетает эффекты провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, участвуя не только в развитии, но и в ограничении воспалительной реакции. Выступая в синергизме с IL-1 β и TNF α , IL-6 вызывает изменения в субхондральной зоне. IL-6 способен уменьшать потери протеогликанов в период обострения у пациентов с ОА. Данный эффект обусловлен способностью влиять на формирование остеокластов, способствуя тем самым костной резорбции [7, 11].

В группе пациентов с острым синовитом отмечался наиболее высокий уровень IFN γ , который играет важную роль в реализации клеточного иммунного ответа воспалительного типа, активирует остеокласты, усиливая резорбцию костной ткани [6]. У пациентов с острым синовитом также выявлено наибольшее содержание IL-10, являющегося ингибитором активности Th1-клеток. Как известно, IL-10 способствует реализации гуморальных иммунных реакций и выступает в качестве супрессорного цитокина в отношении воспалительных процессов и адаптивных иммунных реакций клеточного типа. IL-10 снижает синтез хондроцитами провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления (PGE2 и т. д.), ингибируя апоптоз хондроцитов [13, 15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют предположить, что развитие ОА происходит при активном участии иммунной системы. Наиболее выраженные иммунологические изменения отмечаются у

пациентов с воспалительным процессом в околоуставных тканях (наличие синовита). При этом у больных с ранней стадией ОА и острым синовитом в синовиальной жидкости выявляются более высокие концентрации иммуноглобулинов и цитокинов, чем при остеоартрозе II–III стадии при отсутствии синовита. К наиболее информативным в плане диагностики воспалительного процесса в околоуставных тканях относятся IgG, IL-1 β , IL-6. Результаты проведенных исследований можно использовать в качестве диагностических и прогностических критериев развития воспалительного процесса в околоуставных тканях на этапах амбулаторно-поликлинического и хирургического лечения ОА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.И., Цветкова Е.С. Остеоартроз: из прошлого в будущее // Науч.-практ. ревматол. (прил.). 2009. (2). 31–37.
2. Косинская Н.С. Дегенеративно-дистрофические поражения костно-суставного аппарата. Л., 1961. 202 с.
3. Матвеева Е.Л., Чепелева М.В. Биохимический и иммунологический состав синовиальной жидкости в норме и при дегенеративно-дистрофических изменениях суставов. М.: Спутник, 2013. 161 с.
4. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
5. Agarwal S., Long P., Seyedain A. et al. A central role for the nuclear factor-kB pathway in anti-inflammatory and proinflammatory actions of mechanical strain // FASEB J. 2003. 17. 899–901.
6. Ghayur T., Banerjee S., Hugunin M. et al. Caspase-1 processes IFN- γ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production // Nature. 1997. 386. 619–623.
7. Chenoufi H.L., Diamant M., Rieneck K. et al. Interleukin-6 in primary human osteoblasts differentiated in vitro from rheumatoid and osteoarthritic bone // J. Cell Biochem. 2001. 81. (4). 666–678.
8. Huskinsson E.C., Berry P., Gishen P. Effects of antiinflammatory drugs on the progression of osteoarthritis of the knee // J. Rheumatol. 1995. 22. 1941–1946.
9. López-Armada M.J., Caramés B., Lires-Deán M. et al. Cytokines, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes // Osteoarthritis Cartilage. 2006. 14. (7). 660–669.
10. Mastbergen S.C., Bijlsma J.W., Lafeber F.P. Synthesis and release of human cartilage matrix proteoglycans are differently regulated by nitric oxide and prostaglandin-E2 // Ann. Rheum. Dis. 2008. 67. (1). 52–58.
11. Sakao K., Takahashi K.A., Arai Y. et al. Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8, and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis // J. Bone Mineral. Metab. 2009. 27. (4). 412–423.
12. Shakibaei M., Schulze-Tanzil G., John T., Mobasheri A. Curcumin protects human chondrocytes from IL-1 β -induced inhibition of collagen type II and β 1-integrin expression and activation of caspase-3: an immunomorphological study // Ann. Anat. 2005. 187. (5–6). 487–497.
13. Schulze-Tanzil G., Zreiqat H., Sabat R. et al. Interleukin-10 and articular cartilage: experimental therapeutic approaches in cartilage disorders // Curr. Gene Ther. 2009. 9. (4). 306–315.
14. Stöve J., Huch K., Günther K.P., Scharf H.P. Interleukin-1 β induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro // Pathobiology. 2000. 68. (3). 144–149.
15. Van Meegeren M.E., Roosendaal G., van Veghel K., Mastbergen S.C., Lafeber F.P. A short time window to profit from protection of blood-induced cartilage damage by IL-4 plus IL-10 // Rheumatology (Oxford). 2013. 52. (9). 1563–1571.

CONCENTRATION OF IMMUNOGLOBULINES AND CYTOKINES IN THE SYNOVIAL FLUID OF OSTEOARTHRITIS PATIENTS IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF CLINICAL SIGNS OF SYNOVITIS

**Marina Vladimirovna CHEPELEVA, Natal'ya Vladimirovna SAZONOVA,
Elena Ivanovna KUZNETSOVA**

*Russian Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopedics n.a. G.A. Ilizarov
of Minzdrav of Russia
640014, Kurgan, M. Ulyanova str., 6*

The content of cytokines and immunoglobulines in synovial fluid of 46 patients has been investigated in early and late stages of osteoarthritis (OA) of the knee joint in the presence and absence of clinical signs of synovitis. Quantitative determination of the concentrations of IgA, IgM, IgG, IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10, IL-8, IFN γ was performed by emmunoenzyme method. The most pronounced immunological changes have been identified in patients with the presence of synovitis. At the same time, the higher concentrations of immunoglobulines and cytokines and clinical signs of acute synovitis in synovial fluid have been revealed in patients with early stage of osteoarthritis than in patients with osteoarthritis of stage II – III in the absence of synovitis. The following immunological parameters: IgG, IL-1 β , IL-6 were the most informative in terms of diagnosis of the inflammatory process in periarticular tissues. The data obtained can be used as diagnostic and prognostic criteria in the development of inflammatory process in periarticular tissues in patients at stages of outpatient and surgical treatment of osteoarthritis.

Kew words: osteoarthros, synovitis, immunoglobulines, cytokines.

Chepeleva M.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of clinical laboratory of microbiology and immunology, e-mail: office@ilizarov.ru

Sazonova N.V. – doctor of medical sciences, head of consultative diagnosis department, e-mail: nv.sazonova@yandex.ru

Kuznetsova E.I. – junior researcher of clinical laboratory of microbiology and immunology, e-mail: citoz@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА НА ЗАПАДНО-СИБИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЕВРОПЕОИДОВ

Павел Сергеевич ОРЛОВ^{1,2}, Динара Евгеньевна ИВАНОЩУК^{1,2},
Светлана Владимировна МИХАЙЛОВА¹, Владимир Николаевич МАКСИМОВ^{2,3},
Михаил Иванович ВОЕВОДА^{1,2}

¹ ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины (НИИТПМ)
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

² ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

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

Цель исследования – в выборке пациентов с сахарным диабетом 2 типа и в контроле оценить частоты полиморфизмов rs9939609 гена *FTO*, rs7903146 гена *TCF7L2*, rs10811661 хр. 9, rs2237892 *KCNQ1* для выяснения их вклада в вероятность развития заболевания у европеоидов Западной Сибири. Дизайн исследования построен по принципу случай–контроль: 175 человек (78 мужчин и 97 женщин) с подтвержденным диагнозом сахарного диабета 2 типа и/или с повышенным уровнем глюкозы крови более 11,1 ммоль/л, в качестве контроля отобрано 273 человека (113 мужчин и 160 женщин) с нормальным уровнем глюкозы. Установлено, что генотип ТТ rs7903146 гена *TCF7L2*, генотип ТТ и аллель Т rs10811661 хр. 9 ассоциированы с предрасположенностью к сахарному диабету 2 типа, соответственно отношение шансов = 2,35 ($p = 0,038$), 2,10 ($p = 0,004$) и 1,92 ($p = 0,004$).

Ключевые слова: *FTO*, *TCF7L2*, 9 хромосома, *KCNQ1*, сахарный диабет 2 типа, ОНП.

Согласно данным Международной федерации диабета, в мире около 366 миллионов человек, или 8,3 % от взрослого населения, страдает сахарным диабетом 2 типа (СД2Т), а к 2030 г. ожидается увеличение числа больных до 552 миллионов [2]. Длительный период скрытого развития без выраженных симптомов препятствует ранней диагностике заболевания. Формирование СД2Т происходит через взаимодействие различных генетических и средовых факторов, из-за большого числа которых вопрос идентификации генов, вовлеченных в формирование патологического фенотипа, остается актуальным. Показано, что вклад полиморфизмов отдельных генов в предрасположенность к СД2Т, как правило, невысок [1], однако дальнейший поиск генов, ассоциированных с СД2Т, позволит выявить дополнитель-

ные генетические факторы, вовлеченные в регуляцию метаболизма глюкозы.

На сегодняшний день благодаря методу полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) идентифицировано большое количество локусов, ассоциированных с СД2Т. Выявленные однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) принадлежат генам, экспрессия которых определяет [13] синтез инсулина, снижение количества и дисфункцию β -клеток, ожирение, инсулинорезистентность, изменение концентрации глюкозы в крови и плазме в зависимости от времени.

Для данного исследования мы отобрали 4 ОНП в различных генах, которые связаны в популяции европеоидов с развитием СД2Т: rs9939609 гена *FTO*, rs7903146 гена *TCF7L2*, rs10811661 хр. 9, rs2237892 *KCNQ1*, rs7903146 расположен в

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

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

Михайлова С.В. – научный сотрудник

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

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

3-м интроне гена *TCF7L2* (transcription factor-7-like 2) в локусе 10q25.3. Ассоциация *TCF7L2* с повышенным риском развития СД2Т впервые установлена S.F. Grant et al. [6], дальнейшие репликационные исследования подтвердили участие полиморфизмов гена *TCF7L2* в развитии заболевания [5, 7, 10]. Ген *TCF7L2* является важным компонентом сигнального пути Wnt в период эмбрионального развития и регулирует экспрессию многих генов во взрослом организме, в том числе и про-глюкагонового гена, кодирующего глюкагон-подобный пептид 1, в клетках кишечника, тем самым оказываясь вовлеченным в гомеостаз глюкозы. Последнее предположение было изначально выдвинуто, но позже выяснилось, что снижение инкретинового эффекта у носителей аллеля риска (имеется в виду аллель T) наблюдалось не за счет снижения количества глюкозозависимого инсулиотропного полипептида, а за счет повышения резистентности β -клеток к инкретиновым гормонам при пероральном приеме глюкозы, что и приводило к уменьшению уровня инсулина [18]. Показана необходимость нормального функционирования гена *TCF7L2* для поддержания глюкозозависимой секреции инсулина, выживания β -клеток [17], а также его возможное влияние на их пролиферацию [1, 12, 17]. В норме ген экспрессируется во многих человеческих тканях, в том числе в сердце, плаценте, мозге, β -клетках поджелудочной железы [3].

Ожирение является одним из основных факторов риска развития СД2Т [9]. В ходе GWAS был идентифицирован ген *FTO*, он был связан с повышенным индексом массы тела и риском ожирения у европеоидов [4] и, независимо от индекса массы тела, с СД2Т [8, 9, 11]. Впервые T.M. Frayling et al. показали связь полиморфизма rs9939609 в 1-м интроне гена *FTO* и индекса массы тела [4]. Этот ген кодирует 2-оксоглутарат-зависимую деметилазу нуклеиновой кислоты, экспрессирующуюся в тканях, связанных с регулированием энергетического баланса. Так, его экспрессия представлена в мозге, скелетных мышцах, жировой ткани, печени и поджелудочной железе [4, 9]. До настоящего момента механизмы участия гена *FTO* в регуляции метаболизма остаются не ясными.

ОНП rs10811661 находится в межгенном пространстве короткого плеча локуса 21 9-й хромосомы. Он расположен между генами *CDKN2A* и *CDKN2B* и связан с повышенным риском развития СД2Т и сердечно-сосудистыми заболеваниями [11, 16, 17, 19]. Гены *CDKN2A* и *CDKN2B* кодируют два ингибитора циклин-зависимых киназ, которые, вероятно, вовлечены в регуляцию глюкозы и секрецию и функционирование инсулина. Также показано, что сверхэкспрессия *CDKN2A*/

CDKN2B может снижать пролиферацию панкреатических островков, а в дальнейшем приводит к развитию диабета [2, 14].

Ген *KCNQ1* (potassium voltage-gated channel KQT-like subfamily, member 1) расположен в локусе 11p15.5, кодирует белок, который играет ключевую роль в реполяризации сердечного потенциала действия, а также в транспортировке воды и соли в эпителиальных тканях. Продукт гена *KCNQ1* экспрессируется в островках Лангерганса и участвует в регуляции секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы. Установлена связь полиморфизма rs2237892, расположенного в 15 интроне гена *KCNQ1*, с повышенным риском развития СД2Т [18].

В данной работе мы оценили частоты генотипов и аллелей полиморфизмов rs9939609 гена *FTO*, rs7903146 гена *TCF7L2*, rs10811661 хр. 9, rs2237892 гена *KCNQ1* в выборке пациентов с СД2Т и в контроле с целью выяснения их ассоциации с риском развития заболевания у европеоидов Западной Сибири.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования построен по принципу случай–контроль: 175 человек (78 мужчин и 97 женщин) со средним возрастом $59,0 \pm 6,7$ года (для мужчин $58,7 \pm 6,9$ года, для женщин $59,3 \pm 6,7$ года) с подтвержденным диагнозом СД2Т и/или с повышенным уровнем глюкозы крови более 11,1 ммоль/л, что соответствует критериям Американской Диабетической ассоциации. В качестве контроля отобрано 273 человека (113 мужчин и 160 женщин) с нормальным уровнем глюкозы, в этой выборке средний возраст составил $57,1 \pm 6,9$ года ($57,9 \pm 6,6$ года для мужчин и $56,5 \pm 7,1$ года для женщин). Кроме того, исключение диагноза сахарного диабета было сделано по результатам анализа медицинских карт пациентов. Обе группы были сформированы на основе популяционной выборки 45–69-летних европеоидов г. Новосибирска, созданной в ходе работы по программе НАPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe). Программа исследования НАPIEE также включала измерение артериального давления, частоты сердечных сокращений, антропометрию (рост, вес, объем талии, бедер), оценку липидного профиля (содержание общего холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеинов низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности). Геномную ДНК выделяли из 10 мл венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции [15].

Генотипирование групп по исследуемым полиморфизмам (rs7903146 гена *TCF7L2*,

rs10811661 хр. 9, rs2237892 гена *KCNQ1*) выполнено методом ПЦР в реальном времени на приборе 7900HT (Applied Biosystems, США) с использованием TaqMan-зондов (Applied Biosystems) по стандартному протоколу.

Определены частоты генотипов и аллелей изучаемых ОНП в группе с СД2Т и в контрольной группе, соответствие частот генотипов равновесию Харди – Вайнберга в контрольной группе (по критерию χ^2), также нами проведены сравнения распределения генотипов для мужчин и женщин. Сравнение групп по частотам генотипов и аллелей выполнялись с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 Пирсона. В случае четырехпольных таблиц применяли точный двусторонний критерий Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. Относительный риск СД2Т по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов с использованием точного двустороннего критерия Фишера и критерия χ^2 Пирсона. Сравнение уровня таких показателей, как рост, масса тела, индекс массы тела, артериальное давление (систолическое, диастолическое, пульсовое), частота сердечных сокращений, содержание общего холестерина, холестерина ЛПНП, холестерина ЛПВП, триглицеридов, индекс атерогенности, концентрация глюкозы в крови 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 его уровня у носителей разных генотипов проводили с помощью теста Крускалла – Уоллиса, достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли с помощью теста Манна – Уитни для двух независимых выборок. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования полиморфизма rs9939609 гена *FTO* нами установлено, что по распределению генотипов мужчины и женщины статистически значимо различаются. Для rs9939609 гена *FTO* не получено статистически значимых данных о его ассоциации с развитием СД2Т (см. таблицу), факторами риска и антропо-

метрическими показателями в контрольной выборке. Показано, что по полиморфизму rs7903146 гена *TCF7L2* частота встречаемости генотипа ТТ существенно выше в группе с СД2Т, чем в контрольной (см. таблицу). При анализе аллельных вариантов данного полиморфизма обнаружено, что аллель Т связан с развитием СД2Т и повышает риск развития заболевания в 1,43 раза (см. таблицу). С помощью теста Манна – Уитни в контрольной выборке установлена ассоциация генотипа СС с избыточным весом. Статистически достоверных данных об ассоциации ОНП *KCNQ1* (rs2237892) с развитием СД2Т нами не получено (см. таблицу). Тест Крускалла – Уоллиса в контрольной выборке показал достоверную связь rs2237892 гена *KCNQ1* с индексом массы тела $p = 0,004$.

Оценка распределения генотипов по полиморфизму rs10811661 хр. 9 в исследованных группах выявила достоверное снижение частоты встречаемости генотипа СТ и достоверное увеличение частоты встречаемости генотипа ТТ в выборке пациентов с СД2Т (см. таблицу). При рассмотрении аллельных вариантов обнаружено, что носительство аллеля Т достоверно увеличивает риск развития СД2Т (см. таблицу). Ассоциация rs10811661 с СД2Т сохранялась и при разделении исследуемых групп по полу. rs10811661 показал связь в контрольной выборке с содержанием общего холестерина ($p = 0,01$), холестерина ЛПВП ($p = 0,019$) и глюкозы в плазме крови ($p = 0,025$). Кроме того, установлено, что генотип СС ассоциирован с уровнем диастолического артериального давления ($p = 0,041$). А в тесте Манна – Уитни в контрольной выборке для гетерозиготного генотипа СТ получены ассоциации с общим и α -холестерином плазмы крови ($p = 0,011$ и $p = 0,006$ соответственно), в то же время он коррелирует со сниженным уровнем глюкозы в крови ($p = 0,014$). Генотип ТТ имеет обратное действие и ассоциирован с α -холестерином плазмы крови ($p = 0,005$) и уровнем глюкозы ($p = 0,007$).

На сегодняшний день среди всех генов, обнаруженных в результате GWAS, достоверным маркером развития СД2Т является ген *TCF7L2* [2]. Наше исследование показало, что генотип ТТ чаще встречается у лиц с СД2Т по сравнению с контролем. Наличие Т-аллеля обуславливает повышение риска развития СД2Т. Полученные нами данные соответствуют ранее описанным в мире [6]. Мы не обнаружили взаимосвязи между носительством генотипа ТТ и аллеля Т с такими показателями, как уровень глюкозы, триглицеридов, липопротеинов высокой и низкой плотности. Для генотипа СС полиморфизма rs7903146 гена *TCF7L2* показана связь с избыточной массой

Таблица

Частоты генотипов и аллелей rs9939609 гена *FTO*, rs7903146 гена *TCF7L2*, rs10811661 хр. 9, rs2237892 *KCNQ1*

ОНП	Генотип/ аллель	Контрольная группа		СД2Т		Отношение шансов	<i>p</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
FTO, rs9939609, мужчины	АА	24	20,9	14	17,9	0,83	0,713
	АТ	68	59,1	45	57,7	0,94	0,882
	ТТ	23	20	19	24,4	1,27	0,594
	А	116	52	73	50,7	0,95	0,831
	Т	107	48	71	49,3	1,055	0,831
FTO, rs9939609, женщины	АА	21	13	18	19,8	1,64	0,204
	АТ	81	50,4	40	44	0,78	0,36
	ТТ	59	36,6	33	36,2	0,984	1
	А	123	38,2	79	40,9	1,12	0,572
	Т	199	61,8	110	58,2	0,89	0,572
<i>TCF7L2</i> , rs7903146	СС	160	58,2	83	49,4	0,7	0,077
	СТ	104	37,8	70	41,7	1,17	0,24
	ТТ	11	4	15	8,9	2,35	0,038
	С	424	77,1	236	70,2	0,7	0,026
	Т	126	22,9	100	29,8	1,43	0,026
<i>KCNQ1</i> , rs2237892	СС	230	83,9	152	90,5	1,82	0,063
	СТ	44	16,1	16	9,5	0,55	0,063
	ТТ	0	0	0	0		
	С	504	92	320	95,2	1,746	0,073
	Т	44	8	16	4,8	0,57	0,073
rs10811661 (хр. 9)	СС	8	2,9	3	1,8	0,61	0,545
	СТ	68	24,8	23	13,7	0,48	0,005
	ТТ	198	72,3	142	84,5	2,1	0,004
	С	84	15,3	29	7,7	0,52	0,004
	Т	464	84,7	307	92,3	1,92	0,004

тела. Это несколько противоречит данным работы S.F. Grant с соавт. [6], показавшим отсутствие связи данного локуса с ожирением (индекс массы тела больше 30 кг/м²). Указанное разногласие, вероятно, является следствием того, что выборки пациентов с СД2Т и контроля составляют преимущественно люди с избыточной массой тела и первой степенью ожирения.

Ожирение – фактор риска, но это не необходимое условие развития СД2Т в нашей популяции. Возможно, что склонность к набору массы и развитию ожирения этноспецифична. Мы также не исключаем, что полиморфизм rs7903146 гена *TCF7L2* может находиться в группе сцепления генов, влияющих на набор массы тела. В то же время полиморфизм rs9939609 гена *FTO* ни в одном из тестов не показал статистически значимых различий, но его роль в развитии ожирения неоднократно была показана [4, 8, 11]. Это лишнее косвенно подтверждает полигенность разви-

тия ожирения и существование более значимых генетических факторов, влияющих на развитие СД2Т.

По исследованному полиморфизму rs2237892 гена *KCNQ1* различия были хотя и не статистически значимыми, но близкими к пороговым. Литературные данные о связи исследуемого полиморфизма с развитием СД2Т противоречивы. В недавно опубликованном метаанализе показано, что полиморфизм гена *KCNQ1* связан с повышенным риском развития СД2Т [12]. Таким образом, для точного заключения, принимает ли rs2237892 *KCNQ1* участие в развитии СД2Т в нашей популяции, нужны дополнительные исследования.

В настоящем исследовании установлена достоверная связь аллеля Т и генотипа ТТ полиморфизма rs10811661 хр. 9 с развитием СД2Т. Ранее в мировой литературе неоднократно был показан аналогичный эффект [12, 18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения исследования ассоциации полиморфизмов rs9939609 гена *FTO*, rs7903146 гена *TCF7L2*, rs10811661 хр. 9, rs2237892 *KCNQ1* с сахарным диабетом второго типа установлена связь rs7903146 гена *TCF7L2* и rs10811661 хр. 9 с развитием данного заболевания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом мэрии г. Новосибирска № 12-47.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adeghate E., Schattner P., Dunn E.* An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. 1084. 1–29.
2. *Ali O.* Genetics of type 2 diabetes // *World J. Diabetes.* 2013. 4. (4). 114–123.
3. *Cauchi S., Meyre D., Dina C. et al.* Transcription factor *TCF7L2* genetic study in the French population: expression in human β -cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes // *Diabetes.* 2006. 55. 2903–2908.
4. *Frayling T.M., Timpson N.J., Weedon M.N. et al.* A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity // *Science.* 2007. 316. 889–894.
5. *Goodarzi M.O., Rotter J.I.* Testing the gene or testing a variant? The case of *TCF7L2* // *Diabetes.* 2007. 56. 2417–2419.
6. *Grant S.F., Thorleifsson G., Reynisdottir I. et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes // *Nat. Genet.* 2006. 38. 320–323.
7. *Hayashi T., Iwamoto Y., Kaku K. et al.* Replication study for the association of *TCF7L2* with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population // *Diabetologia.* 2007. 50. 980–984.
8. *Hertel J.K., Johansson S., Sonestedt E. et al.* *FTO*, type 2 diabetes, and weight gain throughout adult life: a meta-analysis of 41,504 subjects from the Scandinavian HUNT, MDC, and MPP studies // *Diabetes.* 2011. 60. 1637–1644.
9. *James W.P.* WHO recognition of the global obesity epidemic // *Int. J. Obes. (Lond.).* 2008. 32. S120–S126.
10. *Jin T., Liu L.* The Wnt signaling pathway effector *TCF7L2* and type 2 diabetes mellitus // *Mol. Endocrinol.* 2008. 22. (11). 2383–2392.
11. *Landman G.W., van Vliet-Ostapchouk J.V., Kleefstra N. et al.* Association between 9p21 genetic variants and mortality risk in a prospective cohort of patients with type 2 diabetes (ZODIAC-15) // *Cardiovasc. Diabetol.* 2012. 11. 138. doi: 10.1186/1475-2840-11-138.
12. *Liu J., Wang F., Wu Y., Huang X. et al.* Meta-analysis of the effect of *KCNQ1* gene polymorphism on the risk of type 2 diabetes // *Mol. Biol. Rep.* 2013. 40. (5). 3557–3567.
13. *McCarthy M.I.* Genomics, type 2 diabetes, and obesity // *N. Engl. J. Med.* 2010. 363. 2339–2350.
14. *Peng F., Hu D., Gu C. et al.* The relationship between five widely-evaluated variants in *CDKN2A/B* and *CDKAL1* genes and the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis // *Gene.* 2013. pii: S0378-1119/(13) 01135-9.
15. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor; NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. *Saxena R., Voight B.F., Lyssenko V. et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels // *Science.* 2007. 316. 1331–1336.
17. *Scott L.J., Mohlke K.L., Bonnycastle L.L. et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants // *Science.* 2007. 316. 1341–1345.
18. *Sun Q., Song K., Shen X., Cai Y.* The association between *KCNQ1* gene polymorphism and type 2 diabetes risk: a meta-analysis // *PLoS One.* 2012. 7. (11). e48578. doi: 10.1371/journal.pone.0048578.
19. *Zeggini E., Weedon M.N., Lindgren C.M. et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes // *Science.* 2007. 316. 1336–1341.

ASSOCIATION STUDY OF NEW GENETIC MARKERS OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN WEST SIBERIAN CAUCASIAN POPULATION

Pavel Sergeevich ORLOV^{1,2}, Dinara Yevgenyevna IVANOSHCHUK^{1,2},
Svetlana Vladimirovna MIKHAYLOVA¹, Vladimir Nikolaevich MAKSIMOV^{2,3},
Mikhail Ivanovich VOEVODA^{1,2}

¹ Institute of Internal and Preventive Medicine (IIPM)
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

² Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentev av., 10

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

The aim of the study was to estimate frequencies of the following polymorphisms, including the *FTO* gene rs9939609, *TCF7L2* gene rs7903146, chromosome 9 rs10811661, and *KCNQ1* gene rs2237892, in the sample of patients with type 2 diabetes mellitus and in the control group in order to clarify their contribution to the probability of type 2 diabetes mellitus in West Siberian Caucasians. Materials and Methods: the case-control study design was used; 175 individuals (78 men and 97 women) with the confirmed type 2 diabetes mellitus diagnosis and/or with an increased blood glucose level (more than 11.1 mmol/l). 273 individuals (113 men and 160 women) with normal glucose level were selected as a control. Results: the *TCF7L2* gene rs7903146 TT genotype is associated with predisposition to type 2 diabetes mellitus ($p = 0.038$; OR = 2.35). The rs10811661 TT genotype and T allele are associated with predisposition to T2DM (OR = 2.1, $p = 0.004$; and OR = 1.92, $p = 0.004$, respectively).

Key words: *FTO*, *TCF7L2*, 9 chromosome, *KCNQ1*, diabetes mellitus, of 2 type, SNP.

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

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

Mikhaylova S.V. – researcher

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

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

ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКОГО СТАТУСА У ЗДОРОВЫХ РАБОТНИКОВ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Гульнара Галимяновна БАДАМШИНА¹, Расима Расиховна ГАЛИМОВА¹,
Ахат Бариевич БАКИРОВ¹, Оксана Валерьевна ВАЛЕЕВА¹,
Эльвира Тимерьяновна ВАЛЕЕВА¹, Самардин Партоевич АЛИЕВ²

¹ ФГБУН Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека
4500106, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94

² Таджикский НИИ профилактической медицины
734006, Таджикистан, г. Душанбе, ул. Шевченко, 61

Биохимические показатели сыворотки крови у работников проанализированы на примере лиц, занятых в условиях химического комплекса г. Уфы. Выявлены обменные нарушения в виде изменения показателей липидного и белкового обмена, снижение антитоксической функции в организме у работников, проявляющиеся как увеличением, так и уменьшением активности ферментов, и содержания показателей, характеризующих различные стороны обмена веществ, у работников химического производства.

Ключевые слова: биохимическое обследование, состояние здоровья, химический комплекс.

Нефтехимическая отрасль – базовый сегмент Российской промышленности, которая закладывает основы ее долгосрочного и стабильного развития и оказывает существенное влияние на экономику страны. Потребителями нефтехимической продукции являются практически все отрасли промышленности. В нефтехимической отрасли занято более 791 000 человек, вместе с тем она потенциально опасна для здоровья работников. Так, по данным Росстата, на предприятиях по производству нефтепродуктов удельный вес работников, работающих в условиях, не отвечающих санитарно-гигиеническим нормам, с 2006 по 2013 г. увеличился с 22,0 до 31,2 % [1, 2, 4].

Исследованиями, проведенными ранее, выявлено, что на токсическое влияние вредных производственных факторов химической природы у работников химического комплекса первой реагирует метаболическая система организма [8, 9]. В условиях постоянного совершенствования технологических процессов, применения инновационных схем на предприятиях химического производства происходит изменение реактивности организма работников и развитие стертых форм профессиональных заболеваний.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение особенностей метаболических процес-

сов по биохимическим показателям для выявления критериев донозологической диагностики заболеваний у здоровых работников химического производства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для оценки состояния здоровья работников выполнено биохимическое обследование 84 мужчин, работающих на предприятии химического производства («товарное производство») по профессии «оператор», у которых при проведении периодического медицинского осмотра согласно Приказу МЗ и СР РФ № 302н «Об утверждении перечней вредных и (или) опасных производственных факторов и работ» не было выявлено острых и хронических заболеваний. Средний возраст работников составил $37,5 \pm 3,8$ года, средний стаж работы на производстве – $15,3 \pm 2,5$ года. В зависимости от стажа работники были разделены на четыре группы по 20 ± 2 человека: со стажем 0–5, 6–10, 11–15 и более 15 лет. Условия труда работников согласно Руководству Р 2.2.2006-05 соответствовали вредному классу (класс 3.1-3.3) [3].

Биохимическое обследование включало определение в сыворотке крови содержания глюко-

Бадамшина Г.Г. – к.м.н., зав. клинко-биохимической лабораторией, e-mail: gulyabakirova@yandex.ru

Галимова Р.Р. – к.м.н., старший научный сотрудник отдела охраны здоровья работающих

Бакиров А.Б. – д.м.н., проф., директор

Валева О.В. – биолог клинко-биохимической лаборатории

Валева Э.Т. – д.м.н., зав. отделом охраны здоровья работающих

Алиев С.П. – д.м.н., проф., директор

зы, общего холестерина (ХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов (ТГ), общего белка, альбумина, α 1-глобулинов, α 2-глобулинов, β -глобулинов, γ -глобулинов, мочевой кислоты, активности аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), γ -глутамилтрансферазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и концентрации продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП). Биохимические показатели (содержание ТГ, мочевой кислоты, билирубина, общего белка, активность АСТ, АЛТ, ГГТ, ЩФ, ЛДГ) оценивали с использованием микрослайд-технологии на автоматическом биохимическом анализаторе «VITROS 350» (Ortho-Clinical Diagnostics, США), с применением наборов фирмы Johnson&Johnson (США). Состояние белкового обмена (содержание альбумина, α 1-глобулина, α 2-глобулина, β -глобулина, γ -глобулина) изучали с помощью устройства электрофореза белков на ацетилацетатной пленке («Астра», Россия). Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по содержанию ТБК-РП, имеющих максимум поглощения при $\lambda = 532$ нм. Выявление содержания холестерина в липопротеинах низкой (ЛПНП)

и очень низкой (ЛПОНП) плотности проводили расчетным методом по общеизвестной формуле Friedwald (1972 г.). Индекс атерогенности (ИА), альбумин-глобулиновое отношение (А/Г), коэффициент Де Ритиса определяли общеизвестными расчетными методами [5].

При проведении статистической обработки полученных результатов определяли средние величины (M) и стандартные ошибки средних (m), полученные средние значения биохимических показателей сравнивали с референтными значениями, указанными в инструкциях к наборам. Для оценки зависимости изменения показателей от стажа работы на производстве использовали коэффициент корреляции Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов исследований биохимического статуса показал, что средние значения содержания глюкозы, холестерина, билирубина, мочевой кислоты, ТБК-РП, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП, общего белка, альбумина, α 1-глобулинов, α 2-глобулинов, β -глобулинов, γ -глобулинов и активности ферментов АЛТ, ГГТ определялись в пределах физиологических колебаний (табл. 1).

Таблица 1

Биохимические показатели у здоровых работников химического комплекса ($M \pm m$)

Показатель	$M \pm m$	Референтные значения
Активность АСТ, ед./л	54,8 \pm 1,9	17–59
Активность АЛТ, ед./л	29,8 \pm 2,1	21–72
Активность ЩФ, ед./л	179,3 \pm 2,4	38–126
Активность ГГТ, ед./л	29,2 \pm 2,7	15–73
Активность ЛДГ, ед./л	269,1 \pm 7,7	313–618
Коэффициент Де Ритиса	1,84 \pm 0,07	0,91–1,75
Содержание холестерина, ммоль/л	4,9 \pm 0,7	< 5,2
Содержание ТГ, ммоль/л	1,9 \pm 0,2	< 1,69
Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л	1,1 \pm 0,8	1,03–1,55
Содержание ХС ЛПНП, ммоль/л	3,4 \pm 0,4	< 3,5
Содержание ХС ЛПОНП, ммоль/л	0,8 \pm 0,1	< 1,1
ИА, у. е.	4,6 \pm 0,5	< 3,5
Содержание общего белка, г/л	70,2 \pm 1,6	65–85
Содержание альбумина, %	47,3 \pm 0,7	46,9–61,4
Содержание α 1-глобулина, %	3,2 \pm 0,7	2,2–4,2
Содержание α 2-глобулина, %	10,4 \pm 0,6	7,9–10,9
Содержание β -глобулина, %	17,7 \pm 0,57	10,2–18,3
Содержание γ -глобулина, %	18,8 \pm 0,8	17,4–25,4
А/Г, %	0,90 \pm 0,03	1,2–2,0
Содержание глюкозы, ммоль/л	5,5 \pm 0,2	< 6,1
Содержание билирубина, ммоль/л	13,9 \pm 2,5	3,4–20,5
Содержание мочевой кислоты, мкмоль/л	378 \pm 20,2	200–420
Содержание ТБК-РП, ммоль/л	4,0 \pm 0,3	1,3–4,3

Таблица 2

Биохимические показатели у здоровых работников химического комплекса с различным стажем работы на производстве ($M \pm m$)

Показатель	0–5 лет	6–10 лет	11–15 лет	15 лет
Содержание глюкозы, ммоль/л	5,28 ± 0,2	5,27 ± 0,2	5,78 ± 0,3	5,85 ± 0,2
Содержание билирубина, ммоль/л	15,2 ± 2,4	12,6 ± 2,4	13,1 ± 2,6	14,7 ± 2,6
Содержание мочевой кислоты, мкмоль/л	366 ± 21,1	402 ± 21,0	347 ± 19,8	398 ± 20,1
Содержание ТБК-РП, ммоль/л	4,0 ± 0,3	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,28	4,3 ± 0,3
Активность АСТ, ед./л	50,6 ± 2,0	52,1 ± 1,9	55,4 ± 1,9	53,7 ± 2,0
Активность АЛТ, ед./л	30,1 ± 2,1	29,9 ± 2,0	32,9 ± 1,9	26,3 ± 1,9
Активность ЩФ, ед./л	158,2 ± 3,4	160,2 ± 3,0	214,6 ± 3,1	184,2 ± 3,0
Активность ГГТ, ед./л	30,2 ± 2,0	28,7 ± 1,9	30,4 ± 1,8	27,5 ± 1,9
Активность ЛДГ, ед./л	315,2 ± 7,8	258,8 ± 8,0	290,1 ± 8,0	212,4 ± 7,9
Коэффициент Де Ритиса	1,68 ± 0,06	1,74 ± 0,08	1,68 ± 0,08	2,04 ± 0,07
Содержание общего белка, г/л	72,6 ± 1,8	70,1 ± 1,6	70,1 ± 1,8	68,0 ± 1,8
Содержание альбумина, %	41,9 ± 1,0	49,4 ± 0,8	49,1 ± 0,9	48,8 ± 0,8
Содержание α1-глобулина, %	3,0 ± 0,6	3,1 ± 0,8	2,9 ± 0,8	3,8 ± 0,7
Содержание α2-глобулина, %	9,9 ± 0,8	10,4 ± 0,8	10,4 ± 0,7	10,9 ± 0,8
Содержание β-глобулина, %	16,2 ± 1,8	18,2 ± 1,6	18,3 ± 1,6	18,1 ± 1,7
Содержание γ-глобулина, %	22,2 ± 1,0	17,1 ± 1,1	18,6 ± 1,0	16,3 ± 0,9
А/Г, %	0,8 ± 0,04	1,0 ± 0,06	1,0 ± 0,06	0,8 ± 0,04

Однако у обследованных обнаружено небольшое снижение альбумин-глобулинового индекса, что может являться следствием напряженности в системе белкового обмена [7]. Анализируя динамику белоксинтезирующей функции печени по фракции альбуминов, необходимо отметить, что, несмотря на прямую корреляционную зависимость от стажа ($r = 0,94$, $p < 0,05$), у мало-стажированных работников среднее значение содержания альбуминовой фракции приближено к нижней границе нормы, что, вероятно, связано с реакциями адаптационных механизмов в организме у обследованных при непродолжительном контакте с производственными факторами в условиях химического комплекса (табл. 2).

Результаты данных, характеризующих состояние липидного обмена, показали, что у работников среднегрупповые значения концентрации основных липидных фракций соответствуют референтным уровням. Вместе с тем содержание ТГ и величина ИА превышали установленные значения в 1,1–1,3 раза, что характеризует начальные признаки метаболических нарушений в организме и является предпосылкой для развития заболеваний сердечно-сосудистой системы [1]. Отмеченные изменения – одно из важных звеньев в цепи развивающихся реакций от гиперлипидемии до формирования атеросклеротического поражения всех сосудов, что создает угрозу осложнения нарушений, возникающих в результате непосредственного повреждающего воздействия

химических веществ. Действие токсических факторов, кроме того, может приводить к развитию нарушений в печени, которые «включаются» в патогенез метаболических нарушений липидного, углеводного и других обменов [6].

Увеличение активности ЩФ в среднем в 2,6 раза, выявленное у $71,4 \pm 4,9$ % обследованных, возможно, связано с повышением проницаемости клеточных мембран и развитием холестаза в организме у обследованных. Кроме того, активация ЩФ в биосредах может быть вызвана нарушением способности клеток печени к катаболизму всех фракций этого фермента. Снижение активности ЛДГ в среднем в 1,5 раза у работников по сравнению с референтными значениями, вероятно, подтверждает начальные признаки токсического влияния на печень продуктов производства. Наряду с вышеуказанным полученные данные характеризуют недостаточность процессов катаболизма и снижение катализования обратимой реакции преобразования молочной кислоты в пировиноградную, что может привести к нарушению нормальной последовательности реакций глюконеогенеза вследствие блокирования образования пирувата и, следовательно, к накоплению глюкозы в печени.

Исходя из анализа результатов, следует предположить, что, несмотря на нормальные значения содержания глюкозы, у работников также нарушены процессы углеводного обмена. Так, обращает на себя внимание повышение коэффициента

Де Ритиса до 1,84 ед., что, по данным литературы, является индикатором активности глюконеогенеза, необходимого для поддержания адекватного уровня глюкозы в условиях интоксикации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что у здоровых работников, занятых в условиях химического комплекса, выявлены изменения в биохимическом статусе организма в виде нарушений белкового и липидного обмена, снижения антитоксической функции. У работников определялось увеличение активности щелочной фосфатазы и аспаратаминотрансферазы, снижение активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови, что характеризует истощение детоксикационных систем. Указанный характер сдвигов показателей биохимического статуса может являться предпосылкой для развития у работников хронических полиэтиологических заболеваний, в связи с чем необходимо проведение профилактических мероприятий с учетом индивидуальных особенностей организма. Дальнейшие исследования в этой области могут раскрыть механизмы возникших нарушений в системе обмена веществ у работников химического комплекса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакирова А.Э., Бадамишина Г.Г., Каримова Л.К. и др. Изменение липидного спектра сыворотки крови как метаболических предпосылок раз-

вития сердечно-сосудистой патологии у работников нефтехимических производств // Мед. вестн. Башкортостана. 2010. 5. (4). 74–77.

2. Валеева Э.Т. Научное обоснование системы охраны здоровья работников химической промышленности на основе оценки профессионального риска: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2013.

3. Измеров Н.Ф. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда // Бюл. нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. 2005. 3. (21). 3–144.

4. Каримова Л.К. Научные основы системы оценки и управления рисками в нефтехимической промышленности: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1999.

5. Кишкун А.А. Биохимические исследования в клинической практике. М.: МИА, 2014. 451 с.

6. Кудаева И.В., Бударина Л.А. Изменение биохимических показателей при воздействии паров металлической ртути // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2012. (6). 24–27.

7. Кудаева И.В., Бударина Л.А., Маснавиева Л.Б. Состояние белкового обмена у пожарных // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2005. (1). 163–165.

8. Тимашева Г.В., Бакиров А.Б., Бадамишина Г.Г. Особенности изменения биохимического статуса у работников, занятых в условиях химического комплекса // Здоровье населения и среда обитания. 2013. (7). 9–13.

9. Тимашева Г.В., Бадамишина Г.Г., Бакирова А.Э. Особенности изменения биохимического статуса у работников производства полиэфирных смол // Пермский мед. журн. 2010. (4). 126–131.

EVALUATION OF BIOCHEMICAL STATUS AT HEALTHY WORKERS OF CHEMICAL INDUSTRY

Gulnara Galimyanovna BADAMSHINA¹, Rasima Rasikhovna GALIMOVA¹, Akhat Barievich BAKIROV¹, Oksana Valeryanovna VALEEVA¹, Elvira Timeryanovna VALEEVA¹, Samardin Partoevich ALIEV²

¹ *Ufa Institute of Occupational Medicine and Human Ecology
4500106, the Republic of Bashkortostan, Ufa, Stepan Kuvykin str., 94*

² *Tadzhikskiy Institute of Prophylactical Medicine
734006, The Republic of Tajikistan, Dushanbe, Shevchenko str., 61*

Summary. The worker biochemical parameters of blood serum have been analyzed using the people employed in the Ufa chemical complex. as the example. The metabolic disturbances in the form of lipid and protein metabolism changes, reducing the antitoxic function in the body workers manifested as the increase or decrease in enzymes activity and content of the indicators characterizing the various aspects of metabolism have been revealed at workers of chemical production.

Key words: biochemical examination, health, chemical complex.

Galimova R.R. – candidate of medical sciences, senior researcher of the department for health protection of employees

Badamshina G.G. – candidate of medical sciences, head of clinical and biochemical laboratory

Bakirov A.B. – doctor of medical sciences, professor, director

Valeeva O.V. – biologist of clinical and biochemical laboratory

Valeeva E.T. – doctor of medical sciences, head of the department for health protection of employees

Aliev S.P. – doctor of medical sciences, professor, director