

№ 31'14

научно-практический журнал

клинической медицины

диагностические технологии и способы
лечения в медицине

лабораторные, клинические
и медико-биологические исследования

научные обзоры, лекции

АЛЪМАНАХ

КОРТЕКСИН®

Работу мозга —
в здоровое русло



Показания к применению

- нарушения мозгового кровообращения
- черепно-мозговая травма и ее последствия
- энцефалопатии различного генеза
- когнитивные нарушения (расстройства памяти и мышления)
- острые и хронические энцефалиты и энцефаломиелиты
- эпилепсия
- астенические состояния (надсегментарные вегетативные расстройства)
- снижение способности к обучению
- задержка психомоторного и речевого развития у детей
- различные формы детского церебрального паралича.



Телефон горячей линии:
8-800-333-43-76
(звонок по России бесплатный)

www.geropharm.ru



Научно-практический журнал
Издается с 1998 г.

№ 31'2014

Альманах клинической медицины

Almanac of Clinical Medicine

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР
Ф.Н. Палеев

Заместитель главного редактора
А.В. Молочков

Ответственный редактор
И.В. Троянский

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Б.В. Агафонов
А.П. Калинин
В.И. Краснопольский
Е.Е. Круглов
Н.Е. Кушлинский
Г.А. Оноприенко
Н.Р. Палеев
С. де Херт
В.Н. Шабалин
Н.М. Шахова

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

П.В. Астахов
Е.А. Белоусова
А.В. Ватазин
М.В. Вишнякова
В.П. Волошин
М.Ю. Герасименко
А.В. Древал'
В.И. Егоров
С.В. Котов
Д.А. Куликов
В.С. Мазурин
А.М. Овезов
Д.А. Рогаткин
М.В. Руденко
А.А. Рябцева
Н.И. Урсова
С.И. Федорова
С.Н. Шатохина

EDITOR-IN-CHIEF
F.N. Paleev

Deputy chief editor
A.V. Molochkov

Editorial Manager
I.V. Troyansky

EDITORIAL COUNCIL

B.V. Agafonov
A.P. Kalinin
V.I. Krasnopolsky
E.E. Kruglov
N.E. Kushlinsky
G.A. Onoprienko
N.R. Paleev
S. De Hert
V.N. Shabalin
N.M. Shakhova

EDITORIAL BOARD

P.V. Astakhov
E.A. Belousova
A.V. Vatazin
M.V. Vishnyakova
V.P. Voloshin
M.Yu. Gerasimenko
A.V. Dreval'
V.I. Egorov
S.V. Kotov
D.A. Kulikov
V.S. Mazurin
A.M. Ovezov
D.A. Rogatkin
M.V. Rudenko
A.A. Ryabtseva
N.I. Ursova
S.I. Fedorova
S.N. Shatochina



Подписной индекс 81988
«Газеты. Журналы» ОАО Агентства «Роспечать»
Учредитель – ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского
Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2
E-mail: pio@monikiweb.ru
www.monikiweb.ru

ISBN 978-5-98511-233-7
ISBN 5-9900012-1-5

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых
коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-34730 от 23.12.2008.

За содержание рекламных материалов редакция
ответственности не несет.

При частичном или полном использовании материалов ссылки
на журнал «Альманах клинической медицины» обязательны.

С 2001 г. журнал включен в «Перечень ведущих рецензируемых
научных журналов и изданий» ВАК.

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Басарболиев А.В., Вишнякова М.В. (мл.), Вишнякова М.В., Казанчян П.О., Ларьков Р.Н., Загаров С.С. Применение методики МСКТ-перфузии для оценки кровоснабжения вещества головного мозга и анализа результатов хирургического лечения пациентов с хронической ишемией	3
Глазков А.А., Куликов Д.А., Древаль А.В., Ковалева Ю.А., Шумский В.И., Рогаткин Д.А. Разработка способа диагностики нарушений микроциркуляции крови у больных сахарным диабетом методом лазерной доплеровской флоуметрии	7
Захаров С.Г., Голенков А.К., Митина Т.А., Луцкая Т.Д., Белоусов К.А., Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Сенотов А.С., Акатов В.С. Повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелобластного лейкоза в многоклеточных агрегатах <i>in vitro</i>	11
Иванов В.Е., Карп О.Э., Попова Н.Р., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. Образование долгоживущих форм белков сыворотки крови под действием тепла	17
Куликова П.А., Филюшкин Ю.Н., Куликов Д.А., Федулов А.В., Машков А.Е., Куликов А.В. Экспериментальная модель первичного мужского гипогонадизма	21
Михайлова Д.С., Иловайская И.А. Маркеры преждевременного старения у женщин репродуктивного возраста с гипопитуитаризмом	25
Титаева А.А., Терещенко С.Г., Лукина Е.М., Древаль А.В., Иловайская И.А. Фоновые изменения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у больных акромегалией	29
Федорова С.И., Кулаков Н.В., Кулакова Е.В. Тестирование осциллометрического и аускультативного режимов работы монитора МЭКГ-ДП-НС-01 по протоколам ESH, BHS и AAMI	34
Фомина О.А., Молочков А.В., Кильдюшевский А.В. Клиническое значение экстракорпоральной фотохимиотерапии в комплексном лечении ограниченной склеродермии	40
Черных Ю.Б., Шушанов С.С. Исследование экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости у пациентов с резистентным течением множественной миеломы	47
Штейнер М.Л. Выявляемость и этиологическая принадлежность субэпителиальных пигментных пятен трахеобронхиального дерева, по данным бронхоскопии	52
Щербакова М.М., Котов С.В. Реабилитация больных с афазией по модифицированным методикам восстановления	56

ОБЗОРЫ

Гудков С.В., Брусков В.И., Куликов А.В., Бобылёв А.Г., Куликов Д.А., Молочков А.В. Биоантиоксиданты (часть 1)	61
Гудков С.В., Брусков В.И., Куликов А.В., Шарапов М.Г., Куликов Д.А., Молочков А.В. Биоантиоксиданты (часть 2)	65
Крстич Е.В., Крстич М., Юдаев В.Н. Влияние качества ооцитов и состояния овариального резерва на терапевтический потенциал экстракорпорального оплодотворения у пациенток позднего репродуктивного возраста	70

ЛЕКЦИИ

Ватазин А.В., Зулькарнаев А.Б., Федулкина В.А., Крстич М. Основные межклеточные взаимодействия при активации Т-клеток в отторжении почечного трансплантата	76
Дмитриева Н.Г., Яковчик О.Н., Ватазин А.В., Зулькарнаев А.Б., Федулкина В.А. Система гистосовместимости при трансплантации почки	83

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ МСКТ-ПЕРФУЗИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА И АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ

Басарболиев А.В., Вишнякова М.В. (мл.), Вишнякова М.В., Казанчян П.О., Ларьков Р.Н., Загаров С.С.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Актуальность. Стенозы брахиоцефальных артерий (БЦА) являются одной из главных причин ишемических нарушений мозгового кровообращения. С конца прошлого века и по настоящее время хирургическая реваскуляризация головного мозга при стено-окклюзирующих поражениях БЦА прочно занимает ведущее место в профилактике острых нарушений мозгового кровообращения, при этом основным методом хирургической реваскуляризации продолжает оставаться каротидная эндартерэктомия (КЭАЭ). В результате хронической гипоперфузии может нарушаться ауторегуляция мозгового кровотока со стойким расширением капилляров, что при хирургических вмешательствах способствует развитию гиперперфузионного синдрома.

Цель – количественная оценка нарушения перфузии ткани головного мозга в зависимости от вариантов поражения брахиоцефальных сосудов до и после реконструктивного оперативного лечения, а также выявление возможных предпосылок развития гиперперфузионного синдрома при предоперационной мультиспиральной компьютерно-томографической (МСКТ) перфузии.

Материал и методы. Проанализированы результаты обследования и лечения 65 пациентов в возрасте $64,2 \pm 5,0$ года с хронической сосудисто-мозговой недостаточностью 4-й стадии и гемодинамически значимым поражением внутренних сонных артерий, которым планировалось проведение КЭАЭ. Всем пациентам были выполнены МСКТ-ангиография и МСКТ-перфузия головного мозга в пред- и раннем послеоперационном периоде.

Основные результаты. У большинства пациентов в предоперационном периоде отмечалось уменьшение показателей перфузии на стороне большого поражения, средний дефицит кровотока варьировал от 12 до 15% (в среднем улучшение кровотока на стороне оперативного вмешательства составило около 12%, наилучшие результаты были отмечены у пациентов с двусторонним стенозом внутренних сонных артерий (ВСА)). В одном наблюдении при критическом одностороннем стенозе ВСА в предоперационном периоде по данным МСКТ-перфузии были сделаны выводы о нарушении ауторегуляции мелких артериальных сосудов пораженного полушария с их стойким расширением (у пациента имелся высокий риск развития гиперперфузионного синдрома). На вторые сутки послеоперационного периода у пациента развился гиперперфузионный синдром, который был успешно купирован гипотензивной терапией.

Заключение. КЭАЭ способствует улучшению кровотока у больных, перенесших ишемический инсульт, при этом данные перфузионной МСКТ позволяют выявлять пациентов с высоким риском гиперперфузионного синдрома в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: брахиоцефальные артерии, хроническая ишемия головного мозга, МСКТ-перфузия, синдром гиперперфузии, каротидная эндартерэктомия.

MSCT PERFUSION IN ASSESSMENT OF BRAIN HEMODYNAMICS AND IN ANALYSIS OF SURGICAL TREATMENT RESULTS IN PATIENTS WITH CHRONIC BRAIN ISHEMIA

Basarboliev A.V., Vishnyakova M.V. Jr., Vishnyakova M.V., Kazanchyan P.O., Lar'kov R.N., Zagarov S.S.

Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

Background: Stenoses of the brachiocephalic arteries (BCA) are ones of the main causes of ischemic defects of cerebral circulation. From the end of the former century to the current time, the surgical cerebral revascularization in steno-occlusive BCA disturbances occupies the topical place in prevention of acute brain circulation defects. Carotid endarterectomy (CEAE) remains till now a basic method of surgical revascularization. As a result of chronic hypoperfusion, autoregulation of the cerebral circulation can be disturbed with a persistent capillary dilatation which enables development of hyperperfusion syndrome after surgical intervention.

Aim: A quantitative assessment of the cerebral tissue perfusion disturbances depending on the variants of the brachiocephalic vessels lesions before and after surgical reconstructions as well as revealing possible prerequisites for hyperperfusion syndrome development during preoperative multislice computed tomography (MSCT) perfusion.

Materials and methods: The results of examination and treatment of 65 patients (mean age 64.2±5.0 years) with chronic cerebrovascular IV stage insufficiency were analyzed as well as the hemodynamically significant lesion of the inner carotid arteries. CEAE was planned for all patients. All patients underwent cerebral MSCT angiography and MSCT perfusion in preoperative and early postoperative periods.

Results: The majority of patients in preoperative period showed decrease of perfusion parameters at the side of the most expressed defects. The mean circulation deficiency varied from 12 to 15%. Improvement of circulation at the side of surgical intervention formed, on the average, about 12%. The best outcome was noted in patients with bilateral stenoses of the inner carotid arteries (ICA). In one case, in critical unilateral ICA stenosis in preoperative period, MSCT perfusion demonstrated persisting dilatation of the small cerebral arteries of the disturbed hemisphere which led to autoregulation defects of these arteries with a high risk of hyperperfusion syndrome development. On the second day of the postoperative period, the said hyperperfusion syndrome developed but was successfully arrested using hypotensive therapy.

Conclusion: CEAE provides circulation improvement in patients with ischemic stroke. MSCT perfusion favors circulation improvement in ischemic stroke patients. MSCT perfusion allows revealing patients with high risk of hyperperfusion syndrome development in postoperative period.

Key words: brachiocephalic arteries, chronic cerebral ischemia, MSCT perfusion, hyperperfusion syndrome, carotid endarterectomy.

ВВЕДЕНИЕ

Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) являются одной из важнейших медико-социальных проблем современного общества [1, 2]. Так, в мире каждый год регистрируется не менее 15 млн инсультов, при этом инсульт занимает второе место в мире в структуре причин смертности населения. В России же количество новых инсультов в год достигает более 450 тыс., и он прочно занимает первое место в качестве причины инвалидизации населения Российской Федерации [1, 3, 4].

По данным разных авторов, до 80% всех инсультов составляют инсульты ишемического характера, при этом более 90% ишемических инсультов и транзиторных ишемических атак (ТИА) связаны с осложнениями эмболического характера из бляшек, локализующихся в экстракраниальных отделах брахиоцефальных артерий (БЦА). Однако только 15% больных, перенесших инсульт, имели в анамнезе неврологическую симптоматику в виде ТИА [2, 3, 4, 5].

Стенозы БЦА являются одной из главных причин ишемических нарушений мозгового кровообращения. По данным мировой литературы, в 40-

60% эти стенозы служат причиной ишемического повреждения ткани головного мозга [3, 4, 6].

С конца прошлого века и по настоящее время хирургическая реваскуляризация головного мозга при стено-окклюзирующих поражениях БЦА является основным способом профилактики ОНМК. При этом основным методом хирургической реваскуляризации продолжает оставаться каротидная эндартерэктомия (КЭАЭ) [2].

Регуляция мозгового кровотока осуществляется с изменением цереброваскулярной резистивности. При снижении перфузионного давления мозговые капилляры расширяются, при его увеличении – сужаются, сохраняя мозговой кровоток на постоянном уровне. В результате хронической гипоперфузии может нарушаться ауторегуляция мозгового кровотока со стойким расширением капилляров, что при хирургических вмешательствах может привести к развитию гиперперфузионного синдрома [7, 8].

Для обследования таких пациентов методы ультразвуковой диагностики являются основными, однако полностью определить мозговую гемодинамику по их данным не представляется возможным. Наиболее доступной методикой, позволяющей

Басарболиев Алексей Викторович – мл. науч. сотр. рентгенологического отделения МОНКИ. **Вишнякова Марина Валентиновна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. рентгенологического отделения МОНКИ. **Вишнякова Мария Валентиновна** – д-р мед. наук, профессор, руководитель рентгенологического отделения МОНКИ. **Казанчян Перч Оганесович** – д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения хирургии сосудов и ишемической болезни сердца МОНКИ. **Ларьков Роман Николаевич** – канд. мед. наук, зав. отделением хирургии сосудов и ишемической болезни сердца МОНКИ. **Загаров Сергей Сергеевич** – мл. науч. сотр. отделения хирургии сосудов и ишемической болезни сердца МОНКИ.

Для корреспонденции: Басарболиев Алексей Викторович – 125363, г. Москва, Цветочный пр., 9-1-13, Российская Федерация. Тел.: +7 (926) 206 83 04. E-mail: avbasarboliev@gmail.com

Basarboliev Aleksey Viktorovich – junior scientific worker, Roentgenologic Department of MONIKI. **Vishnyakova Marina Valentinovna** – PhD, senior scientific worker, Roentgenologic Department of MONIKI. **Vishnyakova Mariya Valentinovna** – MD, PhD, Professor, Head of Roentgenologic Department of MONIKI. **Kazanchyan Perch Oganessovich** – MD, PhD, Professor, Head of the Department of Vascular Surgery and Ischemic Heart Disease of MONIKI. **Lar'kov Roman Nikolaevich** – PhD, Executive of the Department of Vascular Surgery and Ischemic Heart Disease of MONIKI. **Zagarov Sergey Sergeevich** – junior scientific worker, Department of Vascular Surgery and Ischemic Heart Disease of MONIKI.

Correspondence to: Basarboliev Aleksey Viktorovich – 13-9 (1) Tsvetochnyy pr., 125363 Moscow, Russian Federation. Tel.: +7 (926) 206 83 04. E-mail: avbasarboliev@gmail.com

оценить состояние мозгового кровотока, является мультиспиральная компьютерно-томографическая (МСКТ) перфузия, которая может применяться в том числе у пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Методика изучения кровотока с помощью метода динамической перфузионной компьютерной томографии была разработана в 1980 г. L. Axel. Постоянное совершенствование технологий сканирования и обработки информации способствовало ее широкому распространению [6, 7]. Несмотря на большое количество публикаций, посвященных перфузионной МСКТ при атеросклеротических поражениях БЦА, в настоящее время не существует единого алгоритма оценки показателей этой методики, поскольку при математическом обсчете получаемые абсолютные значения МСКТ-перфузии могут варьировать у каждого человека. Более достоверным методом оценки данных МСКТ-перфузии является сравнение относительных показателей между собой.

Цель работы – количественная оценка нарушения перфузии ткани головного мозга в зависимости от вариантов поражения брахиоцефальных сосудов до и после реконструктивного оперативного лечения, а также выявление возможных предпосылок развития гиперперфузионного синдрома при предоперационной МСКТ-перфузии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

На базе МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в период с 2012 по 2014 г. были проанализированы результаты обследования и лечения 65 пациентов с хронической сосудисто-мозговой недостаточностью 4-й стадии с гемодинамически значимым поражением внутренних сонных артерий (ВСА) (по данным ультразвуковых методов), которым планировалось проведение КЭАЭ. Мужчин в исследовании было 80%, женщин – 20%. Всем пациентам были выполнены МСКТ-ангиография и МСКТ-перфузия головного мозга в пред- и раннем послеоперационном периоде (на 5-7-е сутки после операции).

В ходе исследования проводились вычисления показателей мозгового кровотока: объем мозгового кровотока – CBV, скорость мозгового кровотока – CBF, среднее время прохождения контрастного препарата – МТТ, время до достижения максимальной концентрации контрастного препарата – ТТР. Рассчитывались коэффициент кровотока (КК) как отношение CBF пораженного полушария к CBF контралатеральной гемисферы, а также дефицит кровотока как 1-КК.

Обследованные пациенты были разделены на три группы в зависимости от вида поражения ВСА: в 1-ю группу вошли 35 пациентов с односторонним поражением ВСА, во 2-ю – 17 со стенозом обеих

ВСА, в 3-ю – 13 с окклюзией ВСА с одной стороны и стенозом контралатеральной ВСА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У большинства пациентов в предоперационном периоде отмечалось уменьшение показателей CBF, МТТ и ТТР на стороне большего поражения, средний дефицит кровотока составлял от 12 до 15% (в среднем 14%) в каждой из трех групп. Улучшение кровотока на стороне оперативного вмешательства составило в среднем 12%; наилучшие результаты (улучшение кровотока на 17%) были отмечены у пациентов 2-й группы.

При наличии сочетанного поражения ВСА и сосудов вертебро-базиллярного бассейна (пять пациентов) дефицит кровотока был выше среднего (17%), улучшение кровотока также было выше среднего значения и составляло 15%. Однако столь выраженное улучшение наблюдалось только у больных, имеющих замкнутый виллизиев круг.

Был проведен анализ изменения кровотока в бассейнах передних (ПМА), средних (СМА) и задних (ЗМА) мозговых артерий. При этом более чем у 60% пациентов отмечалось улучшение кровотока в бассейне СМА, вне зависимости от вида поражения ВСА. Более чем у 60% пациентов 1-й и 2-й групп было выявлено улучшение кровотока в бассейне ПМА. Улучшение кровотока в бассейне ЗМА более чем у 50% больных отмечалось лишь в 3-й группе, в остальных улучшение в бассейне ЗМА выявлено у небольшого числа пациентов. В отдельную небольшую группу мы выделили трех больных (5% от общего числа), имеющих поражение одной из средних мозговых артерий. После операции у них отмечалось улучшение кровотока от 5 до 17%, более выраженное в бассейне СМА.

У одного больного с критическим односторонним стенозом ВСА в предоперационном периоде в пораженной гемисфере кроме снижения CBF, увеличения МТТ и ТТР был отмечен практически двукратный рост CBV, что свидетельствовало о нарушении ауторегуляции артериол и капилляров пораженного полушария с их стойким расширением (у пациента имелся высокий риск развития гиперперфузионного синдрома). На вторые сутки послеоперационного периода у пациента развились выраженные головные боли на стороне операции, при перфузионной МСКТ было диагностировано увеличение CBF более чем в 2 раза, что расценивалось как развитие гиперперфузионного синдрома, который был успешно купирован гипотензивной терапией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Через 5-7 дней после операции, по данным МСКТ-перфузии, у большинства пациентов выявлено

улучшение кровотока в бассейне СМА пораженной стороны, что показывает эффективность проведения КЭАЭ. Среднее улучшение кровотока оказалось несколько выше у пациентов с замкнутым виллизиевым кругом, при этом в группе с окклюзией одной ВСА и стенозом контралатеральной ВСА отмечалось наибольшее улучшение кровотока.

У больных с сочетанным поражением сосудов каротидного и вертебро-базилярного бассейнов дефицит кровотока повышен. Его улучшение после операции было отмечено только у пациентов с замкнутым виллизиевым кругом.

Данные перфузионной МСКТ позволяют выявлять предикторы развития гиперперфузионного синдрома в послеоперационном периоде.

Литература

1. Верещагин Н.В., Варакин Ю.Я. Профилактика острых нарушений мозгового кровообращения: теория и реальность. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 1996;96(5):5-9. [Vereshchagin N.V., Varakin Yu.Ya. Prevention of acute disturbances of cerebral circulation: theory and reality. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova 1996;96(5):5-9 (in Russian)].
2. Покровский А.В., Кияшко В.А. Ишемический инсульт можно предупредить. Русский медицинский журнал 2003;(12):691-5. [Pokrovskiy A.V., Kiyashko V.A. Ischemic stroke can be prevented. Russkiy meditsinskiy zhurnal 2003;(12):691-5 (in Russian)].
3. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. Эпидемиология инсульта в России. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова (приложение «Инсульт») 2003;(8):4-9. [Gusev E.I., Skvortsova V.I., Stakhovskaya L.V. Epidemiology of stroke in Russia. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova (prilozhenie «Insul't») 2003;(8):4-9 (in Russian)].
4. Верещагин Н.В., Пирадов М.А., Суслина З.А., ред. Инсульт: принципы диагностики, лечения и профилактики. М.: Интермедика; 2002. [Vereshchagin N.V., Piradov M.A., Suslina Z.A., editors. Stroke: principles of diagnosis, treatment, and prevention. Moscow: Intermedika; 2002 (in Russian)].
5. Верещагин Н.В., Моргунов В.А., Гулевская Т.С. Патология головного мозга при атеросклерозе и артериальной гипертонии. М.: Медицина; 1997 [Vereshchagin N.V., Morgunov V.A., Gulevskaya T.S. Cerebral pathology in patients with atherosclerosis and arterial hypertension. Moscow: Meditsina; 1997 (in Russian)].
6. Muehlschlegel S., Voetsch B., Singhal A.B. CT angiography and CT perfusion in post-CEA hyperperfusion syndrome. Neurology 2007;68(17):1437.
7. Dagher H.N., Shum M.K., Campellone J.V. Delayed intracranial vasospasm following carotid endarterectomy. Cerebrovasc Dis 2005;20(3):205-6.
8. Johnston S.C., O'Meara E.S., Manolio T.A., Lefkowitz D., O'Leary D.H., Goldstein S., Carlson M.C., Fried L.P., Longstreth W.T. Jr. Cognitive impairment and decline are associated with carotid artery disease in patients without clinically evident cerebrovascular disease. Ann Intern Med 2004;140(4):237-47.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДОППЛЕРОВСКОЙ ФЛОУМЕТРИИ

Глазков А.А.^{1,2}, Куликов Д.А.¹, Древалъ А.В.¹, Ковалева Ю.А.¹, Шумский В.И.¹, Рогаткин Д.А.¹

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; 119192, г. Москва, Ломоносовский пр., 31/5, Российская Федерация

Актуальность. Ранним звеном патогенеза осложнений сахарного диабета (СД) являются системные микроциркуляторные нарушения. При этом в эндокринологии наблюдается дефицит методов объективной оценки состояния микроциркуляторного русла.

Цель – разработка способа диагностики микроциркуляторных нарушений у больных СД методом лазерной доплеровской флоуметрии.

Материал и методы. В исследование включены 11 пациентов с СД в стадии декомпенсации (средний уровень гликированного гемоглобина составил $9,1 \pm 2,2\%$) с длительностью заболевания более пяти лет. В контрольную группу вошли 11 здоровых добровольцев. Кожную микроциркуляцию крови измеряли с помощью диагностического комплекса ЛАКК-02. Исследовали состояние кожной микроциркуляции крови в условиях проведения функциональных воздействий: окклюзионного, теплового, холодового, ортостатического (постурального), их комбинаций и различной длительности действия. Для количественных данных рассчитывали средние значения и стандартные отклонения ($M \pm SD$), гипотезы о наличии различий между группами проверяли с использованием двустороннего критерия Стьюдента.

Основные результаты. В ходе исследования были разработаны функциональные диагностические пробы с применением комбинации теплового и ортостатического воздействия. Использование разработанных проб в комплексе с переводом стандартного показателя микроциркуляции, измеряемого в перфузионных единицах, в относительные значения путем деления индекса микроциркуляции в каждый момент времени на среднее значение данного индекса за базовый период позволило выявить значимые различия индекса микроциркуляции у больных СД и контрольной группы в момент комбинированного функционального воздействия: для пробы на ноге значение относительного индекса микроциркуляции составило $3,2 \pm 1,9$ в исследуемой группе и $6,3 \pm 4,6$ – в контрольной ($p=0,05$), для пробы на руке – $3,3 \pm 1,4$ и $5,3 \pm 2,8$ соответственно ($p<0,05$).

Заключение. Разработанный способ продемонстрировал эффективность в выявлении микроциркуляторных нарушений у больных СД. В перспективе он может быть использован для ранней диагностики сосудистых осложнений, а также в качестве дополнительного метода контроля эффективности медикаментозной терапии СД.

Ключевые слова: лазерная доплеровская флоуметрия, неинвазивная диагностика, сахарный диабет, осложнения сахарного диабета, функциональные пробы, ранняя диагностика, микроциркуляция, микроциркуляторные нарушения.

DEVELOPMENT OF NON-INVASIVE METHOD FOR BLOOD MICROCIRCULATION DISORDERS DIAGNOSTICS IN DIABETIC PATIENTS USING LASER DOPPLER FLOWMETRY

Glazkov A.A.^{1,2}, Kulikov D.A.¹, Dreval' A.V.¹, Kovaleva Yu.A.¹, Shumskii V.I.¹, Rogatkin D.A.¹

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

²Lomonosov Moscow State University; 31/5 Lomonosovskiy prospekt, 119192 Moscow, Russian Federation

Background: Pathogenesis of diabetes complications is due to systemic microcirculatory disturbances, while there is a deficit in instrumental methods of objective assessment of the microvasculature.

Aim: To provide diagnostics of microcirculatory disorders in patients with diabetes mellitus (DM) using laser Doppler flowmetry.

Materials and methods: The study included 11 patients with decompensated type 1 and type 2 DM (HbA1c level – $9.1 \pm 2.2\%$), the duration of the disease being more than 5 years. The control group consisted of 11 healthy volunteers. Blood microcirculation in skin was measured using LAKK-02 system. We examined the condition of blood microcirculation during the functional testing (occlusion, heat, cold, orthostatic) in different combinations and durations of action. For analysis of the quantitative data, the mean values and standard deviations were calculated ($M \pm SD$), the differences between the groups were tested using the double-sided Student's test.

Results: The diagnostic tests using a combination of thermal and orthostatic effects were developed. The said diagnostic functional testing and transformation of perfusion units into the relative values of microcirculation (by dividing perfusion index by the average value of microcirculation during the base period) revealed significant differences in microcirculation levels between

diabetic patients and the control group: for foot testing, relative microcirculation indices were 3.2 ± 1.9 in the study group and 6.3 ± 4.6 in the control group ($p=0.05$), for hand testing, the relative indexes were 3.3 ± 1.4 and 5.3 ± 2.8 , respectively ($p<0.05$).

Conclusion: The developed method has demonstrated the efficacy of detection of microcirculatory disorders in patients with diabetes. In future, it can be used for the early diagnosis of diabetic vascular complications and as an additional method for monitoring the effectiveness of DM treatment.

Keywords: laser Doppler flowmetry, non-invasive diagnostics, diabetes mellitus, complications of diabetes, functional tests, early diagnosis, microcirculation, microcirculatory disorders.

ВВЕДЕНИЕ

Медицинская, социальная и экономическая значимость сахарного диабета (СД) в первую очередь определяется высокой распространенностью этого заболевания, а также частотой развития у пациентов инвалидизирующих и снижающих качество жизни осложнений. По данным Международной диабетической федерации (International Diabetes Federation – IDF), в 2013 г. в мире насчитывалось 382 млн больных СД, а затраты на лечение составили 548 млрд долларов США, что составляет 11% от международного финансирования здравоохранения. Российская Федерация находится на пятом месте в мире по абсолютному числу больных СД [1].

На момент постановки диагноза СД 2-го типа у 40% пациентов уже имеются осложнения [2]. Системные микроциркуляторные нарушения играют ключевую роль в патогенезе осложнений СД [3]. В клинической диабетологии наблюдается дефицит методов объективной оценки состояния микроциркуляторного русла [4]. Большинство используемых в настоящий момент тестов являются либо субъективными (офтальмоскопия, капилляроскопия и др.), либо инвазивными. Метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) дает возможность неинвазивно исследовать микроциркуляторное русло [5]. К сожалению, существующие методики использо-

вания ЛДФ вследствие высокой физиологической вариативности параметров кровотока и технологических (конструктивных) особенностей приборов дают противоречивые результаты, не позволяющие применять эти методики в клинической практике. Исследование базового уровня кровотока неинформативно вследствие высокой индивидуальной вариативности данного параметра. Одним из возможных способов повышения информативности исследования является использование функциональных проб, однако результаты работ с применением традиционных функциональных проб также противоречивы [6, 7].

Цель работы – разработка способа диагностики микроциркуляторных нарушений у больных СД методом лазерной доплеровской флоуметрии. Задачи исследования: создание информативных и специфичных для СД функциональных проб, разработка алгоритма обследования пациентов и способа дальнейшей обработки данных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 11 пациентов с СД 1-го и 2-го типов в стадии декомпенсации с длительностью заболевания более пяти лет. Средний возраст пациентов составил $48,5 \pm 16,5$ года, средний уровень гликированного гемоглобина – $9,1 \pm 2,2\%$. Кон-

Глазков Алексей Андреевич – лаборант лаборатории медико-физических исследований МОНИКИ, студент факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. **Куликов Дмитрий Александрович** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории медико-физических исследований МОНИКИ. **Древал Александр Васильевич** – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой эндокринологии факультета усовершенствования врачей МОНИКИ, руководитель отделения терапевтической эндокринологии МОНИКИ, главный эндокринолог Московской области. **Ковалева Юлия Александровна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отделения терапевтической эндокринологии МОНИКИ. **Шумский Вячеслав Иванович** – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотр. МОНИКИ, заслуженный врач РФ. **Рогаткин Дмитрий Алексеевич** – д-р техн. наук, зав. лабораторией медико-физических исследований МОНИКИ.

Для корреспонденции: Глазков Алексей Андреевич – 140180, Московская обл., г. Жуковский, ул. Грищенко, 4-41, Российская Федерация. Тел.: +7 (916) 250 30 09. E-mail: staaglz@gmail.com

Glazkov Aleksey Andreevich – laboratory worker, Laboratory of Medical and Physics Research, MONIKI; student of the Faculty of Fundamental Medicine, MSU. **Kulikov Dmitry Aleksandrovich** – MD, PhD, senior researcher, Laboratory of Medical and Physics Research, MONIKI. **Dreval Aleksandr Vasil'evich** – MD, PhD, Professor, the Head of the Department of Endocrinology, the Faculty of Postgraduate Medical Education, MONIKI; the Head of the Department of Therapeutic Endocrinology, MONIKI; the Chief Endocrinologist of the Moscow Region. **Kovaleva Yuliya Aleksandrovna** – MD, PhD, senior researcher, Department of Therapeutic Endocrinology, MONIKI. **Shumskii Vyacheslav Ivanovich** – MD, PhD, Professor, chief researcher, MONIKI; Honored Physician of Russian Federation. **Rogatkin Dmitry Alekseevich** – PhD, the Head of the Laboratory of Medical and Physics Research, MONIKI.

Correspondence to: Glazkov Aleksey Andreevich – 4-41 Grishchenko ul., 140180 Zhukovskiy, Moskovskaya oblast', Russian Federation. Tel.: +7 (916) 250 30 09. E-mail: staaglz@gmail.com

трольную группу составили 11 здоровых добровольцев, средний возраст – $22,6 \pm 2$ года. Кожную микроциркуляцию крови регистрировали с использованием комплекса ЛАКК-02, частота измерений (ν) – 20 Гц. Исследовали состояние кожной микроциркуляции крови в условиях проведения функциональных воздействий: окклюзионного, теплового, холодного, ортостатического (постурального), их комбинаций и различной длительности действия. В ходе анализа индекс микроциркуляции переводили из стандартных значений в перфузионных единицах (п.е.) в относительные путем деления индекса микроциркуляции в каждый момент времени на среднее значение данного индекса за базовый период. Для количественных данных рассчитывали средние значения и стандартные отклонения ($M \pm SD$), гипотезы о наличии различий между группами проверяли с использованием двустороннего критерия Стьюдента. На рисунке приведены средние показатели стандартных и относительных значений и стандартные ошибки среднего индекса микроциркуляции в каждый момент времени.

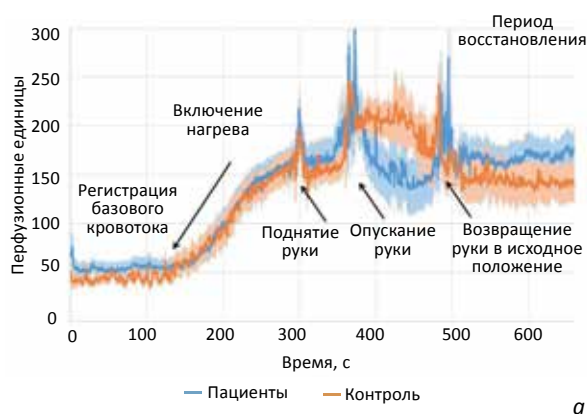
РЕЗУЛЬТАТЫ

Были изучены различные виды функциональных воздействий: окклюзионное, тепловое, холодное, ортостатическое (постуральное). Исходя из патогенеза осложнений СД, особое внимание было уделено тепловому воздействию, поскольку при этом заболевании в первую очередь повреждаются немиелинизированные ноцицептивные С-волокна, которые активируются при нагревании выше 41°C [8]. Наибольшая информативность проб (различия показателей микроциркуляции у пациентов с СД и здоровых добровольцев) была достигнута при

комбинации теплового и ортостатического воздействий.

Разработанные пробы включают в себя регистрацию базового уровня кровотока, нагрев кожных покровов в точке измерения до $42 \pm 1^\circ\text{C}$, после которого следует постуральное воздействие, осуществляемое путем смены положения тела/конечности пациента, и затем – регистрация кровотока в период восстановления (в исходном положении). Каждому обследуемому последовательно проводили измерения микроциркуляции крови на волосистой коже тыльной части кисти и стопы. По результатам проведения проб на ногах средние значения индекса микроциркуляции в момент комбинации постурального и температурного (сочетание нагревания и изменения положения тела – опускания ног) воздействия составили $155,5 \pm 73,2$ п.е. в группе больных СД и $167,4 \pm 70,8$ п.е. в контрольной группе ($p > 0,05$). Для проб на руках в момент сочетания нагревания и изменения положения конечности (опускания руки) эти значения составили $162,1 \pm 87,4$ и $202,8 \pm 62,1$ п.е. ($p > 0,05$) соответственно. Для повышения информативности исследования у каждого испытуемого значения индекса микроциркуляции были переведены из стандартных (п.е.) в относительные путем деления индекса микроциркуляции в каждый момент времени на среднее значение данного индекса за базовый период, а затем для каждого пациента рассчитывали среднее значение относительного индекса (I_{rel}) микроциркуляции в момент комбинации температурного и ортостатического воздействий следующим образом:

$$I_{\text{rel}} = \frac{\sum_{i=vt_1}^{vt_2} \frac{I_m(i)}{I_b}}{vt_2 - vt_1},$$



Графики зависимости средних стандартных (а) и относительных (б) значений индекса микроциркуляции от времени при выполнении постурально-тепловой пробы на руке в контрольной и исследуемой группах

где I_{rel} – среднее значение индекса микроциркуляции в относительных значениях в момент комбинации функциональных воздействий;

$I_m(i)$ – значение индекса микроциркуляции в п.е. в момент текущего измерения;

I_b – среднее значение индекса микроциркуляции в п.е. за базовый период;

t_1 и t_2 – временные точки, ограничивающие период комбинации двух воздействий;

ν – частота регистрации параметров кровотока.

На рисунке представлены графики зависимости индекса микроциркуляции от времени для пробы на руках в стандартных и относительных значениях.

Среднее значение относительного индекса микроциркуляции (I_{rel}) в момент комбинации теплового и постурального воздействий для пробы на ногах составило $3,2 \pm 1,9$ в группе больных СД и $6,3 \pm 4,6$ в контрольной группе ($p=0,05$). Для пробы на руках среднее значение этого индекса составило $3,3 \pm 1,4$ и $5,3 \pm 2,8$ ($p<0,05$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включали пациентов с длительным «стажем» заболевания и высоким уровнем гликированного гемоглобина. Использование в качестве группы контроля молодых относительно здоровых добровольцев обусловлено необходимостью поиска типичных изменений микроциркуляции, развивающихся в условиях хронической гипергликемии. Разработаны пробы, позволяющие зарегистрировать наиболее значимые различия состояния системы микроциркуляции у пациентов с хронической гипергликемией в сравнении с группой интактного контроля. Однако даже использование этих проб требует специальной обработки данных (исследования именно относительных значений микроциркуляции) для получения статистически значимых результатов.

Анализ опубликованных в ведущих научных изданиях работ показывает, что исследование кожной микроциркуляции крови может быть использовано в ранней и даже доклинической диагностике микрососудистых осложнений СД [9, 10, 11]. Кроме того, с учетом патогенетической роли микроциркуляторных нарушений в развитии инсулинорезистентности, а также влияния хронической гипергликемии на состояние кожной микроциркуляции крови можно

предполагать перспективность данного подхода и для оценки эффективности медикаментозной терапии СД [12, 13].

Профилактика развития осложнений и качественный контроль эффективности лечения позволят значительно снизить частоту инвалидизации и летальности больных СД, улучшить их качество жизни.

Литература

1. IDF Diabetes Atlas. 6th edition. International Diabetes Federation; 2013. Available from: URL: <http://www.idf.org/diabetesatlas>
2. Дедов И.И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнений. Сахарный диабет 2013;(3):4-10. [Dedov I.I. Innovative technologies for treatment and prevention of diabetes mellitus and its complications. Sakharный diabet 2013;(3):4-10 (in Russian)].
3. Rask-Madsen C., King G.L. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. Cell Metab 2013;17(1):20-33.
4. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2014. Diabetes Care 2014; 37 Suppl 1:S14-80.
5. Fredriksson I., Larsson M., Nyström F.H., Länne T., Ostgren C.J., Strömberg T. Reduced arteriovenous shunting capacity after local heating and redistribution of baseline skin blood flow in type 2 diabetes assessed with velocity-resolved quantitative laser Doppler flowmetry. Diabetes 2010;59(7):1578-84.
6. Rendell M., Bamisedun O. Diabetic cutaneous microangiopathy. Am J Med 1992;93(6):611-8.
7. Colberg S.R., Parson H.K., Nunnold T., Herriott M.T., Vinik A.I. Effect of an 8-week resistance training program on cutaneous perfusion in type 2 diabetes. Microvasc res 2006;71(2):121-7.
8. Stansberry K.B., Peppard H.R., Babyak L.M., Popp G., McNitt P.M., Vinik A.I. Primary nociceptive afferents mediate the blood flow dysfunction in non-glabrous (hairy) skin of type 2 diabetes: a new model for the pathogenesis of microvascular dysfunction. Diabetes Care 1999;22(9):1549-54.
9. Jöreskog G., Kalani M., Kuhl J., Båvenholm P., Katz A., Allstrand G., Alvarsson M., Efendic S., Ostenson C.G., Pernow J., Wahren J., Brismar K. Early microvascular dysfunction in healthy normal-weight males with heredity for type 2 diabetes. Diabetes Care 2005;28(6):1495-7.
10. Czernichow S., Greenfield J.R., Galan P., Bastard J.P., Charnaux N., Samaras K., Safar M.E., Blacher J., Hercberg S., Levy B.I. Microvascular dysfunction in healthy insulin-sensitive overweight individuals. J Hypertens 2010;28(2):325-32.
11. Clark M.G. Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;295(4):E732-50.
12. Franklin V.L., Khan F., Kennedy G., Belch J.J., Greene S.A. Intensive insulin therapy improves endothelial function and microvascular reactivity in young people with type 1 diabetes. Diabetologia 2008;51(2):353-60.
13. Jarnert C., Kalani M., Rydén L., Böhm F. Strict glycaemic control improves skin microcirculation in patients with type 2 diabetes: A report from the Diabetes mellitus And Diastolic Dysfunction (DADD) study. Diab Vasc Dis Res 2012;9(4):287-95.

ПОВЫШЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ *IN VITRO*

Захаров С.Г.¹, Голенков А.К.¹, Митина Т.А.¹, Луцкая Т.Д.¹, Белоусов К.А.¹,
Фадеев Р.С.², Соловьева М.Е.², Сенотов А.С.³, Акатов В.С.²

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

²ФБГУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук; 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация

³ФГБУЗ «Саратовский медицинский центр Федерального медико-биологического агентства»; 413840, Саратовская обл., г. Балаково, ул. Трнавская, 44/1, Российская Федерация

Актуальность. Эффективность терапии острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) колеблется от 20 до 45%. Одна из причин этого – приобретенная лекарственная устойчивость лейкозных клеток, возникающая при применении противоопухолевых препаратов. Более важной причиной является возникновение первичной устойчивости клеток миелобластного лейкоза к индукции клеточной гибели, связанной с элементами микроокружения клеток в костном мозге. Изучение первичной устойчивости важно прежде всего для предотвращения приобретения лекарственной устойчивости лейкозных клеток и, соответственно, повышения эффективности медикаментозной терапии.

Цель – изучение механизмов первичной устойчивости клеток ОМЛ к индукции клеточной гибели.

Материал и методы. Использовали клетки ОМЛ человека THP-1 и мононуклеарные клетки костного мозга больных с диагностированным ОМЛ. Многоклеточные агрегаты формировали путем культивирования клеток на 1,5% агарозе. Для разобщения межклеточных контактов клетки культивировали на среде, содержащей 0,9% метилцеллюлозы. Жизнеспособность клеток оценивали по восстановлению индикатора Alamar Blue.

Основные результаты. В многоклеточных агрегатах 75±5% клеток THP-1 оказались устойчивы к действию рекомбинантного белка *izTRAIL*, 70±5% – этопозида и 40±7% – сорафениба. Разобщение межклеточных контактов подавляло устойчивость к их действию. В многоклеточных агрегатах первичных мононуклеарных клеток 45±5% клеток были устойчивы к действию сорафениба, 57±4% – этопозида. К действию *izTRAIL* были устойчивы все клетки. Разобщение межклеточных контактов подавляло устойчивость к действию сорафениба и этопозида, но не *izTRAIL*.

Заключение. В многоклеточных агрегатах у клеток ОМЛ THP-1 и мононуклеарных клеток костного мозга происходит повышение устойчивости к действию рекомбинантного белка *izTRAIL*, этопозида, сорафениба. Разобщение межклеточной адгезии в среде с метилцеллюлозой подавляет устойчивость клеток к действию цитотоксических агентов.

Ключевые слова: острый миелобластный лейкоз, лекарственная устойчивость *in vitro*, многоклеточные агрегаты, межклеточная адгезия.

INCREASE OF DRUG RESISTANCE OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS IN MULTICELLULAR AGGREGATES *IN VITRO*

Zakharov S.G.¹, Golentkov A.K.¹, Mitina T.A.¹, Lutskaia T.D.¹, Belousov K.A.¹,
Fadeev R.S.², Solovieva M.E.², Senotov A.S.³, Akatov V.S.²

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS; 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

³Saratov Medical Centre of the FMBA of Russia; 44/1 Trnavskaya ul., 413840 Balakovo, Russian Federation

Background: Therapeutic efficiency in treatment of acute myeloid leukemia (AML) ranges from 20 to 45%. One of the causes of the latter is a drug resistance acquired by leukemic cells under the influence of treatment with antitumor medicines. More important cause is a development of the primary resistance of myeloid leukemic cells to induction of cellular death associated with elemental microenvironment within the bone marrow. Studying primary resistance is very important, and first of all, to prevent development of drug resistance of leukemic cells and, correspondingly, to increase the efficiency of medicament therapy.

Aim: To study the mechanisms of primary resistance of AML cells to induction of cellular death.

Materials and methods: Human AML cells of THP-1 line and mononuclear cells of the bone marrow were used in the study of patients with diagnosed AML. Multicellular aggregates were formed during cell cultivating on the 1.5% agarose. To cut off intercellular adhesion, the cells were cultivated in the medium with methylcellulose (0.9%). The viability of the cells was assessed by reduction of Alamar Blue indicator.

Results: Within multicellular aggregates, about 75±5% of THP-1 cells were resistant to the activity of recombinant protein izTRAIL, 70±5% – to etoposide, and 40±7% – to sorafenib. Cutting off intercellular contacts decreased the resistance to them. Within multicellular aggregates of primary mononuclear cells, 45±5% of cells were resistant to sorafenib, 57±4% – to etoposide, and all cells were resistant to izTRAIL. Cutting off intracellular adhesion reduced the resistance to sorafenib and etoposide but not to izTRAIL.

Conclusion: In multicellular aggregates, AML cells of THP-1 line and mononuclear cells of the bone marrow showed increased resistance to activity of recombinant protein izTRAIL, etoposide, and sorafenib. Diminishing intracellular adhesion in the medium including methylcellulose decreases cellular resistance to cytotoxic agents.

Key words: acute myeloid leukemia, drug resistance *in vitro*, multicellular aggregates, intercellular adhesion.

ВВЕДЕНИЕ

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) – злокачественная опухоль гемопоэтической системы, которая характеризуется накоплением аномальных (лейкозных) бластных клеток, главным образом в костном мозге, и нарушением нормального гемопоэза и сопровождается инфильтрацией костного мозга лейкозными клетками, анемией и тромбоцитопенией [1]. Для ОМЛ характерно наличие соматических мутаций в мультипотентных гемопоэтических клетках или, в некоторых случаях, более дифференцированных клетках-предшественниках. Клетки, содержащие мутации, отличаются более ускоренной пролиферацией и активацией антиапоптотических молекулярных путей по отношению к пулу нормальных стволовых клеток красного костного мозга [2].

Эффективность терапии ОМЛ в клинике колеблется от 20 до 45% [3]. Одна из основных причин недостаточной эффективности медикаментозной терапии ОМЛ – лекарственная устойчивость лейкозных клеток. Этиология данного феномена представлена как минимум двумя основными причинами. Одной из них является приобретение устойчивости к препаратам, возникающее при длительном их применении. Механизмы такой приоб-

ретенной лекарственной устойчивости включают в себя снижение внутриклеточной концентрации препаратов, модификации внутриклеточных молекулярных мишеней, увеличение активности метаболизма препарата, активацию системы репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты и антиапоптотической системы клетки. Другой, и более важной, причиной является возникновение *de novo* (первичной) устойчивости клеток миелобластного лейкоза к индукции клеточной гибели. Именно *de novo* устойчивость может являться первым шагом для клеток лейкоза на пути приобретения устойчивости не только к противоопухолевой терапии, но и к основным эффекторам противоопухолевого иммунитета. Клеточные и гуморальные элементы микроокружения клеток лейкоза играют определяющую роль в возникновении *de novo* устойчивости к клеточной гибели. Например, при непосредственном контакте клеток миеломы и миелобластного лейкоза с мезенхимальными клетками стромы костного мозга значительно повышается устойчивость злокачественно трансформированных клеток [4]. Компонентами *de novo* устойчивости также могут являться гуморальные факторы микроокружения клеток лейкозов, такие как колониестимулирующие факторы, факторы роста и провоспалительные

Захаров Сергей Геннадьевич – науч. сотр. отделения гематологии и иммунотерапии МОНКИ. **Голенков Анатолий Константинович** – д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения гематологии и иммунотерапии МОНКИ. **Митина Татьяна Алексеевна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отделения гематологии и иммунотерапии МОНКИ. **Луцкая Татьяна Дмитриевна** – канд. мед. наук, зав. отделением гематологии и иммунотерапии МОНКИ. **Белоусов Кирилл Александрович** – науч. сотр. отделения гематологии и иммунотерапии МОНКИ. **Фадеев Роман Сергеевич** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН. **Соловьева Марина Евгеньевна** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории тканевой инженерии ИТЭБ РАН. **Сенотов Анатолий Сергеевич** – биолог отделения клинической лабораторной диагностики СМЦ ФМБА России. **Акатов Владимир Семенович** – д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией тканевой инженерии ИТЭБ РАН.

Для корреспонденции: Фадеев Роман Сергеевич – 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация. Тел.: +7 (926) 438 45 57. E-mail: fadeevrs@gmail.com

Zakharov Sergey Gennad'evich – scientific worker, Department of Hematology and Immunotherapy, MONIKI. **Golenkov Anatoliy Konstantinovich** – MD, PhD, Professor, the Head of the Department of Hematology and Immunotherapy, MONIKI. **Mitina Tat'yana Alekseevna** – MD, PhD, senior scientific worker, Department of Hematology and Immunotherapy, MONIKI. **Lutskaia Tat'yana Dmitrievna** – PhD, the executive of the Department of Hematology and Immunotherapy, MONIKI. **Belousov Kirill Aleksandrovich** – scientific worker, Department of Hematology and Immunotherapy, MONIKI. **Fadeev Roman Sergeevich** – PhD, scientific worker, Laboratory of Pharmacologic Regulation of Cell Resistance, ITEB. **Solovieva Marina Evgen'evna** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of Tissue Engineering, ITEB. **Senotov Anatoliy Sergeevich** – biologist of the Clinical Diagnostic Laboratory, SMC. **Akatov Vladimir Semenovich** – PhD, Professor, the Head of the Laboratory of Tissue Engineering, ITEB.

Correspondence to: Fadeev Roman Sergeevich – 3 Institutskaya ul., Pushchino 142290, Russian Federation. Tel.: +7 (926) 438 45 57. E-mail: fadeevrs@gmail.com

цитокины, секретируемые как клетками лейкоза, так и окружающими нормальными гемопоэтическими и стромальными клетками [5]. Таким образом, *de novo* устойчивость клеток миелобластного лейкоза к индукции клеточной гибели может возникнуть в результате сочетанного действия межклеточной адгезии и гуморальных (пара- и аутокринных) факторов. Изучение механизмов *de novo* устойчивости клеток ОМЛ к индукции клеточной гибели важно прежде всего для предотвращения приобретенной устойчивости клеток лейкоза и, соответственно, для повышения эффективности медикаментозной терапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры

В качестве клеточной модели в работе использовали клетки ОМЛ человека линии ТНР-1, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург), и моноклеарные фракции клеток костного мозга человека, полученные от больных с диагностированным ОМЛ. Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F-12 (Биолот, Россия) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина при 37 °С в условиях 5% содержания CO₂ в воздухе. Клетки линии ТНР-1 и моноклеарные клетки костного мозга при культивировании формировали клеточные агрегаты размером от 5 до 25 клеток. Для экспериментов клетки культивировали на 96-луночных планшетах, по 5000 клеток в лунке, в 100 мкл питательной среды RPMI 1640/F-12 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки в течение 24 часов. Инкубацию клеток с цитотоксическими агентами проводили в течение 24 часов.

Выделение моноклеарной фракции красного мозга

Аспират костного мозга получали путем пункции гребня подвздошной кости по стандартной методике. Затем костный мозг разводили 1:1 0,9% раствором хлорида натрия в воде и проводили центрифугирование на градиенте фикола 1,077 (Sigma, США), 800 g, 30 минут, 4 °С. Далее стерильной серологической пипеткой собирали клетки на границе раздела фаз «фикола – жидкость», растворяли в среде RPMI 1640/F-12 (1:4) и центрифугировали 800 g, 5 минут. Осадок ресуспендировали в среде RPMI 1640/F-12 с 20% эмбриональной телячьей сыворотки и проводили оценку количества живых клеток с помощью витального красителя трипанового синего. Количество живых клеток после выделения составляло не менее 95%. Затем клеточную суспензию инкубировали в течение 12 часов в куль-

туральных чашках Петри. Клетки, не прикрепившиеся к подложке в течение времени инкубации, использовали для дальнейших экспериментов, моноклеарные клетки составляли не менее 90-95% от общего количества. В экспериментах использовали клетки, полученные от трех пациентов.

Формирование многоклеточных агрегатов

Многоклеточные агрегаты формировали путем культивирования клеток на 1,5% агарозе (Panreac, Испания) в течение 24 часов. Для этого культуральные 96-луночные планшеты покрывались 1,5% раствором агарозы, затем проводили посев по 5000 клеток в 100 мкл питательной среды RPMI 1640/F-12 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки. Через 24 часа в каждой лунке формировался единичный агрегат клеток.

Культивирование клеток в полужидкой среде

Для выяснения роли межклеточных контактов в формировании лекарственной устойчивости лейкозных клеток проводили культивирование клеток на полужидкой среде, содержащей 0,9% метилцеллюлозы (Sigma, США). Для этого клетки культивировали в течение 24 часов на 96-луночных планшетах, по 5000 клеток в лунке в 100 мкл питательной среды RPMI 1640/F-12 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, содержащей 0,9% метилцеллюлозы. Данная среда препятствует спонтанной агрегации клеток, которые в ней находятся в виде суспензии единичных клеток.

Анализ жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток после инкубации с цитотоксическими агентами оценивали по интенсивности восстановления метаболического индикатора Alamar Blue (Invitrogen, США). Для этого к клеткам после 24 часов инкубации с цитотоксическими агентами добавляли Alamar Blue в концентрации 100 мкг/мл. Затем клетки инкубировали с красителем в течение 4 часов при 37 °С в условиях 5% содержания CO₂ в воздухе и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны 595 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite (Tecan, Австрия). Все измерения проводили относительно контрольных (необработанных) клеток.

Статистический анализ

Результаты исследований представлены в виде среднего $\pm m$, где m – квадратичная ошибка среднего. Достоверность отличий средних значений оценивалась с помощью *t*-критерия Стьюдента. Эксперименты проводили не менее чем в трех повторях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При культивировании клеток ТНР-1 в составе многоклеточных агрегатов происходит повышение устойчивости клеток к действию цитотоксических агентов. При культивировании клеток в многоклеточных агрегатах $75 \pm 5\%$ клеток были устойчивы к действию рекомбинантного белка *izTRAIL*, $70 \pm 5\%$ – к действию этопозида и $40 \pm 7\%$ клеток – к действию сорафениба (см. рисунок). Разобщение межклеточных контактов при культивировании клеток ТНР-1 в полужидкой среде с метилцеллюлозой подавляло устойчивость клеток к действию *izTRAIL*, этопозида и сорафениба (одиночные клетки). В этих условиях все клетки приобретали чувствительность к действию цитотоксических агентов. Для первичных мононуклеарных клеток костного мозга пациентов с диагностированным ОМЛ получены сходные результаты. При культивировании первичных мононуклеарных клеток в многоклеточных агрегатах $45 \pm 5\%$ клеток были устойчивы к действию сорафениба и $57 \pm 4\%$ клеток – к действию этопозида. Интересно, что первичные мононуклеарные клетки костного мозга пациентов с диагностированным ОМЛ оказались устойчивыми к действию белка *izTRAIL*. Разобщение межклеточных контактов при культивировании первичных мононуклеарных клеток в полужидкой среде с метилцеллюлозой подавляло устойчивость клеток к действию сорафениба и этопозида (одиночные клетки), но не *izTRAIL* (одиночные клетки). В этих условиях все клетки приобретали чувствительность к действию цитотоксических препаратов, но не *izTRAIL*. Таким образом, в многоклеточных агрегатах клеток ОМЛ происходит повышение устойчивости к индукции клеточной гибели.

ОБСУЖДЕНИЕ

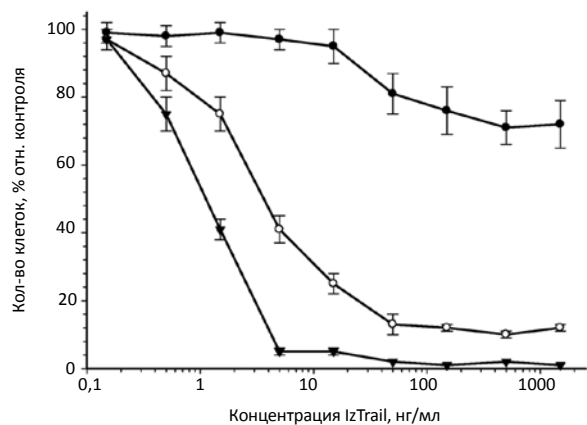
Культивирование в составе многоклеточных агрегатов способствует повышению первичной лекарственной устойчивости лейкозных клеток к действию рекомбинантного белка *izTRAIL*, ингибитора топоизомеразы II – этопозида и мультикиназного ингибитора – сорафениба. В то же время разобщение межклеточных контактов клеток ОМЛ при культивировании на среде, содержащей метилцеллюлозу, снижает первичную лекарственную устойчивость данных клеток к действию цитотоксических агентов.

Представленные данные указывают на то, что в основе *de novo* устойчивости клеток миелобластного лейкоза к индукции клеточной гибели лежат механизмы, связанные с межклеточной адгезией. На сегодняшний день известны внутриклеточные протеинкиназы и транскрипционные факторы, которые принимают участие в механизме лекарствен-

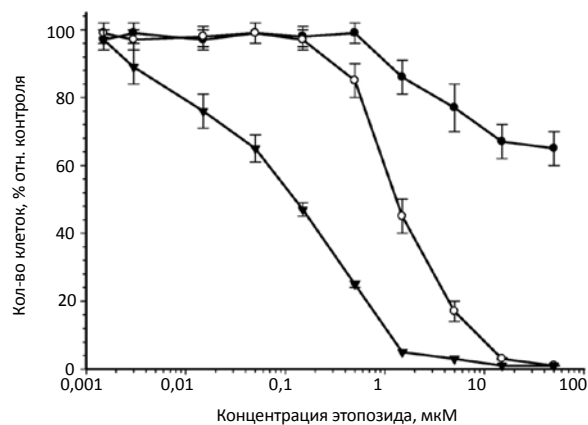
ной устойчивости лейкозных клеток, к ним относят следующие сигнальные белки: mTOR, PI3K, ABL1, FLT3, JAK2, митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) и фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1) [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. Все эти сигнальные белки также могут участвовать в механизмах *de novo* лекарственной устойчивости клеток ОМЛ.

На наш взгляд, в основе *de novo* лекарственной устойчивости клеток миелобластного лейкоза могут лежать как минимум две причины. У клеток в составе многоклеточных агрегатов может происходить активация антиапоптотической системы при непосредственном контакте мембраносвязанных молекул межклеточной адгезии, например, ICAM-1 (CD54) и LFA-1 (CD11a/CD18), а также ICAM-1 (CD54) и MAC-1 (CD11b/CD18). В источниках литературы имеются данные о том, что связывание ICAM-1 с помощью ингибирующих антител подавляет агрегацию клеток ТНР-1 [13, 14, 15]. Таким образом, можно предположить, что в формировании *de novo* лекарственной устойчивости клеток ОМЛ могут принимать участие внутриклеточные сигнальные пути, ассоциированные с активацией ICAM-1. Однако агрегация как клеток ТНР-1, так и мононуклеарных клеток костного мозга является конститутивной и не может непосредственно коррелировать с возникновением *de novo* лекарственной устойчивости.

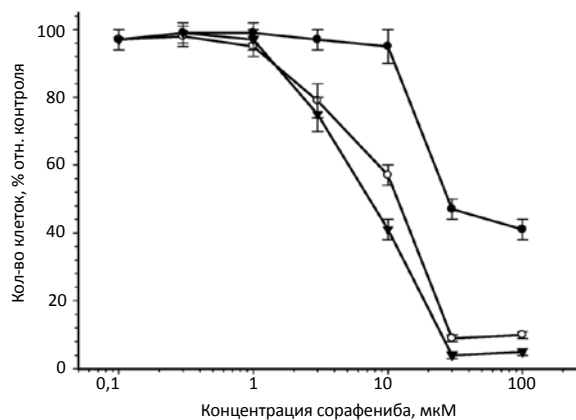
Еще одной причиной может быть гуморальная (ауто- и паракринная) регуляция устойчивости. Известно, что клетки ОМЛ секретируют такие провоспалительные цитокины, как гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерлейкин-1 β , -6, -8, фактор некроза опухоли (TNF) [16]. В свою очередь, интерлейкин-1 β , -6, -8 и TNF, являясь провоспалительными цитокинами, принимают участие в активации транскрипционного фактора NF- κ B, под транскрипционным контролем которого находится экспрессия генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [17]. Белки этого семейства защищают клетки ОМЛ от индукции апоптоза [18]. Секреция растворимых цитокинов может инициировать повышение лекарственной устойчивости. Однако в среде без агрегации происходит быстрое перераспределение цитокинов между клетками и средой. В случае с многоклеточными агрегатами секретируемые цитокины могут непосредственно действовать как на клетки-продуценты, так и на соседние клетки, создавая при этом эффект локального кондиционирования среды микроокружения клеток, тем самым повышая их лекарственную устойчивость. Можно также предположить, что активация межклеточных молекул адгезии может приводить к усилению секреции провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, активируют экспрессию молекул межклеточной адгезии.



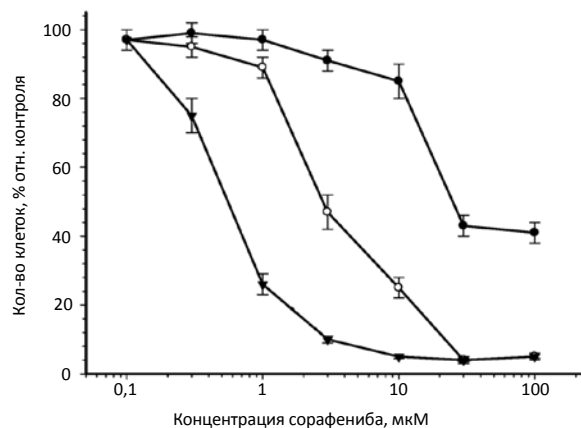
а



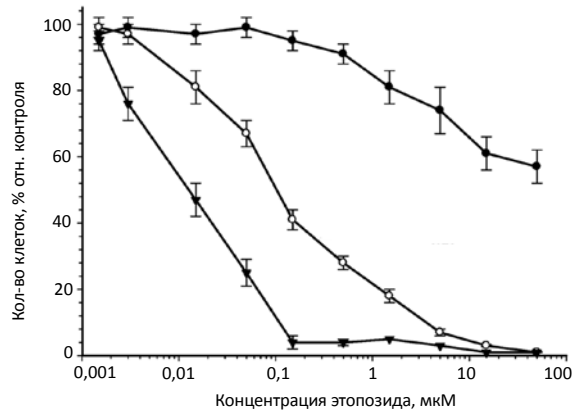
б



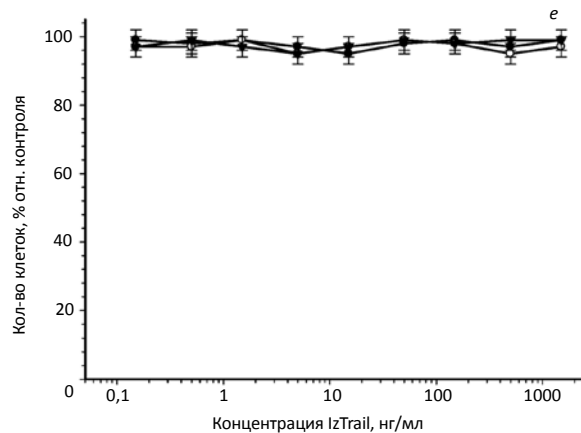
в



г



д



е

● Многоклеточный агрегат

○ Контрольные клетки

▲ Одиночные клетки

Повышение *de novo* лекарственной устойчивости клеток THP-1 (а, б, в) и первичных мононуклеарных клеток костного мозга пациентов с острым миелобластным лейкозом (г, д, е) в многоклеточных агрегатах

Таким образом, создается петля обратной связи в повышении лекарственной устойчивости клеток. Возникновение *de novo* лекарственной устойчивости возможно в условиях агрегации лейкозных клеток в костном мозге, где нет быстрых потоков жидкостей, в отличие от центральных и периферических кровеносных сосудов.

Изучение механизмов *de novo* лекарственной устойчивости лейкозных клеток важно не только для повышения эффективности консервативной терапии, но и для изучения молекулярных механизмов межклеточной коммуникации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клетки ОМЛ линии ТНР-1 в составе многоклеточных агрегатов становятся устойчивыми к действию индуктора апоптоза рекомбинантного белка *iz*TRAIL, этопозида, сорафениба. Разобщение межклеточной адгезии при культивировании клеток на среде с метилцеллюлозой подавляет их устойчивость к действию цитотоксических агентов. Сходные результаты получены для мононуклеарных клеток костного мозга пациентов с диагностированным ОМЛ.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований №14-04-32183, а также в рамках гранта Правительства РФ №14.250.31.0028 и государственного задания Минобрнауки РФ.

Литература

- Hoffman R., Furie B., McGlave P., Silberstein L., Shattil S. Hematology: basic principles and practice. 4th ed. New York: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.
- Marcucci G., Haferlach T., Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. J Clin Oncol 2011;29(5):475-86.
- Matthews J.P., Bishop J.F., Young G.A., Juneja S.K., Lowenthal R.M., Garson O.M., Cobcroft R.G., Dodds A.J., Enno A., Gillett E.A., Hermann R.P., Joshua D.E., Ma D.D., Szer J., Taylor K.M., Wolf M., Bradstock K.F. Australian Leukemia Study Group. Patterns of failure with increasing intensification of induction chemotherapy for acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2001;113(3):727-36.
- Sison E.A., Brown P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. Expert Rev Hematol 2011;4(3):271-83.
- Konopleva M., Andreeff M. Targeting the leukemia microenvironment. Curr Drug Targets 2007;8(6):685-701.
- Xu Q., Thompson J.E., Carroll M. mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells. Blood 2005;106(13):4261-8.
- Xu Q., Simpson S.E., Scialla T.J., Bagg A., Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. Blood 2003;102(3):972-80.
- Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G.M., Fanning S., Zimmermann J., Lydon N.B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med 1996;2(5):561-6.
- Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., Vassiliou G.S., Bench A.J., Boyd E.M., Curtin N., Scott M.A., Erber W.N., Green A.R. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005;365(9464):1054-61.
- Vainchenker W., Delhommeau F., Constantinescu S.N., Bernard O.A. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Blood 2011;118(7):1723-35.
- Konopleva M., Milella M., Ruvolo P., Watts J.C., Ricciardi M.R., Korichin B., McQueen T., Bornmann W., Tsao T., Bergamo P., Mak D.H., Chen W., McCubrey J., Tafuri A., Andreeff M. MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. Leukemia 2012;26(4):778-87.
- Benito J., Shi Y., Szymanska B., Carol H., Boehm I., Lu H., Konoplev S., Fang W., Zweidler-McKay P.A., Campana D., Borthakur G., Bueso-Ramos C., Shpall E., Thomas D.A., Jordan C.T., Kantarjian H., Wilson W.R., Lock R., Andreeff M., Konopleva M. Pronounced hypoxia in models of murine and human leukemia: high efficacy of hypoxia-activated prodrug PR-104. PLoS One 2011;6(8):e23108.
- Park H., Park S.G., Lee J.W., Kim T., Kim G., Ko Y.G., Kim S. Monocyte cell adhesion induced by a human aminoacyl-tRNA synthetase-associated factor, p43: identification of the related adhesion molecules and signal pathways. J Leukoc Biol 2002;71(2):223-30.
- Голенков А.К., Митина Т.А., Новиков В.В., Тагиров О.Т., Королева В.В., Крыжанов М.А., Луцкая Т.Д., Новиков Д.В., Барышников А.Ю. Клиническое значение растворимых молекул адгезии (sCD50-ICAM-3), апоптоза (SCD95) и sHLA класса I при лимфопролиферативных заболеваниях. Российский биотерапевтический журнал 2002;(1):60-4. [Golenkov A.K., Mitina T.A., Novikov V.V., Tagirov O.T., Koroleva V.V., Kryzhanov M.A., Lutskaia T.D., Novikov D.V., Baryshnikov A.Yu. Clinical significance of soluble adhesion molecules (sCD50-ICAM-3), apoptosis (SCD95) and sHLA class I in lymphoproliferative diseases. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal 2002;(1):60-4 (in Russian)].
- Митина Т.А. Значение экспрессии дифференцировочных антигенов, молекул адгезии и FAS/APO в оценке клинического течения множественной миеломы и хронического лимфолейкоза. Российский биотерапевтический журнал 2002;(1):47-60. [Mitina T.A. Significance of expression of differentiation antigens, adhesion molecules, and AS/APO in assessment of clinical course of multiple myeloma and chronic lymphatic leukemia. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal 2002;(1):47-60 (in Russian)].
- Sugiyama H., Inoue K., Ogawa H., Yamagami T., Soma T., Miyake S., Hirata M., Kishimoto T. The expression of IL-6 and its related genes in acute leukemia. Leuk Lymphoma 1996;21(1-2):49-52.
- Takahashi S., Harigae H., Ishii K.K., Inomata M., Fujiwara T., Yokoyama H., Ishizawa K., Kameoka J., Licht J.D., Sasaki T., Kaku M. Over-expression of Flt3 induces NF-kappaB pathway and increases the expression of IL-6. Leuk Res 2005;29(8):893-9.
- Konopleva M., Konoplev S., Hu W., Zaritskey A.Y., Afanasiev B.V., Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. Leukemia 2002;16(9):1713-24.

ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ ФОРМ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА

Иванов В.Е., Карп О.Э., Попова Н.Р., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И.

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук;
142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация

Актуальность. При воздействии ионизирующего излучения в присутствии кислорода активные формы кислорода (АФК), образующиеся в результате радиолитического распада воды, продуцируют долгоживущие активные формы белков (ДАФБ), которые являются источником вторичной длительной генерации АФК. Изменение содержания перекиси водорода (H_2O_2) под действием различных физических факторов может быть важным элементом лечебного воздействия и адаптации организма к влиянию неблагоприятных факторов среды в результате сигнально-регуляторных процессов. Тепловые воздействия широко используются в медицинской практике для различных лечебных процедур. Однако биологические механизмы их влияния остаются малоисследованными. В связи с этим актуальным является исследование возможности длительной генерации H_2O_2 ДАФБ после воздействия тепла. Это может быть одним из способов активации защитных клеточных механизмов, способствующих преодолению болезней.

Цель – исследование возможности образования ДАФБ белками сыворотки крови – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и гамма-глобулином быка (ГГ) – при умеренной гипертермии и определение существования ДАФБ, индуцированных теплом, и их способности длительно продуцировать генерацию АФК, в частности H_2O_2 .

Материал и методы. Исследование ДАФБ осуществляли методом измерения индуцированной хемилюминесценции растворов белков под действием тепла с использованием высокочувствительного хемилюминометра Биотокс-7АМ. Образование H_2O_2 , индуцированное ДАФБ в растворах БСА и ГГ под влиянием тепла, измеряли высокочувствительным методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол-р-йодофенол-пероксидаза хрена».

Основные результаты. В данной работе исследована возможность образования ДАФБ белками сыворотки крови – БСА и ГГ – при умеренной гипертермии. Показано, что тепло индуцирует образование ДАФБ, которые, в свою очередь, генерируют АФК (1O_2 , O_2^{*} , OH^* , H_2O_2). С помощью метода индуцированной хемилюминесценции продемонстрировано, что в растворах БСА и ГГ, подвергнутых умеренному нагреванию, происходит образование ДАФБ со временем полужизни около четырех часов. Методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол-р-йодофенол-пероксидаза хрена» показана длительная генерация H_2O_2 под действием ДАФБ.

Заключение. Таким образом, обнаружено новое, неизвестное ранее фундаментальное свойство белков сыворотки крови под действием умеренного нагревания образовывать ДАФБ, которые в течение длительного времени продуцируют H_2O_2 . Нельзя исключить, что тепловые воздействия при физиотерапевтических процедурах, которые используются в медицинской практике и сопровождаются образованием активных форм белков и длительной генерацией последними H_2O_2 , могут приводить к сигнально-регуляторному лечебному и адаптивному ответу в организме человека.

Ключевые слова: окисление белков, активные формы кислорода, долгоживущие активные формы белков, перекись водорода, тепловое воздействие.

FORMATION OF LONG-LIVED REACTIVE SPECIES OF BLOOD SERUM PROTEINS BY THE ACTION OF HEAT

Ivanov V.E., Karp O.E., Popova N.R., Chernikov A.V., Gudkov S.V., Bruskov V.I.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS; 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Background: Proteins oxidized by the action of X-rays represent long-lived reactive species, which trigger the secondary generation of reactive oxygen species (ROS). A change in the hydrogen peroxide (H_2O_2) content induced by various physical impacts may be an important factor of the therapeutic effect and the adaptation of the organism to unfavorable environmental conditions. Moderate hyperthermia and a number of physiotherapeutic procedures leading to a local warming of tissues are widely used in medical practice. However, the biological mechanisms of their curative effect are poorly understood. The prolonged generation of H_2O_2 long-lived reactive protein species (LRPS) after heating may be one of the mechanisms of activation of protective cellular mechanisms and thus to contribute to overcoming the disease.

Aim: To investigate if the serum proteins bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma-globulin (BGG) can form LRPS under moderate hyperthermia and show that heat induces LRPS, which in turn continuously generate ROS, in particular H_2O_2 .

Materials and methods: LRPS were studied by measuring the heat-induced chemiluminescence of protein solutions using a specially elaborated highly sensitive photon-counting chemiluminometer Biotoks-7 AM. The concentration of H_2O_2 formed in heated solutions of BSA and BGG was measured by the method of enhanced chemiluminescence in the system luminol-p-iodophenol-peroxidase.

Results: Here we studied the possibility of formation of long-lived species of the blood serum proteins BSA and BGG in air-saturated solutions under the action of heat. It is shown that heat induces the generation of long-lived protein species, which in turn generate ROS ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}^{\cdot}$, H_2O_2). The formation of the long-lived reactive species of BSA and BGG with a half-life of about 4 h induced by moderate hyperthermia was revealed using the chemiluminescence of protein solutions. It was found that long-lived reactive species of BSA and BGG cause prolonged generation of H_2O_2 .

Conclusion: Thus, we found a new fundamental property of serum proteins: by the action of moderate heating, they are able to transform into LRPS that produce H_2O_2 over a long period of time. Therefore, it cannot be excluded that the heat treatment during physiotherapeutic procedures in clinical practice is accompanied by local heating and the formation of LRPS. H_2O_2 generated by these species may participate in signaling pathways and induce adaptive response in humans.

Key words: protein oxidation, reactive oxygen species, long-lived reactive protein species, hydrogen peroxide, action of heat.

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) в живых организмах возникают как при нормальном клеточном метаболизме, так и при воздействии различных физико-химических факторов. Если уровень АФК превышает возможности нейтрализации антиоксидантной системы клетки, они вызывают окислительный стресс, оказывают повреждающее действие на биомолекулы, запускают разные патологические процессы. Тем не менее при нормальных физиологических условиях АФК в клетке, в первую очередь перекись водорода (H_2O_2), играют сигнально-регуляторную роль в разных биологических процессах как вторичный мессенджер [1, 2]. Последние данные о роли H_2O_2 в клеточной сигнализации млекопитающих представлены в обзорах [1, 2, 3]. Изменение ее содержания под действием различных физических факторов может быть важным элементом лечебного воздействия и адаптации организма к влиянию неблагоприятных факторов среды [2]. В медицинской практике широко применяют умеренную гипертермию и ряд физиотерапевтических процедур, сопровождающихся локальным прогреванием тканей. Однако биологические механизмы их лечебного влияния остаются малоизученными.

Ранее мы показали, что под действием тепла в водных растворах образуются АФК [4, 5, 6, 7]. Есть все основания полагать, что образование H_2O_2 является причиной лечебного воздействия. Высокое содержание в клетках белков делает их второй после воды основной мишенью воздействия АФК. При дей-

ствии высоких доз ионизирующего излучения в присутствии кислорода АФК, образующиеся в результате радиолиза воды, продуцируют долгоживущие активные формы белков (ДАФБ), включающие в себя долгоживущие белковые радикалы и гидропероксиды белков [8, 9]. В настоящее время образование долгоживущих белковых радикалов показано для многих белков под действием гамма-, рентгеновского и ультрафиолетового излучений, а также ряда химических соединений [10]. Было установлено, что долгоживущие белковые радикалы вызывают мутации и трансформации клеток [11] и в небольших количествах образуются в клетках животных и растений при нормальной жизнедеятельности [12]. Ранее было показано, что ДАФБ являются источниками вторичных свободных радикалов, которые вызывают дальнейшее окисление биомолекул (белков, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и др.) [8, 9]. Радиационно-индуцированные ДАФБ могут генерировать АФК в течение длительного времени, оказывая генотоксическое действие на ДНК [9, 13], что может быть причиной длительного окислительного стресса после прекращения воздействия ионизирующего излучения. Поскольку тепловое воздействие, как и ионизирующее излучение [4, 5, 6, 7], вызывает продукцию АФК, в данной работе исследовано образование ДАФБ белками сыворотки крови – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и гамма-глобулином быка (ГГ) – при умеренной гипертермии и показаны существование ДАФБ и генерация ими АФК, в частности H_2O_2 .

Иванов Владимир Евгеньевич – мл. науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Карп Ольга Эдвиновна** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Попова Нелли Рустамовна** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Черников Анатолий Викторович** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Гудков Сергей Владимирович** – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Брусков Вадим Иванович** – д-р хим. наук, профессор, зав. лабораторией изотопных исследований ИТЭБ РАН.

Для корреспонденции: Иванов Владимир Евгеньевич – 142290, Московская обл., г. Пушкино, мкр «В», 35-149, Российская Федерация. Тел.: +7 (916) 980 33 79. E-mail: iwe88@rambler.ru

Ivanov Vladimir Evgen'evich – junior scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Karp Ol'ga Edvinovna** – PhD, scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Popova Nelli Rustamovna** – PhD, scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Chernikov Anatoliy Viktorovich** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Gudkov Sergey Vladimirovich** – PhD, leading scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Bruskov Vadim Ivanovich** – PhD, Professor, the Head of the Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS.

Correspondence to: Ivanov Vladimir Evgen'evich, 149-35 "B", 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 980 33 79. E-mail: iwe88@rambler.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие реактивы и материалы: 4-йодфенол, кумарин-3-карбоновая кислота (ККК), 7-ОН-кумарин-3-карбоновая кислота (7-ОН-ККК), пероксидаза хрена, БСА (Sigma, США) и ГГ (Serva, Германия), натрий фосфорнокислый одно- и двузамещенный (Amresco, США), натрий хлористый (Solvay, Франция), люминол (AppliChem, Германия), H_2O_2 , 99,5% кислород (Протвино, Россия). Все вещества применялись без дополнительной очистки. Свежеперегнанная бидистиллированная вода имела pH 5,8 и проводимость 120 мкСм/м.

Долгоживущие активные формы белков

Исследование ДАФБ осуществляли методом измерения хемилюминесценции растворов белков, индуцированной тепловым воздействием, с использованием высокочувствительного хемилюминометра Биотокс-7АМ (Экон, Россия). После нагревания растворов белков в течение двух часов при температуре 35-50 °С в темноте измеряли величину хемилюминесценции при комнатной температуре в пластиковых полипропиленовых флаконах для жидкостного сцинтилляционного счета объемом 20 мл (Beckman, США) [9, 10, 13].

Определение продукции перекиси водорода

Образование H_2O_2 , индуцированное ДАФБ в растворах БСА и ГГ под влиянием тепла, измеряли высокочувствительным методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол-р-йодофенол-пероксидаза хрена». В качестве хемилюминометра использовали жидкостный сцинтилляционный счетчик Бета-1 (Украина) для измерения β -излучения, работающий в режиме счета одиночных фотонов (без схемы совпадений), или хемилюминометр Биотокс-7А (Россия) [9].

Определение концентрации гидроксильных радикалов

Для количественного определения концентрации гидроксильных радикалов в растворе использовали специфичный для ОН-радикалов флуоресцентный зонд – кумарин-3-карбоновую кислоту [6, 14, 15]. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия) с $\lambda_{\text{ex}}=400$ нм, $\lambda_{\text{em}}=450$ нм. Калибровку проводили с помощью коммерческой 7-ОН-ККК.

Определение концентрации растворенного кислорода

Белковые растворы дополнительно насыщали кислородом путем барботирования в течение 15 минут. Концентрацию кислорода в растворе измеряли с помощью оксиметрического электро-

да ДКТП-02.4 на приборе Эксперт-001 (Эконикс-Эксперт, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хемилюминесцентные методы являются наиболее чувствительными для обнаружения и исследования ДАФБ [9, 10, 13]. Повышение температуры от 35 до 40 °С сопровождалось двукратным увеличением интенсивности хемилюминесценции белков, а до 45 °С – трехкратным. При концентрации БСА и ГГ 6,7 мкмоль [16] в фосфатно-солевом растворе (10 ммоль Na_2HPO_4 , 150 ммоль NaCl , pH 7,4) выявлено образование ДАФБ этих белков при нагревании.

Зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации БСА и ГГ имела двухфазную колоколообразную форму. При ~15 мкмоль БСА и ~3 мкмоль ГГ хемилюминесценция растворов достигала максимальных значений. Эти концентрации белков использовали для определения времени полужизни ДАФБ по уменьшению величины хемилюминесценции после теплового воздействия. Учитывая молекулярные массы БСА и ГГ (67 и 150 кДа соответственно; соотношение 1:2,24) и значения концентраций этих белков, соответствующие максимальным величинам хемилюминесценции (0,44 г/л для БСА и 1 г/л для ГГ; соотношение 1:2,27), видно, что максимальное количество люминесцирующих продуктов, образующихся в результате теплового воздействия, в среднем приблизительно одинаково в расчете на единицу массы этих белков. Кроме того, был установлен кислородный эффект, а именно зависимость интенсивности хемилюминесценции белковых растворов от концентрации растворенного кислорода.

Уменьшение интенсивности хемилюминесценции с течением времени после нагревания дает возможность определить время полужизни ДАФБ. Время полужизни радикалов БСА и ГГ составляло около четырех часов при воздействии тепла в диапазоне 35-50 °С.

Затем мы исследовали образование H_2O_2 , индуцированное ДАФБ в растворах БСА и ГГ под влиянием тепла (два часа, 45 °С). В случае ГГ наблюдается двухфазная зависимость образования H_2O_2 после теплового воздействия с четко выраженным максимумом при 1-2 мкмоль белка. Для БСА двухфазная зависимость более полого с наибольшим значением H_2O_2 при 10 мкмоль белка. В обоих случаях через один час после прогрева концентрация H_2O_2 составляла около 40 нмоль. Концентрации ГГ (2 мкмоль) и БСА (10 мкмоль), при которых наблюдался максимальный эффект, были использованы в дальнейшем для измерения содержания H_2O_2 в течение шести часов после теплового воздействия. В контрольном растворе без белка концентрация H_2O_2 составляла около 4-5 нмоль и уменьшалась к шести часам до

1 нмоль. В растворе БСА наблюдалось плавное увеличение концентрации H_2O_2 в течение четырех часов, а затем ее быстрое уменьшение к шести часам. В случае ГГ происходил рост ее концентрации до одного часа с последующим уменьшением к шести часам. Можно полагать, что в течение времени полужизни ДАФБ, которое составляет около четырех часов, происходит интенсивная генерация H_2O_2 , приводящая к росту ее концентрации для БСА в течение четырех часов и одного часа в случае ГГ с последующим распадом.

С помощью флуоресцентного зонда ККК, продукт гидроксирования которой – 7-ОН-ККК – интенсивно флуоресцирует [6, 9], определяли образование гидроксильных радикалов в растворах БСА и ГГ после двух часов нагревания при 45 °С. Содержание 7-ОН-ККК составляло 9,1 (4,6-13,4) нмоль для БСА и 15,2 (6,5-23,4) нмоль для ГГ (медиана, 95% доверительный интервал, $n=3$).

Таким образом, обнаружено новое, неизвестное ранее фундаментальное свойство белков сыворотки крови под действием умеренного нагревания образовывать ДАФБ, которые в течение длительного времени продуцируют H_2O_2 . Образование ДАФБ, индуцированных теплом, заведомо не должно ограничиваться только белками сыворотки крови, а должно быть присуще по крайней мере подавляющему большинству клеточных белков, как это происходит в случае рентгеновского излучения [9].

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 13-04-00730-а).

Литература

- Stone J.R., Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(3-4):243-70.
- Forman H.J., Maiorino M., Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2010;49(5):835-42.
- Veal E.A., Day A.M., Morgan B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007;26(1):1-14.
- Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. Образование активных форм кислорода в воде под действием тепла. Доклады РАН 2002;384(6):821-4. [Bruskov V.I., Masalimov Zh.K., Chernikov A.V. Formation of reactive oxygen shapes in water under the influence of heat. *Doklady RAN* 2002;384(6):821-4 (in Russian)].
- Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Z.K., Chernikov A.V. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* 2002;30(6):1354-63.
- Черников А.В., Брусков В.И. Генерация гидроксильных радикалов и других редокс-активных соединений в морской воде под действием тепла. *Биофизика* 2002;47(5):773-81. [Chernikov A.V., Bruskov V.I. Generation of hydroxyl radicals and other redox active compounds in the sea water exposed to heat. *Biofizika* 2002;47(5):773-81 (in Russian)].
- Брусков В.И., Черников А.В., Гудков С.В., Масалимов Ж.К. Активация восстановительных свойств анионов морской воды под действием тепла. *Биофизика* 2003;48(6):942-950. [Bruskov V.I., Chernikov A.V., Gudkov S.V., Masalimov Zh.K. Thermal activation of the reducing properties of seawater anions. *Biofizika* 2003;48(6):942-50 (in Russian)].
- Dean R.T., Giese S., Davies M.J. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci* 1993;18(11):437-41.
- Bruskov V.I., Karp O.E., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Gudkov S.V. Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation and their genotoxic action. *Free Radic Res* 2012;46(10):1280-90.
- Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Usacheva A.M., Bruskov V.I. Guanosine and inosine (riboxin) eliminate the long-lived protein radicals induced by X-ray radiation. *Dokl Biochem Biophys* 2007;413:50-3.
- Koyama S., Kodama S., Suzuki K., Matsumoto T., Miyazaki T., Watanabe M. Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation. *Mutat Res* 1998;421(1):45-54.
- Miyazaki T., Morikawa A., Kumagai J., Ikehata M., Koana T., Kikuchi S. Long-lived radicals produced by γ -irradiation or vital activity in plants, animals, cells, and protein solution: their observation and inhomogeneous decay dynamics. *Radiat Phys Chem* 2002;65(2):151-7.
- Karp O.E., Gudkov S.V., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Genotoxic effect of long-lived protein radicals in vivo generated by X-ray irradiation. *Dokl Biochem Biophys* 2010;434:250-3.
- Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла. *Биофизика* 2008;53(1):5-13. [Shtarkman I.N., Gudkov S.V., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in aqueous solutions of L-amino acids by the action of X-rays and heat. *Biofizika* 2008;53(1):5-13 (in Russian)].
- Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Smirnova V.S., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. *Radiat Res* 2006;165(5):538-45.
- Wentworth P.Jr., Jones L.H., Wentworth A.D., Zhu X., Larsen N.A., Wilson I.A., Xu X., Goddard W.A. 3rd, Janda K.D., Eschenmoser A., Lerner R.A. Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science* 2001;293(5536):1806-11.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПЕРВИЧНОГО МУЖСКОГО ГИПОГОНАДИЗМА

Куликова П.А.^{1,2}, Филюшкин Ю.Н.², Куликов Д.А.^{2,3}, Федулов А.В.², Машков А.Е.², Куликов А.В.³

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;

119192, г. Москва, Ломоносовский пр., 31/5, Российская Федерация

²ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт

им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

³ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук;

142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация

Актуальность. Разработка новых методов лечения первичного мужского гипогонадизма – актуальная медицинская проблема, для решения которой необходима удобная экспериментальная модель заболевания.

Цель – создание экспериментальной модели первичного мужского гипогонадизма.

Материал и методы. Исследование проводили на крысах-самцах Wistar, гипогонадизм инициировали путем временного наложения лигатуры на дистальную часть семенного канатика.

Основные результаты. Лигирование семенного канатика в течение трех суток приводит к стойкому нарушению репродуктивной и гормонообразующих функций. При меньших сроках воздействия нарушения самопроизвольно обратимы.

Заключение. Созданная модель первичного мужского гипогонадизма характеризуется стойким нарушением гормонообразующей и репродуктивной функций, технической доступностью, отсутствием токсического эффекта на другие органы и системы. Наличие модели открывает новые возможности для разработки подходов к лечению заболеваний репродуктивных органов у мужчин.

Ключевые слова: гипогонадизм, экспериментальная модель, тестикулы, тестостерон, ишемия, infertility.

EXPERIMENTAL MODEL OF THE PRIMARY MALE HYPOGONADISM

Kulikova P.A.^{1,2}, Filyushkin Yu.N.², Kulikov D.A.^{2,3}, Fedulov A.V.², Mashkov A.E.², Kulikov A.V.³

¹Lomonosov Moscow State University; 31/5 Lomonosovskiy prospekt, 119192 Moscow, Russian Federation

²Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

³Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS; 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Background: Development of the new methods of treatment of primary male hypogonadism is an urgent medical problem. Its solution requires a suitable experimental model of the disease.

Aim: The creation of new experimental model of primary male hypogonadism.

Materials and methods: The study was conducted on the male Wistar rats, hypogonadism was modeled by temporary ligation of the distal part of the spermatic cord.

Results: It was shown that three-day ligation of the spermatic cord led to persistent disturbance of the testosterone-producing and reproductive functions. These manifestations were reversible at shorter duration of the exposure.

Conclusion: The created model of primary male hypogonadism is characterized by the persistent testosterone-producing and reproductive functions disturbance, technical availability, non-toxicity to the other organs and systems. Availability of the model provides new opportunities for the development of approaches to treating diseases of the reproductive organs in men.

Keywords: hypogonadism, experimental model, testicles, testosterone, ischemia, infertility.

ВВЕДЕНИЕ

Мужской гипогонадизм – патологическое состояние, обусловленное уменьшением уровня андрогенов в организме или снижением чувствительности к ним. Первичный гипогонадизм вызван нарушением функции половых желез [1].

Андрогены играют ключевую роль не только в поддержании репродуктивной и сексуальной функций мужского организма. Прослеживается взаимосвязь между снижением уровня андрогенов и деминерализацией костей, саркопенией, нарушением метаболизма жиров, депрессией, повышен-

ной утомляемостью, угасанием когнитивных функций и пр. [2, 3]. Имеются данные о том, что снижение уровня тестостерона и увеличение 17β -эстрадиола коррелируют с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний и сердечно-сосудистой смертности [4].

На сегодняшний день основным методом лечения первичного мужского гипогонадизма остается заместительная терапия андрогенами, которая имеет ряд противопоказаний и побочных эффектов. Успешно устраняя некоторые симптомы андрогенодефицита, экзогенный тестостерон подавляет сперматогенез и лишь усугубляет такое значимое проявление гипогонадизма, как мужская infertility [5]. Согласно европейским рекомендациям, в рамках лечения мужского бесплодия заместительная терапия тестостероном строго противопоказана [6].

Таким образом, существует потребность в поиске новых подходов к лечению первичного мужского гипогонадизма, нацеленных на восстановление собственного андроген-продуцирующего аппарата. Для исследований в этой области необходимо использование удобной экспериментальной модели первичного гипогонадизма. В литературе нами были найдены описания нескольких моделей, но каждая из них имеет свои недостатки: самопроизвольное восстановление функции (модель абдоминального крипторхизма [7]), токсичность для всего организма (бусульфановая модель [8, 9]), потребность в высокой технической оснащенности лаборатории, существенные временные и финансовые затраты (выведение линий животных с синдромом Клайнфельтера [10]) и т.д.

Целью нашей работы стало создание экспериментальной модели первичного мужского гипогонадизма, отвечающей следующим требованиям: стойкое нарушение гормонообразующей и репродуктивной функций, техническая доступность, отсутствие

токсического эффекта на другие органы и системы. Поставлена задача исследования ишемического воздействия на тестикулы как фактора, инициирующего гипогонадизм. Нарушение кровоснабжения семенников представляется нам актуальным для изучения, так как в научной литературе имеются данные о значимых морфологических изменениях и снижении антиоксидантного статуса даже при кратковременном ишемическом воздействии [11]. Еще одной задачей стал подбор оптимального срока ишемического воздействия, необходимого для инициации стойких нарушений функции семенников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на крысах-самцах Wistar ($n=153$), возраст два месяца (соответствует массе 200-220 г). Ишемическое воздействие на тестикулы осуществляли путем временного наложения лигатуры на дистальную часть семенного канатика (*funiculus spermaticus*), что приводило к частичной окклюзии яичковой артерии (*arteria testicularis*). Данную манипуляцию проводили при помощи хирургической иглы и нити (Vicryl Plus, Johnson & Johnson).

Для определения минимального срока воздействия на семенники, приводящего к стойким нарушениям, накладывали лигатуру на правый семенной канатик на сроки одни, двое, трое, четверо суток (четыре группы животных). На разных сроках после снятия лигатуры проводили оценку массы и линейных размеров семенников, подвергнутых ишемии, в сравнении с контралатеральными интактными семенниками.

После определения необходимого срока ишемического воздействия новой группе экспериментальных животных проводили перевязку обоих семенных канатиков на установленный срок. Исследовали массу, линейные размеры семенников и уровень тестостерона через 48, 120, 134, 263 суток после инициации гипогонадизма. Также проводили тест на

Куликова Полина Александровна – лаборант лаборатории медико-физических исследований МОНИКИ, студентка факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. **Филюшкин Юрий Николаевич** – науч. сотр. отделения детской хирургии МОНИКИ. **Куликов Дмитрий Александрович** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории медико-физических исследований МОНИКИ, науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Федулов Александр Владимирович** – клинический ординатор отделения детской хирургии МОНИКИ. **Машков Александр Евгеньевич** – д-р мед. наук, профессор, руководитель детского хирургического отделения МОНИКИ. **Куликов Александр Владимирович** – д-р биол. наук, зав. сектором экспериментальной трансплантологии, ученый секретарь ИТЭБ РАН.

Для корреспонденции: Куликова Полина Александровна – 142290, Московская обл., г. Пушкино, мкр «Д», 8-26, Российская Федерация. Тел.: +7 (915) 208 96 53. E-mail: polinikul@mail.ru

Kulikova Polina Aleksandrovna – laboratory worker of the Laboratory of Medical and Physics Research, MONIKI; student of the Faculty of Fundamental Medicine, MSU. **Filyushkin Yuriy Nikolaevich** – scientific worker, researcher of the Pediatric Surgery Department, MONIKI. **Kulikov Dmitry Aleksandrovich** – PhD, senior researcher of the Laboratory of Medical and Physics Research, MONIKI; researcher of the laboratory of Isotopic Investigations, ITEB of RAS. **Fedulov Aleksandr Vladimirovich** – Resident Medical Practitioner of the Pediatric Surgery Department, MONIKI. **Mashkov Aleksandr Evgen'evich** – MD, PhD, Professor, Head of the Pediatric Surgery Department, MONIKI. **Kulikov Aleksandr Vladimirovich** – MD, PhD, Head of the Experimental Transplantology Department, Scientific secretary, ITEB of RAS.

Correspondence to: Kulikova Polina Aleksandrovna – 26/8 “D”, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation. Tel.: +7 (915) 208 96 53. E-mail: polinikul@mail.ru

фертильность, для чего одного самца через 48 суток после инициации подсаживали к пяти половозрелым самкам (всего исследовали 5 самцов и 25 самок). Оценивали количество покрытых самок [12].

Измерение тестостерона проводили на иммуноферментном автоматическом анализаторе HTI BioChem Analette. Все хирургические манипуляции выполняли под общей анестезией (Золетил и Ксилазин). Для забора крови и выделения семенников с целью взвешивания осуществляли эвтаназию экспериментальных животных путем введения летальной дозы анестетика – 200 мг/кг массы тела.

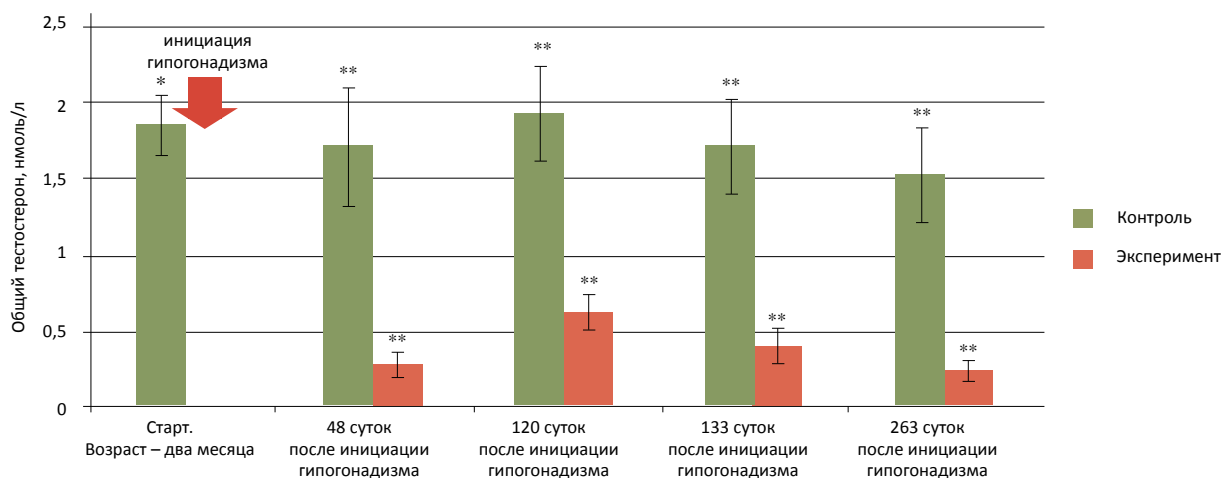
Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 21-23 °С. Они получали сбалансированный гранулированный корм, свободный доступ к питьевой воде. Исследования проводили по протоколам, одобренным Комиссией по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Работа выполнена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), в Приказе Минздрава СССР №755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 6.0, Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через месяц после временного ишемического воздействия (одно-, двух-, трех-, четырехсуточная ишемия) у животных всех экспериментальных групп наблюдалось значимое уменьшение массы и линейных размеров исследуемых органов в сравнении с ин-

тактными семенниками – в 1,5-7 раз ($p < 0,05$). Минимальный срок окклюзии, после которого не отмечалось восстановления массы и размеров семенников на отдаленных сроках после инициации гипогонадизма (два месяца и более), – трое суток. Значимого снижения концентрации тестостерона не наблюдали ни в одной группе животных, что, вероятно, обусловлено воздействием только на один семенник. У животных, подвергнутых одно- и двухсуточной перевязке, уменьшение массы и линейных размеров семенников оказалось обратимым. Таким образом, в качестве минимально необходимого срока частичной окклюзии *a. testicularis* нами было принято трехсуточное воздействие. При такой длительности воздействия ни в одном из случаев не наблюдали некротических изменений тканей.

Дальнейшее изучение модели проводилось на животных, перенесших наложение лигатуры на семенной канатик на срок трое суток. Было показано, что масса и линейные размеры семенников крыс, перенесших двустороннюю перевязку семенного канатика, в 2-5 раз меньше, чем у интактных самцов того же возраста, на всех исследуемых сроках (через 48, 120, 134, 263 суток) после инициации гипогонадизма ($p < 0,05$). Однако очевидно, что масса семенников при изучении гипогонадизма является косвенным параметром, и основной интерес представляет уровень тестостерона исследуемых животных. Измерение общего тестостерона показало, что уровень этого гормона у экспериментальных животных значимо ниже такового у группы интактного контроля на всех исследуемых сроках – через 48, 120, 134, 263 суток после инициации гипогонадизма ($p < 0,05$) (см. рисунок). Тест на фертильность был отрицательным – ни одна из самок, подсаженных к экспериментальным животным, не дала потомства.



Уровень тестостерона на разных сроках после инициации гипогонадизма

Примечание: * n=10, ** n=5.

ОБСУЖДЕНИЕ

Помимо *a. testicularis* в состав семенного канатика входят другие важные анатомические структуры (семявыносящий проток, артерия семявыносящего протока, венозное лозовидное сплетение, нервы, лимфатические сосуды, остатки влагалищного отростка). В настоящий момент мы не можем утверждать, что повреждение семенников в результате временной перевязки семенного канатика обусловлено исключительно нарушением кровотока по яичковой артерии. Тем не менее мы предполагаем, что при исследуемых кратковременных сроках воздействия именно ишемия семенников приводит к инициации гипогонадизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований создана модель первичного мужского гипогонадизма, характеризующаяся стойким снижением гормон-продуцирующей функции, инфертильностью, отсутствием токсического воздействия на организм экспериментальных животных, технической доступностью. Разработана методика лигирования семявыносящего протока, подобран минимальный срок, необходимый для инициации стойких нарушений функции семенников, показано негативное влияние временного лигирования семенного канатика на функционирование семенников. Наличие модели открывает новые возможности для разработки подходов к лечению заболеваний репродуктивных органов у мужчин.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» 2013 и 2014 гг., программы «УМНИК».

Литература

1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.В. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. [Dedov I.I., Mel'nichenko G.A., Fadeev V.V. Endocrinology. Moscow: GEOTAR-Media; 2007 (in Russian)].
2. Dohle G.R., Arver S., Bettocchi C., Kliesch S., Punab M., de Ronde W. Guidelines on male hypogonadism. Arnhem (The Netherlands): European Association of Urology; 2012.
3. Huhtaniemi I. Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment. Asian J Androl 2014;16(2):192-202.
4. Corona G., Rastrelli G., Monami M., Guay A., Buvat J., Sforza A., Forti G., Mannucci E., Maggi M. Hypogonadism as a risk factor for cardiovascular mortality in men: a meta-analytic study. Eur J Endocrinol 2011;165(5):687-701.
5. Kliesch S. Testosterone and infertility. Urologe A 2010; 49(1):32-6.
6. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R., Giwercman A., Kopa Z., Tournaye H., Krausz C. Guidelines on male infertility. Arnhem (The Netherlands): European Association of Urology; 2013.
7. Sukhikh G.T., Kamalov A.A., Poltavtseva R.A., Zarskii E.I., Plotnikov E.Y., Kirpatovskii V.I., Efremov E.A., Orlova E.V., Pavlova G.V., Okhobotov D.A. Effect of xenotransplantation of cell cultures enriched with stem and progenitor cells on hormonal profile of rats with abdominal cryptorchism. Bull Exp Biol Med 2008;146(4):517-21.
8. Zhang Z., Shao S., Meistrich M.L. Irradiated mouse testes efficiently support spermatogenesis derived from donor germ cells of mice and rats. J Androl 2006;27(3):365-75.
9. Meistrich M.L. Male gonadal toxicity. Pediatr Blood Cancer 2009;53(2):261-6.
10. Swerdloff R.S., Lue Y., Liu P.Y., Erkkilä K., Wang C. Mouse model for men with klinefelter syndrome: a multifaceted fit for a complex disorder. Acta Paediatr 2011;100(6):892-9.
11. Yuluğ E., Türedi S., Karagüzel E., Kutlu O., Mentese A., Alver A. The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis. J Pediatr Surg 2014;49(3):484-9.
12. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Киев: Выща школа, 1974. [Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakhariya E.A. Laboratory animals. Kiev: Vyscha shkola; 1974 (in Russian)].

МАРКЕРЫ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С ГИПОПИТУИТАРИЗМОМ

Михайлова Д.С., Иловайская И.А.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Актуальность. Преждевременное старение снижает качество жизни человека, приводит к развитию «заболеваний старости» в молодом возрасте, а также укорачивает продолжительность жизни.

Цель – изучение маркеров преждевременного старения у женщин репродуктивного возраста с центральным нелеченным гипогонадизмом в сочетании с другими видами гипопитуитарной недостаточности.

Материал и методы. Проведено исследование гормональных и биохимических показателей, определены индекс массы тела (ИМТ) и минеральная плотность кости (МПК) у 87 женщин репродуктивного возраста (медиана – 24 года) с центральным декомпенсированным гипогонадизмом в сочетании с другими компенсированными видами гипопитуитарной недостаточности (гипопитуитаризм) и 52 практически здоровых женщин аналогичного возраста.

Основные результаты. При гипопитуитаризме наблюдалось выраженное, статистически значимое по сравнению со здоровыми женщинами снижение концентраций не только эстрадиола, но и общего и свободного тестостерона, а также дегидроэпиандростерон-сульфата. Были выявлены следующие маркеры преждевременного старения: повышение показателей ИМТ ($p=0,025$), общего холестерина ($p<0,001$) и триглицеридов ($p<0,001$), ионизированного кальция ($p<0,001$), щелочной фосфатазы ($p=0,006$), а также показателя активности костной резорбции СТх ($p=0,025$); снижение МПК у 87% пациенток (преимущественно менее $-2,5$ SD в поясничных позвонках). На основании проведенного корреляционного анализа было показано, что гипоандрогенемия наряду с гипострогенемией является патогенетической основой выявленных расстройств.

Заключение. У женщин репродуктивного возраста с нелеченным гипогонадизмом и другими компенсированными видами гипопитуитарной недостаточности выявляются такие маркеры преждевременного старения, как повышение ИМТ, дислипидемия, рост уровня маркеров костного метаболизма, снижение МПК. Компенсацию гипогонадизма в этой когорте пациенток необходимо рассматривать как профилактику преждевременного старения.

Ключевые слова: преждевременное старение, женщины репродуктивного возраста, гипопитуитаризм, центральный гипогонадизм.

PREMATURE AGING MARKERS IN WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE WITH HYPOPITUITARISM

Mikhaylova D.S., Ilovayskaya I.A.

Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

Background: Premature aging reduces quality of human life, leads to development of “old age diseases” in younger age, and also shortens life expectancy.

Aim: Investigation of premature aging markers in women of reproductive age with central untreated hypogonadism in association with other compensated pituitary deficiencies.

Materials and methods: Hormonal and biochemical parameters, body mass index (BMI) and body mineral density (BMD) were investigated in 87 women of reproductive age (median – 24 y.o.) with the central untreated hypogonadism in association with other compensated pituitary deficiencies (hypopituitarism) and in 52 healthy age-matched controls.

Results: Low levels of estrogens as well as androgens (total and free testosterone, DHEA-S) were found in women with hypopituitarism as compared to the controls. Such markers of premature aging as increased BMI ($p=0,025$), high levels of cholesterol ($p<0,001$) and triglycerides ($p<0,001$), ionized calcium ($p<0,001$), alkaline phosphatase ($p=0,006$), and CTx ($p=0,025$) were revealed; low BMD was found in 87% of patients with hypopituitarism (mainly $<-2,5$ SD in lumbar vertebra). Correlation analysis elucidated that hypoandrogenemia as well as hypostrogenemia was pathogenetic basis of premature aging in women with hypopituitarism and untreated hypogonadism.

Conclusion: Such markers of premature aging as BMI increase, dislipidemia, increased levels of bone metabolism markers, and low BMD were revealed in women of reproductive age with uncured hypogonadism and other compensated types of hypophysial insufficiency. Treatment of hypogonadism in this cohort of patients needs to be considered a prevention of the premature aging.

Key words: premature aging, women of reproductive age, hypopituitarism, central hypogonadism.

В соответствии с концепцией Всемирной организации здравоохранения под физиологическим старением понимается развивающееся в определенном возрасте угасание тех или иных физиологических

функций организма, являющееся результатом воздействия экзогенных и эндогенных факторов. Старение приводит к ограничению приспособительных возможностей организма, снижению его надежности

и повышению факторов риска развития определенных заболеваний. Под преждевременным старением следует понимать любое частичное или более общее ускорение темпа старения, приводящее к тому, что индивидuum опережает средний уровень старения той здоровой группы людей, к которой он принадлежит [1]. Преждевременное старение снижает качество жизни человека, в молодом возрасте приводит к развитию «заболеваний старости», а также укорачивает продолжительность жизни. Преждевременное старение организма может зависеть от влияния многих причин – как внутренних (в том числе и наследственности), так и внешних (средовых).

Одним из факторов физиологического старения женщин считается естественное угасание репродуктивной функции – менопауза. В период пери- и постменопаузы повышается индекс массы тела (ИМТ), развиваются дислипидемия и остеопороз [2]. Однако снижение содержания эстрогенов может наблюдаться в ряде случаев у женщин репродуктивного возраста с повреждением гонадотропной функции – центральным (гипогонадотропным) гипогонадизмом. Это относительно редкое заболевание, которое выявляется примерно у 10% женщин с первичной аменореей и 35% – со вторичной [3, 4]. Центральный гипогонадизм может быть изолированным или сочетаться с другими видами гипопитуитарной недостаточности (гипопитуитаризмом). По сведениям наиболее крупных баз данных пациентов с гипопитуитаризмом KIMS и НуроCCS, его самыми распространенными причинами являются опухоли гипофиза – 39,6 и 45,6% соответственно. Краниофарингиомы служат причинами данного заболевания в 11,4-12,2% случаев, синдром Шиена – в 5,3-5,6% [5, 6].

Целью работы было изучение патогенетических, клинических, метаболических и гормональных маркеров преждевременного старения у женщин с центральным гипогонадизмом в сочетании с другими видами гипопитуитарной недостаточности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 87 пациенток с декомпенсированным гипогонадотропным гипогонадизмом в сочетании с другими видами недостаточности гормонов

аденогипофиза (гипопитуитаризмом). Сочетание гипогонадизма и вторичного гипотиреоза было отмечено в 50,6% случаев, гипогонадизма, гипотиреоза и вторичного гипокортицизма – в 18,4%, гипогонадизма, гипотиреоза и верифицированной недостаточности соматотропного гормона – в 31%. На момент исследования гипотиреоз и гипокортицизм были компенсированы, все пациентки получали адекватную дозу левотироксина натрия и при необходимости гидрокортизона, содержание свободного T_4 составило 12,5 [11,8; 13,4] пмоль/л ($p=0,8$ по сравнению с контрольной группой). Клинических признаков надпочечниковой недостаточности у больных не отмечалось. Лечение гормоном роста и половыми стероидами пациентки не получали. Уровень пролактина у всех был нормальным.

В контрольную группу вошли 52 практически здоровые женщины, не принимавшие в течение 12 месяцев оральные контрацептивы, с регулярным двухфазным менструальным циклом.

Возраст пациенток составил 24 [22; 29] года в группах с гипопитуитаризмом и контрольной ($p=0,29$), возраст менархе существенно не различался – 12,8 [11,8; 15,2] и 13,2 [11,2; 15,1] года соответственно ($p=0,9$). Длительность аменореи у женщин с гипопитуитаризмом составляла 6,5 [5,0; 9,0] года.

Всем женщинам проводились общеклиническое обследование, определение ИМТ, биохимический анализ крови, гормональные исследования. Биохимические исследования осуществлялись при помощи анализатора Hitachi 912 по стандартной методике с использованием стандартных наборов фирмы Roche (Швейцария). Гормональное обследование проводилось при помощи автоматизированной системы Vitros фирмы Johnson & Johnson. Пробы крови для исследования забирались в утренние часы (8-11) натощак при венепункции локтевой вены. В контрольной группе определение гормональных показателей проводилось в 1-ю (фолликулярную) фазу менструального цикла. Исследование минеральной плотности кости (МПК) в поясничных позвонках и проксимальном отделе части бедра выполнялось при помощи денситометра фирмы Hologic (США) методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии.

Михайлова Дарья Сергеевна – врач-эндокринолог терапевтического отделения консультативно-диагностического отделения МОНИКИ. **Иловайская Ирэна Адольфовна** – канд. мед. наук, доцент курса диабетологии и частной эндокринологии факультета усовершенствования врачей, ст. науч. сотр. отделения терапевтической эндокринологии МОНИКИ.

Для корреспонденции: Иловайская Ирэна Адольфовна – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: +7 (916) 677 26 45. E-mail: irena.ilov@yandex.ru

Mikhaylova Dar'ya Sergeevna – MD, physician-endocrinologist, Therapeutic department, Consulting and Diagnostic Department of MONIKI. **Ilovayskaya Irena Adol'fovna** – PhD, Assistant Professor, the Course of Diabetology and Particular (Special) Endocrinology, the Faculty of Postgraduate Medical Training of MONIKI; senior scientific worker, Department of Therapeutic Endocrinology, MONIKI.

Correspondence to: Ilovayskaya Irena Adol'fovna – 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 677 26 45. E-mail: irena.ilov@yandex.ru

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием статистической программы Statistica 8.0 для Windows 7.0 с применением методов вариационной статистики для непараметрических данных. Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q25; Q75]. Для проведения корреляционного анализа использовался метод Спирмена. Для определения достоверности в независимых группах использовался U-тест Манна – Уитни. Критический уровень значимости при статистической проверке гипотез в данном исследовании был принят равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациенток с гипопитуитаризмом наблюдалось выраженное, статистически значимое по сравнению со здоровыми женщинами снижение концентраций не только эстрадиола (39 [30; 55] и 150 [116; 218] пмоль/л соответственно, $p < 0,001$), но и андрогенов: общего тестостерона (0,1 [0,1; 0,2] и 1,05 [0,8; 1,4] нмоль/л, $p < 0,001$), свободного тестостерона (1,4 [0,6; 2,0] и 10 [7,0; 16,0] пмоль/л, $p < 0,001$), а также дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С) – 128,3 [73,3; 850] и 5590 [4030; 6630] нмоль/л, $p < 0,001$. Эти результаты согласуются с данными К.К. Miller о том, что при гипопитуитаризме отмечается значимая гипоандрогения [7].

Концентрации половых стероидов прямо и статистически значимо коррелировали с концентрациями гонадотропинов (лютеинизирующий гормон (ЛГ) и эстрадиол $r = 0,67$; фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и эстрадиол $r = 0,64$; ЛГ и общий тестостерон $r = 0,47$; ФСГ и общий тестостерон $r = 0,42$; для всех $p < 0,001$). ЛГ и ДГЭА-С $r = 0,33$ ($p = 0,02$), ФСГ и ДГЭА-С $r = 0,27$ ($p = 0,03$). Выявленные корреляционные зависимости между концентрациями гонадотропинов и половых стероидов свидетельствуют о ключевой роли ЛГ и ФСГ в поддержании физиологического уровня как эстрогенов, так и андрогенов.

У женщин с гипопитуитаризмом по сравнению с контрольной группой показатели ИМТ были выше – 24,6 [21,4; 30] и 21 [19,5; 23,5] кг/м² соответственно, $p = 0,025$; избыточная масса тела и ожирение встречались гораздо чаще (рис. 1). При проведении корреляционного анализа была выявлена обратная статистически значимая зависимость между ИМТ и уровнем тестостерона ($r = -0,46$; $p = 0,03$), что свидетельствует об участии гипоандрогении в формировании ожирения.

Изучение показателей липидного обмена продемонстрировало, что у пациенток с гипопитуитаризмом по сравнению со здоровыми женщинами отмечалось статистически значимое повышение концентраций общего холестерина (5,85 [5,3; 7,8] и 4,75 [4,2; 5,2] ммоль/л соответственно, $p < 0,001$)

и триглицеридов (1,42 [1,3; 2,6] и 0,7 [0,6; 0,9] ммоль/л, $p < 0,001$). Отмечалась тенденция к повышению концентраций липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) (3,4 [2,4; 4,0] и 2,75 [2,3; 3,3] ммоль/л, $p = 0,15$) и снижению содержания липопротеидов высокой плотности (1,4 [1,04; 2,45] и 1,79 [1,44; 2,8]

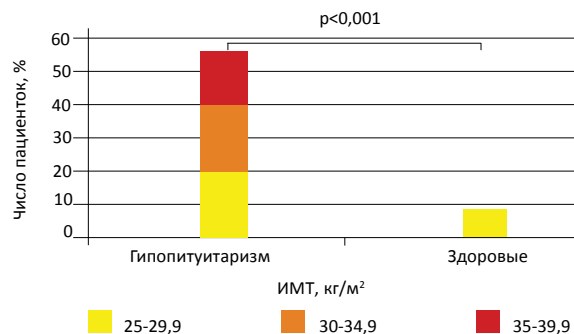


Рис. 1. Частота избыточной массы тела и ожирения

ммоль/л, $p = 0,58$), однако различия были статистически незначимыми. При гипопитуитаризме была значительно выше частота дислипидемий (рис. 2).

При проведении корреляционного анализа были выявлены обратные статистически значимые зависимости средней силы между концентрациями эстрадиола и холестерина ($r = -0,47$; $p < 0,001$), эстрадиола и триглицеридов ($r = -0,55$; $p = 0,0001$); общего тестостерона и холестерина ($r = -0,43$; $p = 0,007$), общего тестостерона и триглицеридов ($r = -0,43$; $p = 0,002$). На основании проведенного корреляционного анализа можно сделать вывод о том, что гипоандрогения наряду с гипоестрогенией является фактором риска развития дислипидемий у пациенток с гипопитуитаризмом и некомпенсированным гипогонадизмом.

При оценке показателей минерального обмена было обнаружено, что содержание ионизированного кальция у всех пациенток с гипопитуитаризмом находилось в пределах референсных значений, однако статистически значимо превышало показатели контрольной группы (1,16 [1,11; 1,21] и 1,05 [1,03; 1,09] ммоль/л соответственно, $p < 0,001$). Концентрации щелочной фосфатазы (ЩФ) были также повышены по сравнению с показателями здоровых женщин (160 [142; 255] и 141 [119; 151] мкЕд/л соответственно, $p = 0,006$). При этом концентрации фосфора существенно не различались (1,25 [1,12; 1,46] и 1,17 [1,13; 1,43] ммоль/л, $p = 0,25$).

При проведении корреляционного анализа были выявлены обратные статистически значимые зависимости между уровнями эстрадиола и ионизированного кальция ($r = -0,56$; $p < 0,001$), эстрадиола и ЩФ ($r = -0,33$; $p = 0,033$), общего тестостерона и ионизированного кальция ($r = -0,70$; $p < 0,001$), ДГЭА-С и ионизированного кальция ($r = -0,43$; $p = 0,006$), ДГЭА-С и ЩФ ($r = -0,40$; $p = 0,02$).

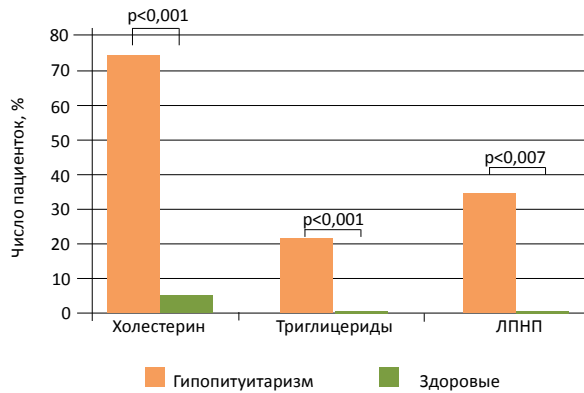


Рис. 2. Частота повышения уровня различных липидов

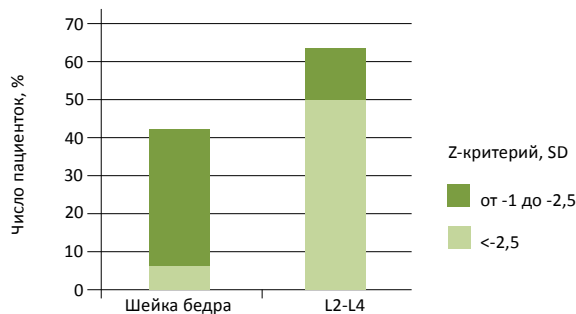


Рис. 3. Степень снижения МПК в различных отделах скелета у пациенток с гипопитуитаризмом

Содержание показателя активности костной резорбции СТх было статистически значимо выше у пациенток с гипопитуитаризмом по сравнению со здоровыми женщинами (0,84 [0,54; 1,21] и 0,54 [0,53; 0,58] мЕд/л, $p=0,025$). Отмечена статистически значимая прямая корреляционная зависимость между длительностью аменореи и концентрацией СТх ($r=0,78$; $p<0,001$), что свидетельствует об активизации костной резорбции в условиях снижения уровня половых стероидов и прогрессирования потерь костной ткани при персистировании гипогонадизма.

Показатели МПК были снижены у 87% пациенток с гипопитуитаризмом, при этом у 50% женщин отмечалось снижение МПК только в поясничном отделе позвоночника, у 23% – только в проксимальном отделе бедренной кости и у 13% – в обоих отделах скелета (рис. 3). Была выявлена обратная зависимость между продолжительностью аменореи и МПК поясничных позвонков ($r=-0,71$; $p=0,001$), что подчеркивает необходимость своевременного начала лечения гипогонадизма. Корреляции между содержанием эстрогенов и степенью потери МПК получено не было, однако была обнаружена прямая статистически значимая зависимость между концентрацией

общего тестостерона и МПК поясничных позвонков (МПК $r=0,62$; $p=0,03$), что свидетельствует о важной роли андрогенов в поддержании нормальных показателей МПК.

Полученные данные свидетельствуют о непосредственном участии в формировании нарушений минерального обмена как гипоэстрогемии, так и гипоандрогемии и о необходимости раннего начала лечения половыми стероидами женщин с гипогонадотропным гипогонадизмом, одной из целей которого является поддержание нормального гомеостаза костной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что у женщин репродуктивного возраста с гипопитуитаризмом (декомпенсированным гипогонадизмом и другими компенсированными видами гипопитуитарной недостаточности) выявляются такие маркеры преждевременного старения, как повышение ИМТ, дислипидемия, повышение уровня маркеров костного метаболизма, снижение МПК. Гипоэстрогемия и гипоандрогемия в репродуктивном возрасте можно считать патогенетической основой преждевременного старения. Компенсацию гипогонадизма у женщин репродуктивного возраста с гипопитуитаризмом необходимо рассматривать как профилактику преждевременного старения.

Литература

1. Лазебник Л.Б., Вёрткин А.Л., Конев Ю.В., Ли Е.Д., Скотников А.С. Старение: профессиональный врачебный подход. М.: Эксмо; 2014. [Lazebnik L.B., Vertkin A.L., Konev Yu.V., Li E.D., Skotnikov A.S. An aging: professional medical approach. Moscow: Eksmo; 2014 (in Russian)].
2. Сметник В.П., ред. Медицина климактерия. Ярославль: Литера; 2006. [Smetnik V.P., editor. Climacterim medicine. Yaroslavl: Litera; 2006 (in Russian)].
3. Tanmahasamut P., Rattanachaiyanont M., Dangrat C., Indhavivadhana S., Angsuwattana S., Techatrasak K. Causes of primary amenorrhea: a report of 295 cases in Thailand. J Obstet Gynaecol Res 2012;38(1):297-301.
4. Meczekalski B., Podfigurna-Stopa A., Warenik-Szymankiewicz A., Genazzani A.R. Functional hypothalamic amenorrhea: current view on neuroendocrine aberrations. Gynecol Endocrinol 2008; 24(1):4-11.
5. Webb S.M., Strasburger C.J., Mo D., Hartman M.L., Melmed S., Jung H., Blum W.F., Attanasio A.F. HypoCCS International Advisory Board. Changing patterns of the adult growth hormone deficiency diagnosis documented in a decade-long global surveillance database. J Clin Endocrinol Metab 2009;94(2):392-9.
6. Brabant G., Poll E.M., Jönsson P., Polydorou D., Kreitschmann-Andermahr I. Etiology, baseline characteristics, and biochemical diagnosis of GH deficiency in the adult: are there regional variations? Eur J Endocrinol 2009;161 Suppl 1:S25-31.
7. Miller K.K., Biller B.M.K., Beauregard C., Lipman J.G., Jones J., Schoenfeld D., Sherman J.C., Swearingen B., Loeffler J., Klibanski A. Effects of testosterone replacement in androgen-deficient women with hypopituitarism: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Clin Endocrinol Metab 2006;91(5):1683-90.

ФОНОВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА У БОЛЬНЫХ АКРОМЕГАЛИЕЙ

Титаева А.А., Терещенко С.Г., Лукина Е.М., Древалъ А.В., Иловайская И.А.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Актуальность. Одним из осложнений акромегалии является поражение желудочно-кишечного тракта, связанное с воздействием гормона роста на слизистую оболочку желудка и толстой кишки. При этом в литературе наблюдается дефицит данных по объективной оценке состояния желудочно-кишечного тракта у больных акромегалией.

Цель – выявить характер изменений слизистой оболочки желудка и толстой кишки у больных акромегалией.

Материал и методы. Работа основана на анализе результатов исследования 107 пациентов с акромегалией, наблюдавшихся в МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в период с 2006 по 2012 г. Все больные находились в отделении терапевтической эндокринологии на стационарном обследовании, в ходе которого была подтверждена акромегалия. Распределение больных по полу показывает, что в большинстве случаев акромегалией страдают женщины. Мужчин было 32, женщин – 75, соотношение мужчин и женщин – 1:2,2, что не противоречит данным литературы. Всем больным акромегалией были выполнены фиброэзофагогастродуоденоскопия, морфологическое исследование слизистой оболочки желудка, цитологическое исследование на *Helicobacter pylori* и фиброколоноскопия с биопсией в случае обнаружения патологического образования.

Основные результаты. Сравнительное изучение изменений слизистой оболочки органов пищеварения показало, что при эндоскопических исследованиях патология чаще встречается в верхних отделах пищеварительного тракта. Это может объясняться инфицированностью *Helicobacter pylori* и побочным эффектом аналогов соматостатина у данной группы пациентов, что усугубляет жизнедеятельность желудочного эпителия и создает предпосылки для возникновения новообразований у больных акромегалией. Анализ морфофункциональных изменений слизистой оболочки желудка и толстой кишки при акромегалии выявил, что наиболее часто при данном заболевании встречаются фовеолярная гиперплазия поверхностного эпителия, гиперпластические полипы и тубулярные аденомы, которые являются обязательным показанием для морфологического исследования слизистой оболочки желудка и толстой кишки у этой группы больных. Наше исследование установило высокую степень обсемененности слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* у пациентов с акромегалией – 81%.

Заключение. Результаты исследования показали, что выполнение эндоскопических исследований с обязательной прицельной биопсией и установление обсемененности *Helicobacter pylori* являются обязательными. Суммируя результаты исследования, представляется необходимым ежегодное гастроэнтерологическое обследование больных акромегалией.

Ключевые слова: акромегалия, поражение желудочно-кишечного тракта, обсемененность *Helicobacter pylori*.

BACKGROUND CHANGES OF THE DIGESTIVE SYSTEM MUCOSA IN PATIENTS WITH ACROMEGALY

Titaeva A.A., Tereshchenko S.G., Lukina E.M., Dreval' A.V., Ilovaiskaya I.A.

Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul.,
129110 Moscow, Russian Federation

Background: Gastrointestinal tract lesions due to the growth hormone impact on mucosa of both the stomach and colon contribute to the complications of acromegaly. In this case, there is a deficiency of the objective assessment data concerning the gastrointestinal tract condition in the acromegaly patients.

Aim: To reveal the character of changes in the mucosa of both stomach and colon in the acromegaly patients.

Materials and methods: The study is based on the results of analysis of 107 in-patients (32 men and 75 women) with suspected acromegaly who were observed during the period of 2006 to 2012 in the MONIKI Department of Therapeutic Endocrinology. Diagnosis of acromegaly was confirmed. Distribution of patients by gender showed that women suffer from acromegaly in the majority of cases. The ratio men/women equal to 1:2.2 correlates with the literature data. All acromegaly patients underwent the fibroesophago-gastroduodenoscopy, morphological investigation of the stomach mucosa, cytological analysis in search for *Helicobacter pylori* as well as fibrocolonoscopy plus biopsy in case of the pathological neoplasm identification.

Results: Comparative study of changes in the gastrointestinal tract mucosa demonstrated that endoscopic investigation more often showed pathological changes in the upper areas of the digestion tract. It may be explained by the *Helicobacter pylori* contamination or a side effect of somatostatin analogues in the given group of patients which impairs the stomach epithelium vital activity and enables development of neoplasms in the acromegaly patients. Analysis of the morphofunctional alterations of the stomach-and-colon mucosa in the acromegaly patients revealed concomitant diseases in these patients which were as follows: foveolar hyperplasia of the tegumental-foveolar epithelium, hyperplastic polyps, and tubular adenomas which are

an indication for obligatory morphologic investigation of the stomach-and-colon mucosa in this group of patients. Our study proved a high degree of the stomach mucosa contamination with *Helicobacter pylori* in the acromegaly patients: in 81% of our patients.

Conclusion: Our results showed that endoscopy with obligatory targeted biopsy and a search for *Helicobacter pylori* are extremely necessary for this group of patients. The results obtained are indicative of the necessity of annual gastroenterological examination of patients suffering from acromegaly.

Key words: acromegaly, gastrointestinal tract lesions, contamination with *Helicobacter pylori*.

Акромегалия – тяжелое нейроэндокринное заболевание, которое при сравнительно небольшой распространенности (60-70 случаев на 1 млн жителей) характеризуется высокой степенью ранней инвалидизации и смертности. Примерно половина из нелеченных больных умирают, не достигнув 50-летнего возраста. К преждевременному летальному исходу приводят острые сердечно-сосудистые, цереброваскулярные, респираторные, обменные нарушения и злокачественные неоплазии [1]. Данная патология обусловлена хронической гиперпродукцией соматотропного гормона (СТГ), опухолью гипофиза (98%) у лиц с завершённым физиологическим ростом, что, в свою очередь, приводит к значительному повышению продукции печенью инсулиноподобного ростового фактора-1 (ИРФ-1), который обуславливает тканевое действие СТГ. Чаще всего заболевание акромегалией отмечается между 20 и 40 годами. На 1 млн населения приходится от 50 до 70 случаев заболевания. Ежегодно фиксируется 3-4 случая обнаружения акромегалии [2].

Акромегалия характеризуется прогрессирующей инвалидизацией и сокращением продолжительности жизни. Смертность больных акромегалией превышает в 10 раз таковую в контрольной популяции. Приблизительно 50% нелеченных больных умирают в возрасте до 50 лет [2]. Основными причинами повышенной смертности и сокращения продолжительности жизни являются осложнения,

развивающиеся при данном заболевании: сердечно-сосудистая патология, сахарный диабет, заболевания органов дыхания, злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта и др. [3]. Частота новообразований желудочно-кишечного тракта у больных акромегалией выше в 2 раза и более по сравнению с таковой в общей популяции [1].

Механизм возникновения новообразований при акромегалии до сих пор неясен. Однако предварительные результаты исследований указывают на несомненную роль в данном процессе ИРФ-1 и специфического протоонкогена, индуцируемого избыточной продукцией СТГ [2]. При избыточной секреции гормона роста наблюдается прогрессирующее нефизиологическое умножение клеточной массы тканей и органов, сопровождающееся системными патоморфологическими и функциональными изменениями, а также изменениями пропорций тела. У больных наблюдается пролиферация соединительной ткани с накоплением внутриклеточного матрикса, увеличение объема мышечной ткани, гиперплазия эпителиальных клеток. Доказана способность СТГ (опосредованно через ИРФ-1) принимать активное участие в регуляции интенсивности митотического деления путем подавления экспрессии гена-супрессора клеточной пролиферации и модуляции процессов апоптоза. Патогенетической основой развития неопластических процессов в быстро делящихся клетках служит влияние повышен-

Титаева Анастасия Андреевна – мл. науч. сотр. отделения эндоскопии МОНИКИ. **Терещенко Сергей Григорьевич** – д-р мед. наук, руководитель отделения эндоскопии МОНИКИ. **Лукина Елена Михайловна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отделения эндоскопии МОНИКИ. **Древал Александр Васильевич** – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой эндокринологии факультета усовершенствования врачей МОНИКИ, руководитель отделения терапевтической эндокринологии МОНИКИ. **Иловайская Ирэна Адольфовна** – канд. мед. наук, доцент курса диабетологии и частной эндокринологии факультета усовершенствования врачей, ст. науч. сотр. отделения терапевтической эндокринологии МОНИКИ.

Для корреспонденции: Титаева Анастасия Андреевна – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: +7 (926) 187 90 72. E-mail: atitaeva@inbox.ru

Titaeva Anastasiya Andreevna – junior scientific worker, Department of Endoscopy, MONIKI. **Tereshchenko Sergey Grigor'evich** – MD, PhD, Head of the Department of Endoscopy, MONIKI. **Lukina Elena Mikhaylovna** – PhD, senior scientific worker, Department of Endoscopy, MONIKI. **Dreval Aleksandr Vasil'evich** – MD, PhD, Professor, Head of the Chair of Endocrinology, the Faculty of Postgraduate Medical Training of MONIKI, Head of the Department of Therapeutic Endocrinology, MONIKI. **Ilovaiskaya Irena Adol'fovna** – PhD, Assistant Professor, the Course of Diabetesology and Particular (Special) Endocrinology, the Faculty of Postgraduate Medical Training, MONIKI; senior scientific worker, Department of Therapeutic Endocrinology, MONIKI.

Correspondence to: Titaeva Anastasiya Andreevna – 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Tel.: +7 (926) 187 90 72. E-mail: atitaeva@inbox.ru

ных концентраций ИРФ-1 на интенсивность процессов апоптоза и пролиферации. Важную роль играет подавление генов-ингибиторов экспрессии ядерного белка Ki-67, отвечающего за митотическое деление клеток, а также усиление синтеза ингибиторов белка p53, удлиняющего пресинаптическую фазу.

Результаты биопсий из новообразований желудочно-кишечного тракта свидетельствуют о преобладании кишечных аденоматозных полипов, а также рака толстой кишки [2]. Однако прицельных исследований в этой области не проводилось, что дает основание исследовать желудочно-кишечный тракт у больных акромегалией для оценки характера и частоты возникновения новообразований у этой группы пациентов.

Цель исследования – выявить характер эндоскопических и морфофункциональных изменений слизистой оболочки желудка и толстой кишки у больных акромегалией, наличие и характер полиповидных образований и степень обсемененности слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа основана на анализе результатов исследования 107 пациентов с акромегалией, наблюдавшихся в МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в период с 2006 по 2012 г. Все больные находились в отделении терапевтической эндокринологии на стационарном обследовании, в ходе которого была подтверждена акромегалия.

Распределение больных по полу показывает, что в большинстве случаев акромегалией страдают женщины. Мужчин было 32, женщин – 75, соотношение мужчин и женщин – 1:2,2, что не противоречит данным литературы. Распределение по возрастным группам представлено в таблице, из данных которой видно, что наиболее часто акромегалией страдают пациенты в возрасте от 45 до 59 лет.

Всем больным были выполнены фиброэзофагогастродуоденоскопия, морфологическое исследование слизистой оболочки желудка, цитологическое исследование на *Helicobacter pylori* и фиброколоноскопия с биопсией в случае обнаружения патологического образования.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Характер изменений слизистой оболочки желудка при эзофагогастродуоденоскопии представлен на рис. 1. Недостаточность кардии была обнаружена у 41% пациентов, эзофагит 1-й степени – у 25%, эзофагит 2-й степени – у 4%, плоские эрозии желудка – у 13%, «полные» эрозии – у 17%.

По данным морфологического исследования взятых биоптатов, гиперпластические полипы были

Распределение больных акромегалией по возрасту

Возраст, лет				Всего
15-29	30-44	45-59	60 и старше	
2 (2%)	20 (18,7%)	52 (48,6%)	33 (30,7%)	107

выявлены у 18% больных акромегалией, фовеолярная гиперплазия – у 29%, гиперплазия покровно-яточного эпителия – у 53% (рис. 2). Распространенность гиперпластических изменений в слизистой оболочке верхних отделов желудочно-кишечного тракта у этих пациентов объясняется повышенным уровнем СТГ, а также высоким уровнем обсемененности *Helicobacter pylori*, что, в свою очередь, можно объяснить приемом данной группой аналогов соматостатина в качестве патогенетического средства лечения акромегалии. Одним из побочных эффектов аналогов соматостатина является снижение секреции соляной кислоты [4], что может служить предрасполагающим фактором для инфицирования и размножения *Helicobacter pylori*. Международное агентство по изучению рака (IARC) Всемирной организации здравоохранения в 1994 г. включило инфекцию *Helicobacter pylori* в группу риска по возникновению рака желудка и отнесло инфекцию к канцерогенам 1-й группы. Хеликобактерный гастрит является только одним из факторов риска развития рака желудка. Он стимулирует апоптоз клеток желудочного эпителия, приводящий к ответной гиперпролиферации эпителия [5], что сходно с действием ИРФ-1 на активно делящиеся клетки. Можно предположить, что у больных акромегалией посредством этих разнонаправленных, но действующих на одно и то же звено (желудочный эпителий) факторов повышается риск возникновения неопластических образований желудка.

При изучении обсемененности *Helicobacter pylori* у больных акромегалией инфекция была выявлена в 81% случаев, из них 1-я степень обсемененности – у 19%, 2-я – у 27%, 3-я – у 28%, 2-3-я – у 7% (рис. 3).

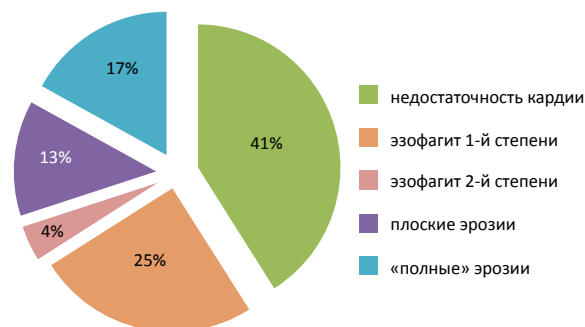


Рис. 1. Характер эндоскопических изменений верхнего отдела пищеварительного тракта

При исследовании толстой кишки долихосигма была выявлена в 27% случаев, полипы толстой кишки – в 38%, сигмоидит – в 12%, дивертикулез – в 19%, колит – в 4% (рис. 4).

Гиперпластический полип толстой кишки был верифицирован у 60% больных акромегалией, тубулярная аденома и гиперпластический полип – у 19%, тубулярная аденома – у 19%, аденокарцинома – у 2% (рис. 5).

Рассмотрим также особенности изменений анатомии и физиологии данной группы больных. Ввиду повышенной выработки СТГ не только меняются размеры конечностей, но и увеличиваются размеры внутренних органов. Что касается желудочно-кишечного тракта – увеличивается в размерах надгортанник, что влечет за собой некоторые технические трудности при проведении эзофагогастродуоденоскопии. Увеличивается длина пищевода. Кардия находится на $42,6 \pm 0,5$ см от резцов (нормальное положение кардии в общей популяции – $40,2 \pm 0,2$ см) и в большинстве случаев не смыкается, что служит предрасполагающим фактором для возникновения эзофагитов различной степени тяжести. Закономерно вытягивается и следующий отдел: желудок с переходом в двенадцатиперстную кишку. Соответственно этому в 45% отмечается неполное смыкание или даже зияние привратника, вследствие чего развивается дуоде-

ногастральный рефлюкс с возникновением эрозий в антральном отделе желудка. Что касается толстой кишки, повышенное образование СТГ сказывается на формировании 27% случаев долихосигмы.

Анализируя жалобы больных с акромегалией, можно сказать, что доминирующими жалобами являются изжога (86%) и запоры (78%), что обусловлено вышеназванными изменениями в анатомии внутренних органов данной категории больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное изучение изменений слизистой оболочки органов пищеварения показало, что при эндоскопических исследованиях патология чаще встречается в верхних отделах пищеварительного тракта. Это может объясняться инфицированностью *Helicobacter pylori* и побочным эффектом аналогов соматостатина у пациентов с акромегалией, что усугубляет жизнедеятельность желудочного эпителия и создает предпосылки для возникновения новообразований у таких больных.

Анализ морфофункциональных изменений слизистой оболочки желудка и толстой кишки при акромегалии выявил, что наиболее часто при данном заболевании встречаются фовеолярная гиперплазия покровно-ямочного эпителия, гиперпластические полипы и тубулярные аденомы, наличие которых является обязательным показанием для

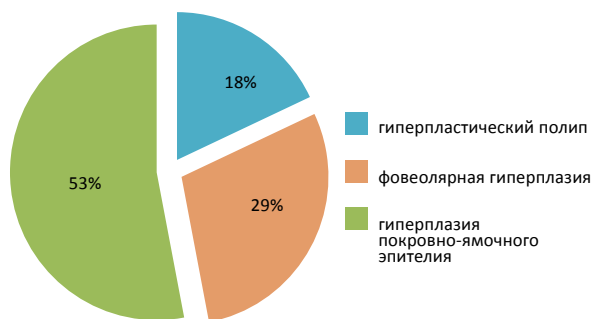


Рис. 2. Морфологические варианты новообразований желудка у пациентов с акромегалией

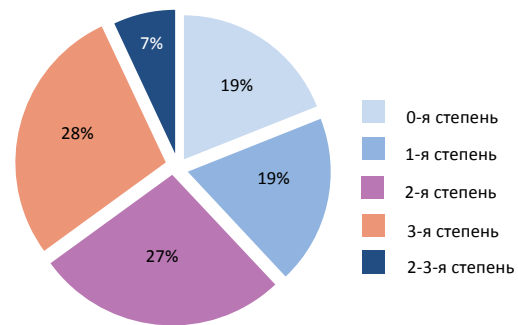


Рис. 3. Данные цитологического исследования слизистой оболочки желудка на наличие и степень обсемененности *Helicobacter pylori*

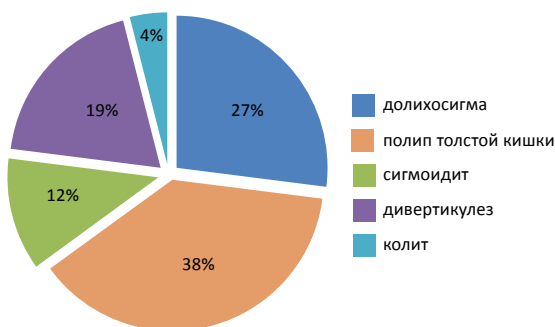


Рис. 4. Характер изменений слизистой толстой кишки при колоноскопии

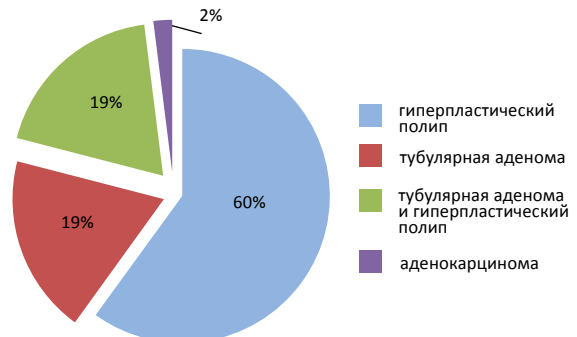


Рис. 5. Морфологические варианты новообразований толстой кишки у пациентов с акромегалией

морфологического исследования слизистой оболочки желудка и толстой кишки у этой группы больных. Наше исследование установило высокую степень обсемененности слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* у пациентов с акромегалией – 81%. Поэтому исследование на обсемененность должно проводиться в обязательном порядке. При выявлении *Helicobacter pylori* в слизистой оболочке желудка необходимо провести лечение с целью ее эрадикации.

Результаты работы показали, что выполнение эндоскопических исследований с обязательной прицельной биопсией и установление обсемененности *Helicobacter pylori* являются обязательными. При выявлении у пациентов гиперпластических полипов или тубулярной аденомы в желудке или толстой кишке, подтвержденных морфологическим исследованием, необходимо в плановом порядке выполнить их удаление, так как патогенез этого заболевания значительно увеличивает риск малигнизации данных образований.

Вышеназванные факторы являются основанием для обязательного ежегодного эндоскопичес-

кого обследования желудочно-кишечного тракта у больных акромегалией.

Литература

1. Молитвослова Н.Н. Акромегалия: особенности клинической картины, осложнений, эффективность различных методов лечения. Международный эндокринологический журнал 2011;(7):33-41. [Molivoslovova N.N. Acromegaly: the features of the clinical picture and complications; the efficiency of different therapeutic methods. Mezhdunarodnyy endokrinologicheskij zhurnal 2011;(7):33-41 (in Russian)].
2. Молитвослова Н.Н. Акромегалия и гигантизм. В кн.: Марова Е.И., ред. Нейроэндокринология. Клинические очерки. Ярославль: Диа-пресс; 1999. [Molivoslovova N.N. Acromegaly and somatomegaly. In: Marova E.I., editor. Neyroendokrinologiya. Klinicheskie ocherki. Yaroslavl: Dia-press; 1999 (in Russian)].
3. Вакс В.В. Медикаментозная терапия акромегалии. Проблемы эндокринологии 2005;51(2):38-45. [Vaks V.V. Medicament therapy of acromegaly. Problemy endokrinologii 2005; 51(2):38-45 (in Russian)].
4. Лекарственные препараты в России: справочник ВИДАЛЬ. М.: АстраФармСервис; 2010. [Medicines in Russia: Reference book VIDAL. Moscow: AstraFarmServis; 2010 (in Russian)].
5. Автандилов Г.Г., Купрюшина Н.В. Гистоплоидометрическая диагностика новообразований желудка по биоптатам. М.: Издание РМАПО; 2008. [Avtandilov G.G., Kupryushina N.V. Histoploidometry diagnostics of gastric neoplasms in biopsy samples. Moscow: Izdanie RMAPO; 2008 (in Russian)].

ТЕСТИРОВАНИЕ ОСЦИЛЛОМЕТРИЧЕСКОГО И АУСКУЛЬТАТИВНОГО РЕЖИМОВ РАБОТЫ МОНИТОРА МЭКГ-ДП-НС-01 ПО ПРОТОКОЛАМ ESH, BHS И AAMI

Федорова С.И., Кулаков Н.В., Кулакова Е.В.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2,
Российская Федерация

Актуальность. Суточное мониторирование артериального давления (СМАД) является одним из основных методов диагностики артериальной гипертензии. Согласно рекомендациям Российского медицинского общества по артериальной гипертензии и Всероссийского научного общества кардиологов, для проведения суточного мониторирования артериального давления могут быть рекомендованы только аппараты, успешно прошедшие клинические испытания по международным протоколам для подтверждения точности измерений.

Цель – провести тестирование суточного монитора МЭКГ-ДП-НС-01, измеряющего артериальное давление на предплечье осциллометрическим и аускультативным методами в составе комплексов Союз и СМАД, производимых ООО «ДМС Передовые Технологии», в соответствии с методиками Международного протокола ESH 2010 (ESH-IP2), протокола BHS 1993 и стандарта AAMI на основной взрослой популяции.

Материал и методы. Испытания проводились на базе МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Для испытаний была набрана группа из 85 человек (50 мужчин и 35 женщин) в возрасте от 19 до 86 лет (средний возраст 47,7±18,0 года). У каждого обследованного были проведены экспертные и приборные измерения артериального давления в соответствии с требованиями вышеперечисленных протоколов.

Основные результаты. Тестируемый суточный монитор МЭКГ-ДП-НС-01 производства ООО «ДМС Передовые Технологии», измеряющий артериальное давление на предплечье осциллометрическим и аускультативным методами, прошел валидацию точности измерения артериального давления по протоколам BHS, ESH-IP2 и AAMI на основной взрослой популяции. По протоколу BHS 1993 точность испытуемого прибора соответствует категории A/A как в осциллометрическом, так и в аускультативном режиме работы. Соответствие точности испытуемого прибора категории A/A сохраняется при раздельном анализе данных для низкого, среднего и высокого артериального давления.

Заключение. Согласно протоколам BHS, ESH-IP2 и AAMI, прибор МЭКГ-ДП-НС-01, измеряющий артериальное давление на предплечье осциллометрическим и аускультативным методами в составе комплексов Союз и СМАД, производимых ООО «ДМС Передовые Технологии», может быть рекомендован для суточного мониторирования артериального давления как в осциллометрическом, так и в аускультативном режиме работы. Согласно подписанной производителем Декларации эквивалентности приборов для измерения артериального давления, результаты испытаний и вышеперечисленные выводы могут быть распространены на суточный монитор артериального давления МДП-НС-02с «Восход» производства ООО «ДМС Передовые Технологии».

Ключевые слова: суточное мониторирование артериального давления, точность измерения артериального давления, Международный протокол ESH 2010, протокол BHS 1993, стандарт AAMI, ООО «ДМС Передовые Технологии».

VALIDATION OF THE MECG-DP-NS-01 MONITOR IN OSCILLOMETRY AND AUSCULTATION MODES, ACCORDING TO ESH, BHS AND AAMI PROTOCOLS

Fedorova S.I., Kulakov N.V., Kulakova E.V.

Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow,
Russian Federation

Background: Ambulatory blood pressure monitoring is one of the main methods for hypertension diagnosis. According to the recommendations of the Russian Medical Society of Hypertension and the All-Russian Society of Cardiology, only devices that passed all of the international protocols requirements can be recommended for ambulatory blood pressure monitoring.

Aim: Validation of the MECG-DP-NS-01 upper arm blood pressure monitor produced by the DMS Advanced Technologies Ltd., in oscillometry and auscultation modes, for ambulatory blood pressure monitoring, in an adult population at rest according to the ESH International Protocol revision 2010 (ESH-IP2), the BHS protocol revision 1993 and the AAMI standard.

Materials and methods: A group of 85 people (50 men and 35 female) aged 19 to 86 years (mean age 47.7±18.0 years) was recruited for the validation study. Expert and device blood pressure measurements were taken for each patient according to the international protocols.

Results: The MEG-DP-NS-01 upper arm blood pressure monitor produced by the DMS Advanced Technologies Ltd. for ambulatory blood pressure monitoring, was validated in oscillometry and auscultation modes in an adult population at rest according to the BHS protocol revision 1993, the ESH-IP2, and the AAMI standard. The device achieved an A/A grading for the BHS protocol revision 1993 both in the oscillometry and auscultation modes. The device maintained its A/A grading throughout the low-pressure, medium-pressure, and high-pressure ranges.

Conclusion: The MEG-DP-NS-01 passed all of the requirements and, fulfilling the standards of the protocols, is recommended for ambulatory blood pressure monitoring according to BHS protocol revision 1993, ESH-IP2, and AAMI standard. According to the Declaration of Blood Pressure Measuring Device Equivalence signed by the manufacturer there are no differences that will affect blood pressure measuring accuracy between the MDP-NS-02s (Voshod) upper arm blood pressure monitor produced by the DMS Advanced Technologies Ltd. and the MEG-DP-NS-01, which passed the ESH-IP2, BHS and AAMI protocols.

Key words: ambulatory blood pressure monitoring, blood pressure measurement accuracy, ESH-IP2, BHS protocol revision 1993, AAMI standard, the DMS Advanced Technologies Ltd.

ВВЕДЕНИЕ

Артериальная гипертензия (АГ) является ведущим фактором риска развития и формирования осложнений при ишемической болезни сердца и cerebro-васкулярных заболеваниях. Основными методами определения величины артериального давления (АД) считаются традиционное разовое определение АД по методу Н.С. Короткова и его суточное мониторирование. К достоинствам суточного мониторирования АД (СМАД) можно отнести более точную оценку антигипертензивного эффекта терапии, т.к. оно позволяет уменьшить эффект «белого халата» и дает информацию о суточном профиле АД.

Согласно Рекомендациям Российского медицинского общества по артериальной гипертензии и Всероссийского научного общества кардиологов [1], для проведения СМАД могут быть рекомендованы только аппараты, успешно прошедшие клинические испытания по международным протоколам для подтверждения точности измерений. В рекомендациях по лечению артериальной гипертензии 2013, разработанных рабочей группой по лечению этого заболевания Европейского общества гипертензии (ESH) и Европейского общества кардиологов, одним из принципов, применяемых к СМАД, является следующий: приборы для измерения АД должны быть откалиброваны и валидированы в соответствии с международными стандартными протоколами [2]. К основным международным протоколам для валидации приборов, измеряющих АД, относятся Международный протокол ESH, принятый в 2010 г. [3], протокол Британского общества

изучения гипертензии (BHS), принятый в 1993 г. [4], и стандарт Ассоциации содействия развитию медицинской техники (AAMI) [5].

Протоколы предъявляют строгие требования к составу группы пациентов, на которых происходит валидация прибора: оговариваются объем выборки, соотношение числа мужчин и женщин, возраст, число обследованных с низким, средним и высоким АД. При проведении первого тестирования прибора на взрослой популяции в группу не включаются пациенты, относящиеся к перечисленным в протоколе BHS специальным группам (беременные, дети, пациенты с выраженной аритмией и т.д.). Тестирование прибора на специальных группах может проводиться после того, как прибор пройдет испытания на основной взрослой популяции с классом точности не хуже В/В по протоколу BHS.

Нами проведено тестирование на взрослой популяции по вышеперечисленным протоколам прибора МЭКГ-ДП-НС-01, измеряющего АД на предплечье осциллометрическим и аускультативным методами в составе комплекса суточного мониторирования электрокардиограммы (ЭКГ) и АД «Союз» и комплекса СМАД, производимых ООО «ДМС Передовые Технологии» (г. Москва).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Испытания проводились на базе МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Для испытаний по протоколам BHS и AAMI была набрана группа из 85 человек (50 мужчин и 35 женщин) в возрасте от 19

Федорова Светлана Ивановна – канд. мед. наук, руководитель отделения функциональной диагностики МОНИКИ. **Кулаков Николай Викторович** – врач отделения функциональной диагностики МОНИКИ. **Кулакова Елена Валерьевна** – медсестра отделения функциональной диагностики МОНИКИ.

Для корреспонденции: Федорова Светлана Ивановна – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 681 55 71. E-mail: fsi120@yandex.ru

Fedorova Svetlana Ivanovna – PhD, Head of the Department of Functional Diagnostics, MONIKI. **Kulakov Nikolay Viktorovich** – MD, physician of the Department of Functional Diagnostics, MONIKI. **Kulakova Elena Valer'evna** – a nurse of the Department of Functional Diagnostics, MONIKI.

Correspondence to: Fedorova Svetlana Ivanovna – 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 55 71. E-mail: fsi120@yandex.ru

до 86 лет (средний возраст $47,7 \pm 18,0$ года). Распределение больных по уровню АД представлено в табл. 1.

Таблица 1

Распределение обследованных по уровням АД

АД, мм рт. ст.		Число обследованных
САД	<90	8 (9,4%)
	90-129	27 (31,8%)
	130-160	21 (24,7%)
	161-180	20 (23,5%)
	>180	9 (10,6%)
ДАД	<60	9 (10,6%)
	60-79	25 (29,4%)
	80-100	22 (25,9%)
	101-110	20 (23,5%)
	>110	9 (10,6%)

Таким образом, были выполнены все требования, предъявляемые протоколами BHS 1993 и AAMI к группе, на которой должна проводиться валидация приборов для измерения АД при тестировании на основной популяции. Из этой группы была выбрана подгруппа из 33 пациентов (23 мужчины и 10 женщин) в возрасте от 27 до 82 лет (средний возраст $46,7 \pm 16,8$ года), удовлетворяющая требованиям Международного протокола ESH 2010.

Испытания проводились двумя экспертами, которые изучили Международный протокол ESH 2010, протокол BHS 1993 и стандарт AAMI. Оба эксперта были обучены по методике, рекомендованной BHS [6].

Время релаксации перед началом измерений составляло 10-15 минут. Затем в положении сидя с интервалом 30-60 секунд девять раз измерялось АД на одной руке. Измерения с порядковыми номе-

рами 1, 3, 5, 7, 9 проводились экспертами при помощи ртутных тонометров, а измерения с номерами 2, 4, 6, 8 – прибором. Первые два измерения использовались для определения диапазона АД, к которому относится данный пациент, и в анализ точности не включались.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка точности измерения АД по протоколу ESH-IP2

Для анализа использовались 99 измерений (33 пациента по 3 измерения). В 1-й части протокола требуется, чтобы выполнялись хотя бы два из следующих трех условий: в 73 измерениях из 99 различие между измерением прибора и средним экспертным значением должно быть ≤ 5 мм рт. ст., в 87 из 99 – ≤ 10 мм рт. ст., в 96 из 99 – ≤ 15 мм рт. ст. При этом необходимо одновременно выполнять все три следующих условия: в 65 измерениях из 99 различие между измерением прибора и средним экспертным значением ≤ 5 мм рт. ст., в 81 из 99 – ≤ 10 мм рт. ст., в 93 из 99 – ≤ 15 мм рт. ст.

Во 2-й части протокола требуется, чтобы как минимум у 24 обследованных из 33 различие между измерением прибора и средним экспертным значением было ≤ 5 мм рт. ст. хотя бы в двух измерениях из трех и чтобы число обследованных, у которых во всех трех измерениях различие между данными прибора и средним экспертным значением оказалось выше 5 мм рт. ст., не превышало трех.

Результаты валидации, представленные на рис. 1 и в табл. 2, 3 в форме, рекомендованной протоколом ESH-IP2, позволяют заключить, что тестируе-

Таблица 2

Анализ точности по ESH-IP2 (осциллометрический метод)

1-я часть	Количество измерений			Оценка 1	Различия, мм рт. ст.	
	≤ 5 мм рт. ст.	≤ 10 мм рт. ст.	≤ 15 мм рт. ст.		Среднее	СКО
САД	87	96	98	Прошел	-0,9	4,1
ДАД	92	99	99	Прошел	0,0	3,1
2-я часть	2 из 3 измерений ≤ 5 мм рт. ст.		0 из 3 измерений ≤ 5 мм рт. ст.		Оценка 2	Оценка 3
САД	31 обследованный		0 обследованных		Прошел	Прошел
ДАД	31 обследованный		0 обследованных		Прошел	Прошел

Примечание: форма представления результатов валидации соответствует рекомендованной Международным протоколом.

Таблица 3

Анализ точности по ESH-IP2 (аускультативный метод)

1-я часть	Количество измерений			Оценка 1	Различия, мм рт. ст.	
	≤ 5 мм рт. ст.	≤ 10 мм рт. ст.	≤ 15 мм рт. ст.		Среднее	СКО
САД	93	98	99	Прошел	-0,4	3,2
ДАД	84	98	99	Прошел	-0,7	4,2
2-я часть	2 из 3 измерений ≤ 5 мм рт. ст.		0 из 3 измерений ≤ 5 мм рт. ст.		Оценка 2	Оценка 3
САД	33 обследованных		0 обследованных		Прошел	Прошел
ДАД	30 обследованных		0 обследованных		Прошел	Прошел

мый прибор – как в осциллометрическом, так и в аускультативном режиме работы – полностью прошел тестирование на взрослой популяции по Международному протоколу ESH 2010.

Оценка точности измерения АД по протоколам BHS 1993 и AAMI

Для анализа используются 255 измерений (85 пациентов по 3 измерения). Прибор удовлетворяет критериям стандарта AAMI, если среднее значение отличий измерений прибора от экспертных значений ≤ 5 мм рт. ст., а среднеквадратичное отклонение (СКО) – ≤ 8 мм рт. ст. По протоколу BHS тестируемому прибору присваивается класс точности: А, В, С или D. Класс определяется процентами отличий измерений прибора от измерений экспертов, лежащих в пределах 5, 10 и 15 мм рт. ст. (табл. 4). При этом как минимум в 80% измерений различия между экспертными значениями должны быть ≤ 5 мм рт. ст. и как минимум в 95% измерений экспертные значения должны различаться не более чем на 10 мм рт. ст.

Таблица 4

Критерии точности BHS.
Классы и процент различий приборного и экспертного АД по протоколу BHS 1993

Класс	Модуль разности между экспертом и тестируемым прибором, %		
	≤ 5 мм рт. ст.	≤ 10 мм рт. ст.	≤ 15 мм рт. ст.
A	60	85	95
B	50	75	90
C	40	60	85
D	Хуже, чем C		

Согласно протоколу BHS 1993, анализ точности измерения АД проводится отдельно для каждого эксперта, затем для систолического АД (САД) и диастолического АД (ДАД); по отдельности выбирается «лучший» эксперт, сравнение с которым дало более высокие оценки. По значениям «лучшего» эксперта строятся необходимые по протоколу графики различий между измерениями прибора и эксперта и среднего давления (рис. 2), а также получаются конечные оценки (табл. 5, 6).

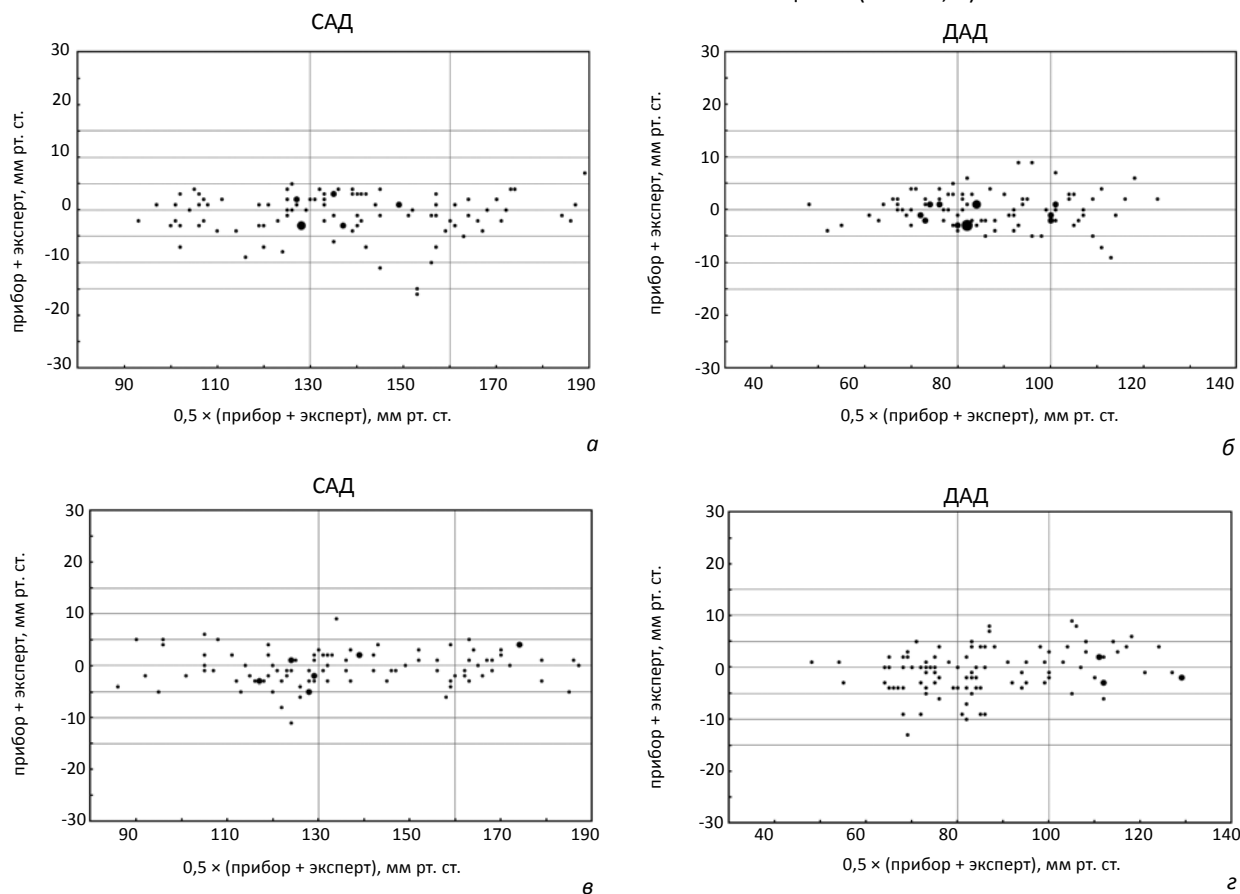


Рис. 1. График различий между измерениями прибором: а, б – осциллометрическим методом, в, г – аускультативным методом и средними экспертными значениями в группе из 33 человек ($n=99$). Совпавшие точки обозначены более крупными символами.

Реперные линии: различия в 0, ± 5 , ± 10 и ± 15 мм рт. ст. и границы диапазонов АД

Таблица 5

**Анализ точности (осциллометрический метод) по протоколу BHS.
Диапазон АД: САД 45-214 мм рт. ст., ДАД 23-131 мм рт. ст., n=255 измерений**

	Класс	Различия, %			АД, мм рт. ст.	Различия, мм рт. ст.	ААМІ критерии
		≤5 мм рт. ст.	≤10 мм рт. ст.	≤15 мм рт. ст.			
Эксперт 1							
САД	А	90,2	98,0	99,6	135,5±31,2	-0,3±4,3	Прошел
ДАД	А	89,8	98,8	100,0	84,7±19,2	1,2±3,3	Прошел
Эксперт 2							
САД	А	90,2	97,6	98,8	135,4±31,2	-0,1±4,3	Прошел
ДАД	А	92,2	99,2	100,0	85,0±19,1	0,6±3,5	Прошел
Итоговые оценки							
САД	А	90,2	98,0	99,6	135,5±31,2	-0,3±4,3	Прошел
ДАД	А	92,2	99,2	100,0	85,0±19,1	0,6±3,5	Прошел
Различия между экспертами							
САД	А	97,6	99,7	100,0		0,2±2,8	
ДАД	А	96,5	100,0	100,0		-0,7±2,8	

Примечание: форма представления результатов валидации соответствует рекомендованной протоколом BHS 1993 [2].

Таблица 6

**Анализ точности измерения АД аускультативным методом по протоколу BHS.
Диапазон АД: САД 49-231 мм рт. ст., ДАД 22-128 мм рт. ст., n=255 измерений**

	Класс	Различия, %			АД, мм рт. ст.	Различия, мм рт. ст.	ААМІ критерии
		≤5 мм рт. ст.	≤10 мм рт. ст.	≤15 мм рт. ст.			
Эксперт 1							
САД	A	92,5	99,6	100,0	135,2±34,4	-0,4±3,2	Прошел
ДАД	A	87,1	98,0	100,0	80,9±19,3	-0,9±3,9	Прошел
Эксперт 2							
САД	A	94,5	99,6	100,0	135,1±34,4	-0,3±3,1	Прошел
ДАД	A	85,1	98,0	99,6	81,3±19,2	-1,7±4,1	Прошел
Итоговые оценки							
САД	A	94,5	99,6	100,0	135,1±34,4	-0,3±3,1	Прошел
ДАД	A	85,1	98,0	99,6	81,3±19,2	-1,7±4,1	Прошел
Различия между экспертами							
САД	A	97,6	99,7	100,0		0,2±2,8	
ДАД	A	96,5	100,0	100,0		-0,7±2,8	

Представленные результаты валидации (см. табл. 5, 6 и рис. 2) позволяют заключить, что точность тестируемого прибора соответствует категории А/А как в осциллометрическом, так и в аускультативном режиме работы. Кроме того, результаты, представленные в табл. 5 и 6, свидетельствуют о том, что различия между экспертными измерениями удовлетворяют требованиям протокола BHS 1993. Вероятно, высокая степень согласованности экспертных измерений была обусловлена предварительным двухнедельным обучением экспертов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше результаты испытаний, проведенных на базе отделения функциональной диагностики МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, позволяют заключить, что прибор МЭКГ-ДП-НС-01,

измеряющий АД на предплечье осциллометрическим и аускультативным методами в составе комплекса суточного мониторинга ЭКГ и АД «Союз» и комплекса СМАД, производимых ООО «ДМС Передовые Технологии», полностью прошел тестирование на взрослой популяции по Международному протоколу ESH 2010, протоколу BHS 1993 и стандарту ААМІ и может быть рекомендован для использования в медицинских учреждениях. По протоколу BHS 1993 точность испытуемого прибора соответствует категории А/А как в осциллометрическом, так и в аускультативном режиме работы. Таким образом, этот прибор может проходить дальнейшую валидацию на специальных группах (беременные, пожилые люди, дети, пациенты с аритмиями, спортсмены, гипотоники) и в специальных обстоятельствах (после физической

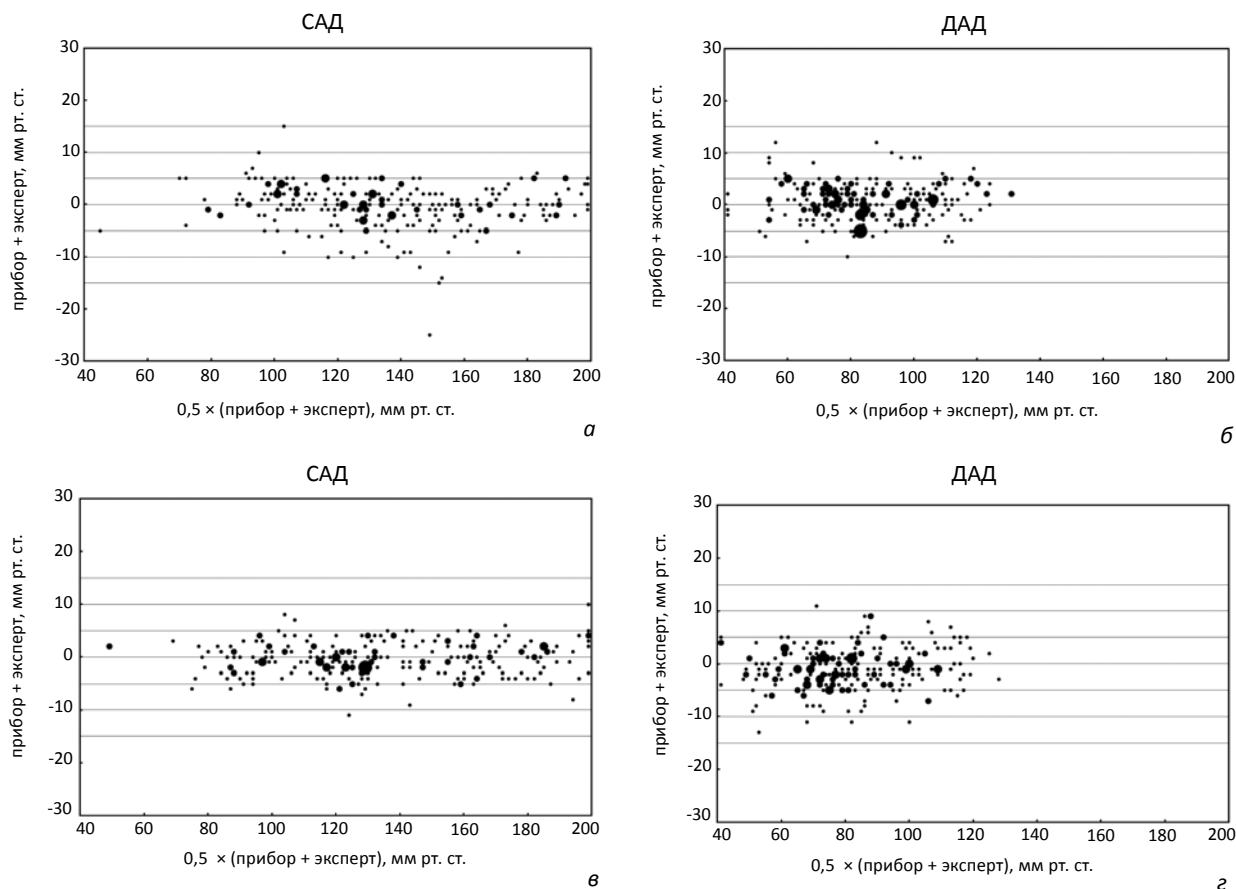


Рис. 2. График различий между измерениями прибором и «лучшего» эксперта в группе из 85 человек ($n=255$): а – САД, осциллометрический метод; б – ДАД, осциллометрический метод; в – САД, аускультативный метод; г – ДАД, аускультативный метод. Совпавшие точки обозначены более крупными символами. Реперные линии: различия – ± 5 , ± 10 и ± 15 мм рт. ст.

нагрузки, а также в положениях стоя и лежа) по правилам Международного протокола ESH 2010, протокола BHS 1993 и стандарта AAMI.

Согласно подписанной производителем Декларации эквивалентности приборов для измерения АД МДП-НС-02с «Восход» и МЭКГ-ДП-НС-01 и критериям эквивалентности приборов для измерения АД [7], результаты испытаний и вышеперечисленные выводы могут быть распространены на суточный монитор АД МДП-НС-02с «Восход» производства ООО «ДМС Передовые Технологии».

Литература

1. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Рекомендации Российского медицинского общества по артериальной гипертонии и Всероссийского научного общества кардиологов. Системные гипертензии 2010;(3):5-26. [Arterial hypertension diagnosis and therapy. Recommendations of the Russian Medical Society of Hypertension and the All-Russian Society of Cardiology. Sistemnyye gipertenzii 2010;(3):5-26 (in Russian)].
2. Mancia G., Fagard R., Narkiewicz K., Redón J., Zanchetti A., Böhm M., Christiaens T., Cifkova R., De Backer G., Dominiczak A., Galderisi M., Grobbee D.E., Jaarsma T., Kirchhof P., Kjeldsen S.E., Laurent S., Manolis A.J., Nilsson P.M., Ruilope L.M., Schmieder R.E., Sirnes P.A., Sleight P., Viigimaa M., Waeber B., Zannad F. Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). J Hypertension 2013;31(7):1281-357.
3. O'Brien E., Atkins N., Stergiou G., Karpettas N., Parati G., Asmar R., Imai Y., Wang J., Mengden T., Shennan A.; On behalf of the Working Group on Blood Pressure Monitoring of the European Society of Hypertension. European Society of Hypertension International Protocol revision 2010 for the validation of blood pressure measuring devices in adults. Blood Press Monit 2010;15(1):23-38.
4. O'Brien E., Petrie J., Littler W., de Swiet M., Padfield P.L., Altman D.G., Bland M., Coats A., Atkins N. An outline of the revised British Hypertension Society protocol for the evaluation of blood pressure measuring devices. J Hypertens 1993; 11(6):677-9.
5. Association for the Advancement of Medical Instrumentation. American National Standard. Manual, electronic or automated sphygmomanometers ANSI/AAMI SP10-2002/A1. USA: AAMI; 2003.
6. O'Brien E., Mee F., Tan K.S., Atkins N., O'Malley K. Training and assessment of observers for blood pressure measurement in hypertension research. J Hum Hypertens 1991;5(1):7-10.
7. Atkins N., O'Brien E. The dabl Educational Trust device equivalence procedure. Blood Press Monit 2007;12(4):245-9.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ФОТОХИМИОТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Фомина О.А., Молочков А.В., Кильдюшевский А.В.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Актуальность. Склеродермия – аутоиммунное заболевание с прогрессирующим поражением соединительной ткани с преобладанием фиброзно-склеротических и сосудистых нарушений. До сих пор отсутствует единая концепция патогенеза заболевания, что существенно затрудняет разработку патогенетических методов лечения. Традиционные методы лечения ограниченной склеродермии приводят к недостаточной клинической эффективности, непродолжительной ремиссии, вызывают ряд побочных эффектов и осложнений.

Цель – повышение эффективности лечения ограниченной склеродермии путем введения в комплексную терапию метода экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ).

Материал и методы. 19 пациентам с бляшечной и линейной формами ограниченной склеродермии проводили комплексное лечение с применением ЭФХТ. У всех заболевание характеризовалось неуклонно прогрессирующим течением и генерализованным поражением, у трех пациентов выявлены признаки ранней системной склеродермии. Метод ЭФХТ основан на фотосенсибилизирующем действии 8-метоксипсоралена и ультрафиолетового облучения А на мононуклеарные клетки, которые выделяют с помощью цитафереза и в дальнейшем реинфузируют. Каждый курс состоял из четырех сеансов, проводимых через день. Повторный курс терапии назначали через три месяца. Всего было проведено три курса лечения.

Основные результаты. Процедуру ЭФХТ все больные перенесли удовлетворительно, осложнений и побочных эффектов отмечено не было. После трех курсов лечения у всех констатировано отсутствие прогрессирования процесса, снижение плотности очагов приблизительно на 50% по сравнению с исходным уровнем, полное исчезновение венчика периферического роста, уменьшение размеров очагов. Наиболее выраженный клинический эффект был достигнут у пациентов, длительность заболевания которых составляла не более трех лет.

Заключение. Метод ЭФХТ в составе комплексного лечения является эффективным при лечении ограниченной склеродермии в качестве адъювантной терапии.

Ключевые слова: ограниченная склеродермия, экстракорпоральная фотохимиотерапия, фотоферез.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF EXTRACORPOREAL PHOTOCHEMOTHERAPY IN COMPLEX TREATMENT OF LOCALIZED SCLERODERMA

Fomina O.A., Molochkov A.V., Kil'dyushevsky A.V.

Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

Background: Scleroderma is an autoimmune disease with progressing lesions of connective tissue where fibrosclerotic and vascular disturbances prevail. Lacking of the united concept of its pathogenesis significantly hampers elaboration of pathogenetic methods of treatment. Conventional methods of treatment of localized scleroderma have insufficient clinical effectiveness, lead to remission of short duration, have a series of side effects and complications.

Aim: To raise the efficiency of the focal scleroderma treatment with a complex therapy including a method of extracorporeal photochemotherapy (EPCT).

Materials and methods: A total of 19 patients with plaque or linear types of localized scleroderma underwent complex treatment including EPCT. All patients had a steadfast progressing course of the disease with generalized lesions, the signs of early systemic scleroderma being revealed in 3 of them. EPCT-method is based on the photo-sensitizing effect of 8-methoxypsoralene and ultraviolet A radiation of mononuclear cells which were separated using cytopheresis further followed with reinfusion. Every course included 4 exposures implemented every other day. Repeated therapeutic course was set in 3 months.

Results: All patients satisfactorily tolerated EPCT procedure without side effects and complications. After 3 therapeutic courses, the disease progression was arrested in all patients, the density of scleroderma foci was diminished, approximately, by 50% as compared to the initial level. The crown of the peripheral growth completely disappeared, and the sizes of the disease foci decreased. The more pronounced clinical effect was achieved in patients with disease duration not exceeding 3 years.

Conclusion: The proposed method was efficient in treatment of localized scleroderma and might be applied as an adjuvant therapy.

Key words: localized scleroderma, extracorporeal photochemotherapy, photopheresis.

Склеродермия – мультифакториальное ауто-иммунное заболевание, в основе которого лежит прогрессирующее поражение соединительной ткани с преобладанием фиброзно-склеротических и сосудистых нарушений по типу облитерирующей микроангиопатии [1, 2]. Согласно МКБ-10 (ВОЗ), различают две основные формы склеродермии: ограниченную и системную (с вовлечением внутренних органов). При ограниченной склеродермии наблюдается очаговое и диссеминированное поражение кожи и подкожной клетчатки различной степени выраженности [3]. Заболевание характеризуется длительным, хроническим, прогрессирующим течением с последовательным чередованием стадий воспаления, фиброза и атрофии. Ограниченную и системную склеродермию рассматривают с точки зрения единого аутоиммунного патологического процесса. Это подтверждается однонаправленностью метаболических, патогистологических и иммуногистохимических изменений кожи, а также известными случаями трансформации локализованного процесса в системный [1, 4].

Основу патогенеза заболевания составляют три тесно взаимосвязанных процесса: поражение мелких артериол и капилляров, нарушения иммунитета, избыточная продукция коллагена фибробластами [5, 6, 7]. Клеточный инфильтрат на ранних стадиях заболевания состоит главным образом из Т- и В-клеток, макрофагов. Т-клетки представлены преимущественно лимфоцитами CD4+ 2-го типа (Th2), что подтверждается повышенным уровнем соответствующих цитокинов, играющих важную роль в развитии склеродермии [8, 9, 10, 11].

Несмотря на успехи, достигнутые в последние годы при изучении иммунобиологических основ развития заболевания, до сих пор отсутствует единая концепция патогенеза склеродермии, что существенно затрудняет разработку патогенетических методов лечения. В связи с этим традиционные методы лечения ограниченной склеродермии приводят к недостаточной клинической эффективности, непродолжительной ремиссии, вызывают ряд побочных эффектов и осложнений, что пред-

определяет необходимость поиска новых методов лечения этого заболевания [12].

В настоящее время наиболее перспективным методом лечения аутоиммунных заболеваний является метод экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ) [13]. Этот метод основан на фотосенсибилизующем действии 8-метоксипсоралена и ультрафиолетового облучения спектра А на моноклеарные клетки, которые выделяют с помощью цитафереза и в дальнейшем реинфузируют [14].

На настоящий момент ЭФХТ является методом выбора для лечения пациентов с эритродермической формой грибвидного микоза и синдромом Сезари [15]. Появилось множество данных об успешном применении фотофереза в лечении атопического дерматита [16], вульгарной пузырчатки [17], саркомы Капоши [18], псориаза и псориатического артрита [19]. О применении данной методики в лечении склеродермии имеются лишь единичные публикации [20]. Целью настоящего исследования является повышение эффективности лечения ограниченной склеродермии путем введения в комплексную терапию метода ЭФХТ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением находились 19 пациентов (2 мужчин и 17 женщин) с различными формами ограниченной склеродермии, которым проводили ЭФХТ. Возраст больных варьировал от 18 до 68 лет (средний возраст – 42,3±16,7 года). Продолжительность заболевания от двух до шести лет (в среднем – 3,5±1,75 года). У всех больных диагноз был верифицирован гистологическим исследованием.

Все пациенты прошли комплексное обследование в соответствии с Международными критериями выявления признаков ранней системной склеродермии VEDOSS (Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis). Согласно VEDOSS, ранняя системная склеродермия – это состояние, которое проявляется развитием в дебюте феномена Рейно и/или отечности кистей с элементами склеродактилии, характерных микроваскулярных и аутоиммунных нарушений. В соответствии с критериями данной

Фомина Ольга Александровна – аспирант МОНКИ. **Молочков Антон Владимирович** – д-р мед. наук, профессор, зам. директора МОНКИ по науке, учебной работе и международным связям. **Кильдюшевский Александр Вадимович** – д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения хирургической гемокоррекции и детоксикации МОНКИ.

Для корреспонденции: Фомина Ольга Александровна – 140100, Московская обл., г. Раменское, ул. Гурьева, 24-52, Российская Федерация. Тел.: +7 (916) 120 57 93. E-mail: dr.fominaoa@gmail.com

Fomina Ol'ga Aleksandrovna – postgraduate student, MONIKI. **Molochkov Anton Vladimirovich** – MD, PhD, Professor, Deputy Director on science, educational work and international communications, MONIKI. **Kil'dyushevsky Aleksandr Vadimovich** – MD, PhD, Professor, leading scientific worker, Department of Surgical Hemocorrection and Detoxification, MONIKI.

Correspondence to: Fomina Ol'ga Aleksandrovna – 52/24 Gur'eva ul., 140100 Ramenskoe, Moscow Region, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 120 57 93. E-mail: dr.fominaoa@gmail.com

программы проводились широкопольная капилляроскопия и исследования на выявление положительных антител: к Scl-70, антинуклеарного фактора (АНФ), антицентромерных [21].

При обследовании у двух пациентов были выявлены положительные антитела к Scl-70 и АНФ, у одной больной определялся феномен Рейно. У 17 пациентов диагностирована бляшечная форма склеродермии, у двух – линейная. У трех выявлены признаки системности заболевания, девять жаловались на зуд и чувство стягивания кожи. У всех заболевание характеризовалось неуклонно прогрессирующим течением с частыми обострениями. Наиболее выраженное уплотнение очагов с большей площадью поражения кожных покровов наблюдалось у пациентов с признаками ранней системной склеродермии.

Ранее 13 пациентов неоднократно получали курс лечения (с повтором 2-4 раза в год): Бензилпенициллина натриевую соль 500 000 ЕД 4 раза в сутки внутримышечно (10 дней), Лидазу 64 ЕД ежедневно внутримышечно (10 дней) или Лонгидазу 3000 ЕД 1 раз в три дня, Натрия аденозинтрифосфат 2,0 мл внутримышечно, Ксантинола никотинат внутрь по 0,15 г 3 раза в сутки, Аевит внутрь по 0,2 г 3 раза в сутки, наружное лечение гелем Троксевазин, 20% раствором Димексида. Два пациента получали Деллагил, Преднизолон.

На фоне проведенной терапии у пациентов выявлялось незначительное размягчение очагов, максимальная продолжительность ремиссии составляла не более трех месяцев, появлялись новые высыпания. У двух пациенток отмечалась аллергическая реакция на препараты пенициллинового ряда. У четырех больных ограниченная склеродермия была диагностирована впервые.

В связи с недостаточной клинической эффективностью предшествующего лечения, непродолжительностью ремиссии, тяжестью течения заболевания (пациенты с генерализованной формой ограниченной склеродермии, с признаками ранней системной склеродермии) было проведено комплексное лечение с применением ЭФХТ.

Методика экстракорпоральной фотохимиотерапии

Выделение мононуклеарных клеток проводили с помощью клеточного сепаратора Naemonetics MCS+ по протоколу RBCP (выделение стволовых клеток). За одну процедуру выделяли от 40 до 70 мл концентрата мононуклеарных клеток, которые ресуспендировали в 0,9% растворе хлористого натрия, доводя общий объем до 200 мл. Клеточную суспензию подвергали ультрафиолетовому воздействию на аппарате ультрафиолетового облучения «Юлия» при длине волны 320-380 нм. Общая доза экспози-

ции составляла 0,8-1,2 Дж/см². В качестве фотосенсибилизатора использовали отечественный препарат Аммифурин в дозе 0,6 мг/кг, который пациент принимал за два часа до процедуры. После облучения клетки реинфузировали в течение 30 минут.

Каждый курс состоял из четырех сеансов, проводимых через день. Повторный курс терапии назначали через три месяца. Всего было выполнено три курса лечения, после чего проводили окончательную оценку клинической эффективности. При достижении эффекта оценивали его продолжительность.

Статистические методы обработки результатов исследований

Статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном компьютере с использованием пакета анализа MS Excel 2013 и программы Statistica v.6.0. Достоверность различий средних значений по группам и в динамике определяли при помощи дисперсионного анализа критерия Стьюдента.

Клиническая оценка эффективности лечения

При оценке клинической эффективности ЭФХТ учитывали динамику объективных клинических проявлений (выраженность отека и венчика гиперемии, плотность очагов, площадь поражения), изменения субъективных ощущений (зуд, чувство стягивания кожи), изменения титров АНФ и антител к Scl-70 у пациентов с признаками ранней системной склеродермии.

Для оценки динамики клинических проявлений была использована модифицированная методика балльной оценки mRODNAN Skin Score. В соответствии с ней поверхность кожи была разделена на 20 областей. Количество баллов (как отражение степени склероза и фиброза, оцениваемое путем захвата очага поражения в складку большим и указательным пальцами) в каждой из них устанавливалось следующим образом: «0 баллов» – отсутствие уплотнения, «1 балл» – легкое, «2 балла» – умеренное, «3 балла» – выраженное уплотнение. Балльная оценка поражения кожи больного склеродермией складывалась из суммы баллов по каждой из областей [22].

Для контроля эффективности лечения также оценивали динамику интенсивности отека и гиперемии по периферии очага поражения в баллах от 0 до 3, при этом «0 баллов» означало отсутствие признака, «1 балл» – легкая, «2 балла» – умеренная, «3 балла» – значительная выраженность. Наличие отека и венчика гиперемии свидетельствовало об активности воспалительного процесса и прогрессировании заболевания.

При оценке эффективности лечения у каждого больного рассчитывали индексы относительного уменьшения клинических признаков в процентах: выраженности венчика гиперемии и отека, снижения плотности и площади поражения (индекс mRODNAN Skin Score). Далее по разработанной нами формуле выводили суммарный индекс уменьшения поражения кожи:

$$Ик = (Ив + Ир) / 2,$$

где Ик – индекс относительного уменьшения поражения кожи;

Ив – индекс интенсивности венчика гиперемии;

Ир – индекс mRODNAN Skin Score.

При снижении Ик более чем на 70% констатировали значительное улучшение, от 50 до 70% – улучшение, менее 50% – отсутствие улучшения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Процедуру ЭФХТ все больные перенесли удовлетворительно, осложнений и побочных эффектов отмечено не было. Положительный терапевтический эффект различной степени выраженности был отмечен у всех больных уже после первого курса лечения. Так, если до лечения индекс mRODNAN Skin Score составлял $15,89 \pm 4,18$ балла, то после лечения плотность очагов снизилась до $11,63 \pm 3,2$ ($p < 0,05$) (рис. 1). У 36,85% пациентов отмечалось полное исчезновение отека и венчика периферического роста, значительное уменьшение плотности очагов, у 63,15% – побледнение венчика периферического роста и уменьшение отека, снижение плотности очагов. У одного больного с признаками системности заболевания сохранялась плотность в очагах, однако прекратилось прогрессирование кожного процесса. Все пациенты отметили исчезновение зуда и чувства стягивания кожи.

После трех курсов лечения у всех больных констатировано отсутствие прогрессирования процесса, снижение индекса mRODNAN Skin Score с $15,89 \pm 4,18$ до $8,32 \pm 3,18$ балла ($p < 0,05$) (см. рис. 1), что составляет приблизительно 50% по сравнению с исходным уровнем, полное исчезновение венчика периферического роста, уменьшение размеров очагов. У пациентов с признаками ранней системной склеродермии отмечалась тенденция к снижению титров АНФ и антител к Scl-70.

У 13 пациентов после трех курсов комплексного лечения с применением ЭФХТ наблюдали значительное улучшение, выражавшееся в уменьшении Ик более чем на 70%, у пяти – улучшение (снижение Ик от 50 до 70%), и у одного больного не удалось добиться достаточно значимого клинического улучшения (снижение Ик было менее 50%).

Наиболее выраженный клинический эффект был достигнут у пациентов с длительностью заболевания не более трех лет. У пациентов с длительным течением склеродермии (от четырех до шести лет) эффект был выражен в несколько меньшей степени. При этом нами было отмечено, что у больных с заболеванием до трех лет эффективность лечения не зависела от степени тяжести и распространенности патологического процесса, а при заболевании более трех лет даже с минимальными клиническими проявлениями эффективность терапии снижалась.

При оценке отдаленных результатов после применения ЭФХТ продолжительность ремиссии у больных с длительностью течения заболевания менее трех лет составила $12,08 \pm 0,9$ месяца, более трех лет – $9 \pm 0,82$.

Клинический пример

Больной Б., 35 лет, поступил с жалобами на множественные очаги на коже туловища, верхних и нижних конечностей. Считает себя больным с марта 2009 г., когда впервые заметил появление розового пятна с уплотнением до 8 см в диаметре на коже живота. Обратился к дерматологу по месту жительства, был поставлен диагноз: бляшечная склеродермия. Пациент был направлен в Московский областной клинический кожно-венерологический диспансер и затем госпитализирован в отделение дерматовенерологии и дерматоонкологии МОНИКИ. Пациент неоднократно получал лечение стандартной терапией (Пенициллин, Лонгидаза, Аденозинтрифосфат, Трентал,

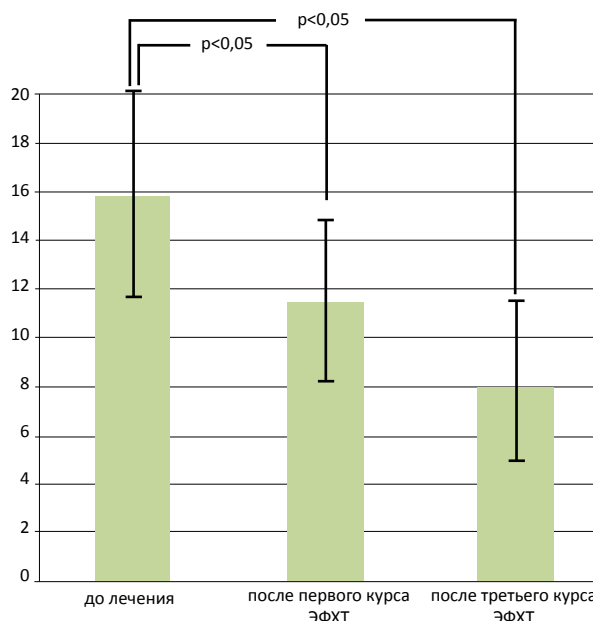


Рис. 1. Клиническая оценка эффективности ЭФХТ на основании балльной оценки mRODNAN Skin Score, $M \pm m$

Ксантинола никотинат, наружное лечение гелем Троксевазин, 20% раствором Димексида) в отделении МОНИКИ и по месту жительства. На фоне лечения отмечалось улучшение в виде разрешения венчиков гиперемии, однако максимальная длительность ремиссии составляла не более одного месяца. В декабре 2009 г. отметил появление новых очагов на коже нижних конечностей и венчиков гиперемии вокруг старых очагов.



а



б

Рис. 2. Больной Б.: а – до лечения: бляшка цвета слоновой кости с гладкой блестящей поверхностью плотной консистенции с участками атрофии и выраженным венчиком гиперемии; б – после лечения: венчик гиперемии разрешился, плотность в очаге значительно уменьшилась

При обследовании на системность заболевания по программе VEDOSS при проведении широкопольной капилляроскопии был выявлен феномен Рейно. Гистологическая картина соответствует диагнозу склеродермии (рис. 3, 4). Сопутствующие заболевания: хронический тонзиллит, вегетососудистая дистония.

В связи с недостаточной эффективностью проводимой терапии (непродолжительные ремиссии, частые обострения заболевания) больному была назначена ЭФХТ. В процессе лечения отмечалась выраженная положительная динамика со стороны кожного процесса. После одного курса венчики гиперемии разрешились, высыпания побледнели, плотность очагов несколько уменьшилась, зуд и чувство стянутости кожи не беспокоили, индекс mRODNAN был равен 16 баллам. После трех курсов лечения ремиссия составила 12 месяцев, индекс mRODNAN – 10 баллов (см. рис. 2). Побочных реакций и осложнений в процессе лечения не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о высокой клинической эффективности ЭФХТ у больных ограниченной склеродермией, резистентных к ранее проводимой лекарственной терапии. Наибольший клинический эффект был достигнут у больных на ранних стадиях заболевания независимо от тяжести патологического процесса. Полученные нами результаты согласуются с данными, представленными К. Krasagakis и соавт., соглас-

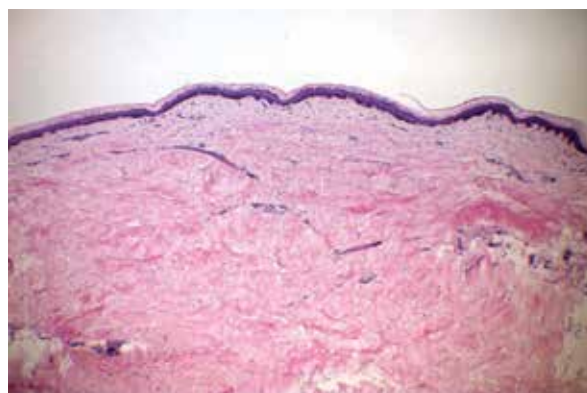


Рис. 3. Склероз ретикулярной дермы. Окраска коллагеновых волокон гематоксилином и эозином, $\times 40$

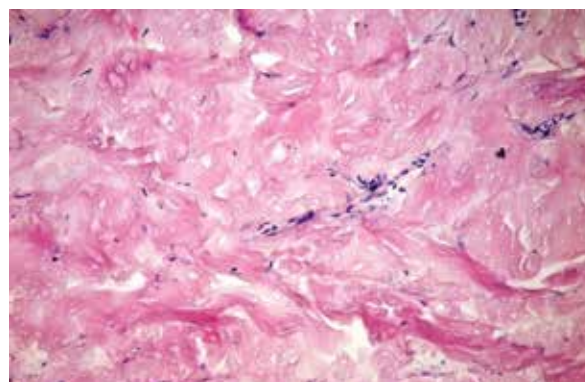


Рис. 4. Утолщение и гомогенизация волокон. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

но которым, улучшение кожного процесса после лечения наблюдалось у 8 из 16 больных системной склеродермией, отсутствие изменений – у трех, у пяти пациентов заболевание продолжало прогрессировать, его продолжительность у этих больных составляла более двух лет. У пяти пациентов на фоне ЭФХТ удалось отменить иммуносупрессивные препараты. В результате анализа авторы пришли к заключению, что ЭФХТ является эффективным методом лечения, если она применяется на начальных этапах заболевания. По мнению исследователей, данный вид лечения может способствовать стабилизации течения заболевания, частичной ремиссии кожных проявлений, однако в случаях вовлечения в патологический процесс внутренних органов он недостаточно эффективен [23].

Высокая эффективность ЭФХТ была продемонстрирована в многоцентровом исследовании при ее сравнительном изучении с D-пеницилламином при системной склеродермии. Обнаружено достоверное уменьшение площади поражения кожи через шесть месяцев лечения у 68% больных, получавших ЭФХТ, и только у 32%, лечившихся D-пеницилламином [24]. R.M. Knobler и соавт. также отметили значительное улучшение кожного и суставного процесса у пациентов с системной склеродермией с течением заболевания менее двух лет, получавших ЭФХТ, в ходе рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования 64 больных [25]. H. Zachariae и соавт. применили данный метод в лечении пациента с ограниченной склеродермией и добились стойкой ремиссии [26]. L. Pérez-Carmona и соавт. исследовали применение ЭФХТ у восьми больных с системной и ограниченной склеродермией. В результате лечения наблюдалось улучшение течения кожного процесса, более выраженный клинический эффект получен у пациентов с продолжительностью заболевания не более двух лет, что также согласуется с результатами нашего исследования [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данные литературы и наши собственные результаты свидетельствуют о необходимости включения ЭФХТ в качестве адъювантной терапии в стандартный протокол лечения больных ограниченной склеродермией уже на ранних стадиях заболевания, не дожидаясь его прогрессирования. Это должно позволить в кратчайшие сроки добиться выраженной и стойкой клинической ремиссии. ЭФХТ следует проводить курсом, включающим четыре сеанса через день, не менее трех курсов один раз в три месяца. Оценку клинической эффективности лечения рекомендуется выполнять через год после начала терапии. При рецидиве за-

болевания курс лечения следует повторить. ЭФХТ эффективна и на более поздних этапах заболевания. Для достижения стойкой клинической ремиссии курсы лечения могут быть пролонгированы, а при необходимости и сочетаться с иммуносупрессивной терапией.

Литература

1. Гусева Н.Г. Системная склеродермия: клиника, диагностика, лечение. Российский журнал кожных и венерических болезней 2002;(4):5-15. [Guseva N.G. Systemic scleroderma: clinic, diagnostics, therapy. Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney 2002;(4):5-15 (in Russian)].
2. Дворников А.С., Хамаганова И.В., Скрипкин Ю.К., Богуш П.Г. Современные подходы к терапии пациентов с ограниченной склеродермией. Вестник дерматологии и венерологии 2006;(5):17-8. [Dvornikov A.S., Khamaganova I.V., Skripkin Yu.K., Bogush P.G. Contemporary approaches to treatment of localized scleroderma patients. Vestnik dermatologii i venerologii 2006;(5):17-8 (in Russian)].
3. Бутов Ю.С., Тогузов Р.Т. Некоторые аспекты патогенеза, клиника и терапия склеродермии. Российский журнал кожных и венерических болезней 2002;(4):15-9. [Butov Yu.S., Toguzov R.T. Some features of scleroderma pathogenesis, its clinic and therapy. Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney 2002;(4):15-9 (in Russian)].
4. Chung L., Lin J., Furst D.E., Fiorentino D. Systemic and localized scleroderma. Clin Dermatol 2006;24(5):374-92.
5. Волнухин В.А., Мурадян Н.Л., Выборнова О.В., Боровая О.В. Фотохимиотерапия склеродермии и склеродермоподобных заболеваний кожи. Вестник дерматологии и венерологии 2008;(4):39-48. [Volnukhin V.A., Muradyan N.L., Vybornova O.V., Borovaya O.V. Photochemotherapy of scleroderma and scleroderma-like cutaneous diseases. Vestnik dermatologii i venerologii 2008;(4):39-48 (in Russian)].
6. Leitenberger J.J., Cayce R.L., Haley R.W., Adams-Huet B., Bergstresser P.R., Jacobe H.T. Distinct autoimmune syndromes in morphea: a review of 245 adult and pediatric cases. Arch Dermatol 2009;145(5):545-50.
7. Zulian F. Systemic manifestations in localized scleroderma. Curr Rheumatol Rep 2004;6(6):417-24.
8. Gabrielli A., Avvedimento E.V., Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med 2009;360(19):1989-2003.
9. Kräling B.M., Maul G.G., Jimenez S.A. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. Pathobiology 1995;63(1):48-56.
10. Mavalía C., Scaletti C., Romagnani P., Carosino A.M., Pignone A., Emmi L., Pupilli C., Pizzolo G., Maggi E., Romagnani S. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. Am J Pathol 1997;151(6):1751-8.
11. Whitfield M.L., Finlay D.R., Murray J.I., Troyanskaya O.G., Chi J.T., Pergamenschikov A., McCalmont T.H., Brown P.O., Botstein D., Connolly M.K. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(21):12319-24.
12. Корсун В.Ф., Суворов А.П., Морозова И.С. Фитотерапия больных очаговой склеродермией. Вестник последипломного медицинского образования 2006;(2):37-40. [Korsun V.F., Suvorov A.P., Morozova I.S. Phytotherapy of the localized scleroderma patients. Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya 2006;(2):37-40 (in Russian)].
13. Rook A.H., Suchin K.R., Kao D.M., Yoo E.K., Macey W.H., DeNardo B.J., Bromely P.G., Geng Y., Junkins-Hopkins J.M., Lesin S.R. Photopheresis: clinical applications and mechanism of action. J Invest Dermatol Symp Proc 1999;4(1):85-90.
14. Song P.S., Tapley K.J. Jr. Photochemistry and photobiology of psoralens. Photochem Photobiol 1979;29(6):1177-97.
15. Кильдюшевский А.В., Молочков В.А., Ольшанский А.Я., Молочков А.В., Фомин А.М., Гордиевская М.С., Карзанов О.В.,

Петренко Е.В. Адаптивная иммунотерапия Т-клеточных лимфом кожи на основе экстракорпорального фотофереза. Российский журнал кожных и венерических болезней 2010;(1):4-10. [Kil'dyushevskiy A.V., Molochkov V.A., Ol'shanskiy A.Ya., Molochkov A.V., Fomin A.M., Gordievskaya M.S., Karzanov O.V., Petrenko E.V. Adaptive immunotherapy of T-cell skin lymphomas based on extracorporeal photopheresis. Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney 2010;(1):4-10 (in Russian)].

16. Молочков В.А., Кильдюшевский А.В., Карзанов О.В., Аль-бай З. Динамика межклеточных взаимодействий у больных атопическим дерматитом в процессе экстракорпоральной фотохимиотерапии. Российский журнал кожных и венерических болезней 2007;(6):20-2. [Molochkov V.A., Kil'dyushevskiy A.V., Karzanov O.V., Al'-bau Z. Dynamics of cellular interactions in atopic dermatitis patients during extracorporeal photochemotherapy. Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney 2007;(6):20-2 (in Russian)].
17. Молочков В.А., Кильдюшевский А.В., Карзанов О.В. Динамика клеточного иммунитета в процессе экстракорпоральной фотохимиотерапии у больных истинной пузырчаткой. Российский журнал кожных и венерических болезней 2008;(4):71-6. [Molochkov V.A., Kil'dyushevskiy A.V., Karzanov O.V. Dynamics of cellular immunity during extracorporeal photochemotherapy in true pemphigus patients. Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney 2008;(4):71-6 (in Russian)].
18. Малиновская В.В., Молочков В.А., Молочков А.В., Кильдюшевский А.В., Карташова М.Г. Комплексное лечение идиопатического типа саркомы Капоши фотоферезом и интерфероном. Российский журнал кожных и венерических болезней 2008;(1):6-11. [Malinovskaya V.V., Molochkov V.A., Molochkov A.V., Kil'dyushevskiy A.V., Kartashova M.G. Complex treatment of idiopathic type of Kaposi's sarcoma using photopheresis and interferon. Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney 2008;(1):6-11 (in Russian)].
19. Молочков В.А., Кильдюшевский А.В., Карзанов О.В., Якубовская Е.С. Эффективность экстракорпоральной фотохимиотерапии при псориазе и псориатическом артрите. Экспериментальная и клиническая дерматокосметология 2013;(4):57-64. [Molochkov V.A., Kil'dyushevskiy A.V., Karzanov O.V., Yakubovskaya E.S. Efficiency of extracorporeal photochemotherapy for psoriasis and psoriatic arthritis. Eksperimental'naya i klinicheskaya dermatokosmetologiya 2013;(4):57-64 (in Russian)].
20. Pérez-Carmona L., Harto-Castaño A., Díez-Recio E., Jaén-Olasolo P. Extracorporeal photopheresis in dermatology. Actas Dermosifiliogr 2009;100(6):459-71.
21. LeRoy E.C., Medsger T.A. Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. J Rheumatol 2001;28(7):1573-6.
22. Peterson L.S., Nelson A.M., Su W.P. Classification of morphea (localized scleroderma). Mayo Clin Proc 1995;70(11):1068-76.
23. Krasagakis K., Dippel E., Ramaker J., Owsianowski M., Orfanos C.E. Management of severe scleroderma with long-term extracorporeal photopheresis. Dermatology 1998;196(3):309-15.
24. Rook A.H., Freundlich B., Jegasothy B.V., Perez M.I., Barr W.G., Jimenez S.A., Rietschel R.L., Wintroub B., Kahaleh M.B., Varga J. Treatment of systemic sclerosis with extracorporeal photopheresis. Results of a multicenter trial. Arch Dermatol 1992;128(3):337-46.
25. Knobler R.M., French L.E., Kim Y., Bisaccia E., Graninger W., Nahavandi H., Strobl F.J., Keystone E., Mehlmauer M., Rook A.H., Braverman I.; Systemic Sclerosis Study Group. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of photopheresis in systemic sclerosis. J Am Acad Dermatol 2006;54(5):793-9.
26. Zachariae H., Bjerring P., Heickendorff L., Møller B., Wallevik K. Photopheresis and systemic sclerosis. Arch Dermatol 1992;128(12):1651-3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕЗИСТЕНТНЫМ ТЕЧЕНИЕМ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Черных Ю.Б.¹, Шушанов С.С.²

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Российской академии медицинских наук; 115478, г. Москва, Каширское ш., 23, Российская Федерация

Актуальность. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) является закономерным событием в развитии солидных и гематологических опухолей, существенно влияющим на непосредственные и отдаленные результаты лечения. В связи с этим возникает интерес к исследованию этой проблемы при множественной миеломе (ММ), которая характеризуется выраженными клиническими признаками опухолевой прогрессии, главным из которых является отсутствие или потеря ответа на проводимое противоопухолевое лечение.

Цель — определение экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) генов MDR1, MRP1, LRP, BCRP, ответственных за развитие МЛУ в аспирате костного мозга резистентных пациентов до начала бортезомибсодержащей терапии.

Материал и методы. Исследовалась группа из 19 пациентов. Изучение экспрессии генов МЛУ проводили в клетках мононуклеарной фракции костного мозга, содержащей плазмочиты, методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Основные результаты. Экспрессия мРНК генов MDR1, MRP1, BCRP была выявлена у всех пациентов, а гена LRP — у 81%. Уровень экспрессии каждого гена различался. Исходя из этого, было выделено две группы пациентов: с уровнем экспрессии генов МЛУ выше и ниже среднего.

Заключение. Обнаружена 100% экспрессия генов MDR1, MRP1, BCRP у резистентных пациентов с ММ. Медиана выживаемости в группах пациентов с уровнем экспрессии мРНК генов МЛУ выше и ниже среднего существенно и достоверно различается.

Ключевые слова: множественная миелома, костный мозг, множественная лекарственная устойчивость, бортезомибсодержащая терапия.

EXPRESSION OF GENES RESPONSIBLE FOR MULTIDRUG RESISTANCE IN RELAPSED/REFRACTORY MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

Chernykh Yu.B.¹, Shushanov S.S.²

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS; 23 Kashirskoe shosse, 115478 Moscow, Russian Federation

Background: Multidrug resistance (MDR) is a natural phenomenon in development of solid and hematologic tumors. This phenomenon significantly influences both immediate and remote outcome of treatment. In this connection, an interest arises to studying this problem in multiple myeloma (MM) patients with expressed clinical signs of tumorous progression, the main of them being an absence or loss of the response to antitumor treatment.

Aim: To study the expression of messenger RNA (mRNA) of a series of MDR genes, namely MDR1, MRP1, LRP, BCRP responsible for MDR development in the bone marrow aspirate of resistant patients prior to bortezomib-containing chemotherapy.

Materials and methods: Study group included 19 relapsed/refractory multiple myeloma patients. Investigation of MDR genes expression was carried out on the cells of the bone marrow mononuclear fraction containing plasmocytes. The mRNA level was analyzed by semiquantitative RT-PCR (polymerase chain reaction with reverse transcription). Patients were treated with bortezomib-containing chemotherapy hereafter.

Results: mRNA expression of genes MDR1, MRP1, BCRP was revealed in all (100%) patients, and that of gene LRP — in 81% of myeloma samples. The levels of MDR genes mRNA expression were different. On this basis, two groups of patients were identified: with the levels of MDR genes expression above and beyond the average.

Conclusion: 100%-expression of MDR genes (MDR1, MRP1, BCRP) mRNA was revealed in drug resistant MM patients. The median survival in group of patients with higher levels of MDR genes mRNA expression versus lower levels of MDR genes mRNA expression was statistically significant.

Key words: multiple myeloma, bone marrow, multidrug resistance, bortezomib-containing chemotherapy.

Множественная миелома (ММ) относится к В-лимфоплазмочитарным злокачественным процессам с сохраненной функцией синтеза опухолевой клеткой моноклонального иммуноглобулина – парапротеина. Она составляет 1% от всех онкологических заболеваний и немногим более 10% среди всех гемобластозов [1]. Нестабильность генома и клональная гетерогенность опухоли служат причиной селекции в процессе лечения более агрессивных субклонов злокачественных клеток, ответственных за лекарственную резистентность и прогрессию опухоли. Клинически отчетливо выделяются две фазы течения заболевания – чувствительности опухолевых клеток к лекарственным средствам и резистентности к ним. По данным отделения клинической гематологии и иммунотерапии МОНИКИ, частота ответов на первую линию химиотерапии составляет около 80%, а 20% являются первично резистентными [1, 2]. При первом и последующем рецидивах частота резистентных случаев увеличивается с 50 до 100% [2]. Внедрение в широкую клиническую практику лечения ММ ингибитора протеасом препарата Бортезомиб в сочетании со стандартными применявшимися ранее препаратами (Алкран, Преднизолон, Циклофосфан) значительно улучшило выживаемость пациентов. Такой эффект обусловлен тем, что Бортезомиб в сочетании с химиотерапевтическими агентами может давать аддитивный или синергический эффект, а также преодолевать множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) [3].

Известно несколько молекулярных механизмов развития МЛУ. Повышенная активность Р-гликопротеида (Рgp), кодируемого геном MDR1, является одним из наиболее изученных явлений. Рgp использует энергию аденозинтрифосфата (АТФ) для транспортировки группы различных по структуре веществ из цитозоля и/или плазматической мембраны во внеклеточное пространство [4]. Предварительные исследования показали, что у первичных больных ММ, ранее не получавших лечение, экспрессия Рgp обнаруживается только в 1-2% (по данным различных исследований – до 6%) образцов аспирата костного мозга, тогда как у леченных больных с рецидивными или резистентными формами заболевания экспрессия белка регистрировалась от 40 до 85% случаев [5, 6].

Наряду с Рgp в МЛУ вовлечены и другие известные на сегодняшний день белки: АТФ-зависимые транспортеры MRP1, BCRP, а также белок LRP [7, 8]. MRP1 обеспечивает резистентность примерно к тому же кругу противоопухолевых препаратов, что и Рgp, и также является энергозависимым (использующим энергию АТФ) насосом, выталкивающим из клетки токсические соединения. Однако гомология гена MRP1 и гена MDR1, кодирующего Рgp, невелика (14%), поэтому кодируемые этими двумя генами белки значительно различаются по аминокислотному составу. Функциональная активность MRP1 также отличается от активности Рgp: для функционирования MRP1 необходим глутатион. Многие субстраты MRP1 и Рgp совпадают, однако MRP1 преимущественно переносит органические анионы, тогда как Рgp обладает слабым сродством к таким веществам [4].

BCRP, так же, как Рgp и белки MRP, является транспортным белком, работа которого сопряжена с гидролизом АТФ. Известно, что BCRP может обуславливать резистентность клеток примерно к тому же кругу препаратов, что и Рgp, хотя спектр субстратов и эффективность защиты от них для этих двух белков несколько различаются [4]. LRP, в отличие от вышеописанных белков, локализуется не на клеточной мембране, а в цитоплазме. В последние годы большое количество работ было посвящено исследованию роли LRP в развитии резистентности различных новообразований к химиотерапии. Обнаружены корреляции неблагоприятного течения некоторых опухолевых заболеваний с экспрессией LRP, хотя существуют работы, в которых клиническая значимость экспрессии этого белка клетками не обнаружена [4, 7].

Цель нашего исследования – определение экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) генов, ответственных за развитие МЛУ таких генов, как MDR1, MRP1, LRP, BCRP в аспиратах костного мозга у рецидивных/резистентных пациентов с ММ до начала лечения бортезомибсодержащими схемами полихимиотерапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовался аспират костного мозга 19 резистентных больных ММ 3-й стадии (10 мужчин и 9 женщин) в возрасте от 52 до 78 лет. Иммунохимическая характеристика типа патологического иммуногло-

Черных Юлия Борисовна – науч. сотр. отделения клинической гематологии и иммунотерапии МОНИКИ. **Шушанов Саин Сакенович** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетики опухолевых клеток РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Для корреспонденции: Черных Юлия Борисовна – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, к. 9, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 631 73 81. E-mail: yulia_chernih@mail.ru

Chernykh Yuliya Borisovna – scientific worker, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy of MONIKI. **Shushanov Sain Sakenovich** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of tumor cell genetics, Blokhin RCRC.

Correspondence to: Chernykh Yuliya Borisovna – 61/2 s. 9 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Тел.: +7 (495) 631 73 81. E-mail: yulia_chernih@mail.ru

булина распределилась следующим образом: Бенс-Джонс κ диагностирован в пяти случаях, А κ – в пяти, G κ – в четырех, G λ – в трех, Бенс-Джонс λ – в одном, М κ – в одном. Стадирование на момент диагностики проводили по общепринятой системе [9]. Всем пациентам, включенным в исследование, в дальнейшем проводилось лечение бортезомибсодержащими схемами полихимиотерапии.

Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) из клеток моноклеарной фракции костного мозга и электрофорез выделенной РНК проводились согласно стандартному протоколу: клетки костного мозга насаивали на 3 мл фиколла и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 30 минут, после чего на границе раздела фаз отбирали моноклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую плазматические клетки. Отобранные клетки переносили в пробирку с 8 мл раствора Эрла и пересаживали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 минут, затем отмывали в 2-3 мл раствора Эрла. К осадку клеток добавляли 1 мл Тризола (Sigma, США). Электрофорез выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле при напряжении 100 вольт в течение 30-40 минут. Качество выделенной РНК оценивали по наличию полос рибосомальной РНК. Концентрацию определяли по оптическому поглощению при длине волны 260 нм.

Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Реакционная смесь для синтеза комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) (Ли-

тех, Россия), 2 ммоль смеси dNTP (MBI Fermentas), 2-4 ед. ингибитора рибонуклеаз (MBI Fermentas), 100 ед. обратной транскриптазы М-MuLV (MBI Fermentas). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция – 42 °С, 50 минут; денатурация – 94 °С, 5 секунд. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую: 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 2 ммоль смеси dNTP; 2,5 мкл 10-кратного буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MBI Fermentas), 25 ммоль MgCl_2 ; 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы; H_2O до конечного объема 25 мкл; минерального масла – 30 мкл. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе Терцик по следующей схеме: денатурация – 94 °С, 10 секунд; отжиг – T_m , 10 секунд; синтез – 72 °С, 20 секунд. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию GAPDH. Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК, а их интенсивность – денситометрированием с использованием компьютерной программы Scion Image. Числовые значения, соответствующие величине экспрессии мРНК каждого из исследуемых генов, представлены как соотношения числового значения экспрессии мРНК каждого гена к числовому значению экспрессии мРНК гена GAPDH, который был использован в качестве внутреннего контроля. Для удобства и наглядности величины экспрессии мРНК исследуемых генов представлены в виде знаков «+» и «-». При этом «-» озна-

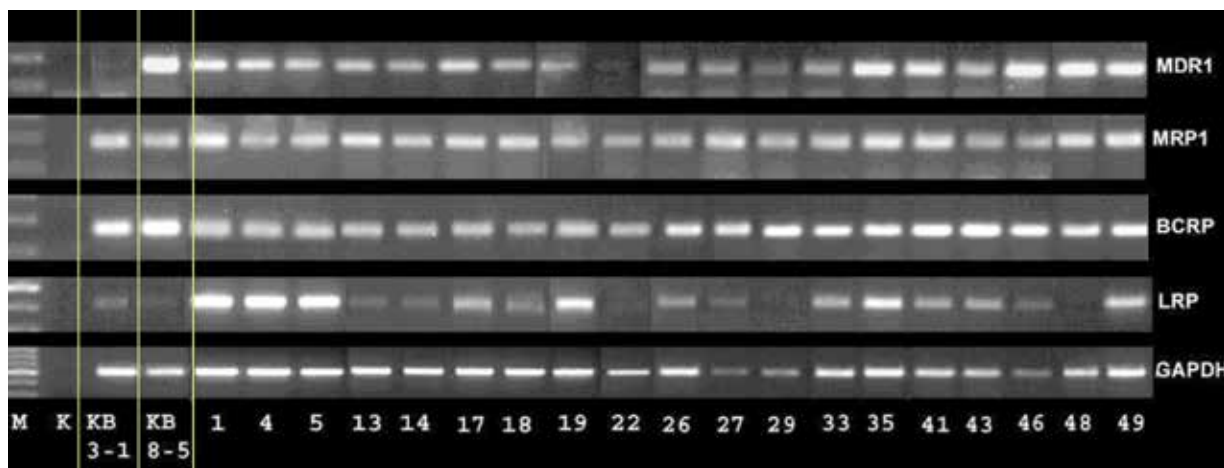


Рис. 1. Гель-электрофорез, результаты ОТ-ПЦР. Экспрессия мРНК генов МЛУ (MDR1, LRP, MRP1, BCRP) в образцах костномозгового пунктата, полученных от леченных больных ММ. В качестве контроля были использованы клетки карциномы полости рта линии KB 8-5, гиперэкспрессирующие мРНК гена MDR1, и клетки линии KB 3-1, в которых мРНК гена MDR1 не экспрессируется

чает, что экспрессия гена отсутствует, «+/-» – экспрессия очень слабая, «+» – экспрессия слабая (отчетливо видимая полоска в агарозном геле), «++++» – экспрессия повышена в 2 раза и более. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ [10].

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prizm. Достоверность различий определялась с использованием непараметрического статистического критерия t-тест, различия считались достоверными при $p < 0,05$. Анализ выживаемости проводился по законченным случаям, поэтому в подсчет вошли 16 из 19 включенных в исследование пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена общая характеристика амплификатов исследуемых генов по результатам ОТ-ПЦР. По этим данным проводилась визуальная оценка степени экспрессии мРНК. Суммарный анализ представлен в таблице: экспрессия генов MDR1, MRP1, BCRP была выявлена у 100% обследованных пациентов, а мРНК гена LRP обнаружена в 16 случаях из 19, что составляет 84% пациентов. Таким образом, клиническая резистентность обследуемых больных подтверждена фундаментальным исследованием – у всех пациентов экспрессируются мРНК генов, ответственных за развитие МЛУ, но интенсивность экспрессии мРНК этих генов разная.

Анализ экспрессии мРНК гена MDR1 показал, что у 8 (42%) больных уровень экспрессии гена был низким, а у 11 (58%) повышен в 2 раза и более, и это различие статистически достоверно ($p = 0,0355$). На рис. 2а графически представлены средние значения

экспрессии мРНК гена MDR1 в группах А (низкий уровень экспрессии) и В (высокий уровень экспрессии).

Общая характеристика экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости

Гены МЛУ	Число пациентов с ММ с экспрессией генов				
	Всего	-	+/-	+	++++
MDR1	19	0	1	7	11
MRP1	19	0	0	14	5
BCRP	19	0	0	11	8
LRP	19	3	2	5	9

Примечание: «-» – экспрессия гена отсутствует; «+/-» – экспрессия гена очень слабая; «+» – нормальная экспрессия гена (отчетливо видимая полоска в агарозном геле); «++++» – экспрессия гена повышена в 2 раза и более.

У 16 (84%) больных была выявлена мРНК гена LRP. Низкий уровень экспрессии мРНК этого гена зарегистрирован у 7 (37%) пациентов, у 9 (47%) он был повышен в 2 раза и более. Средние значения экспрессии мРНК гена LRP в группах С (низкий уровень экспрессии) и D (высокий уровень экспрессии) представлены на рис. 2б. Различие в экспрессии мРНК в этих группах является статистически значимым ($p = 0,0004$).

Достоверное различие обнаружено и при анализе уровня экспрессии мРНК гена MRP1. У 14 (74%) пациентов уровень экспрессии был низким, а у 5 (26%) повышен в 2 раза и более. На рис. 2в представлены средние значения экспрессии мРНК гена MRP1

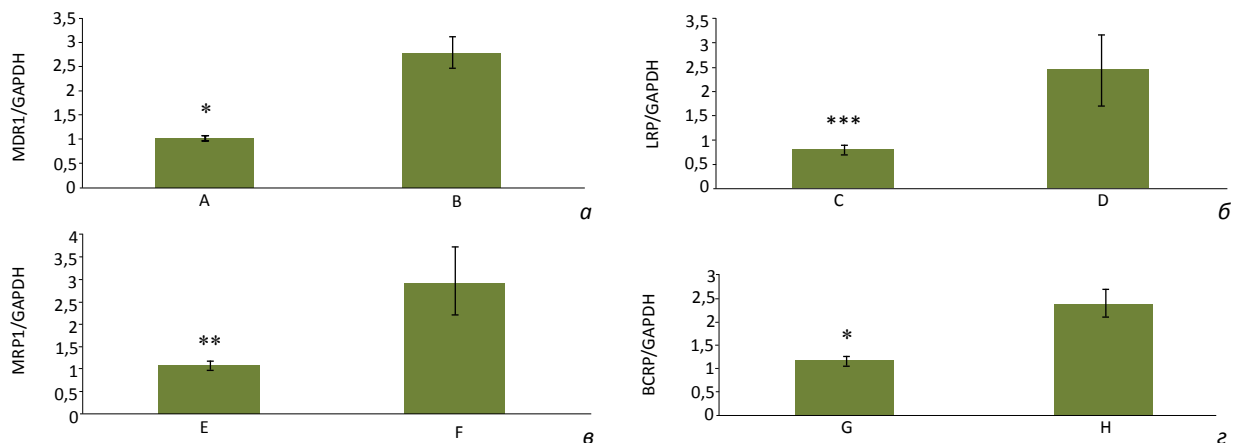


Рис. 2. Среднее значение экспрессии мРНК генов: а – MDR1, б – LRP, в – MRP1, г – BCRP в группах образцов костномозгового пунктата с низким (А, С, Е, Г) и высоким (В, D, F, H) уровнем экспрессии мРНК указанных генов

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – достоверность различий между указанными группами.

в группах Е (низкий уровень экспрессии) и F (высокий уровень экспрессии). Разница в экспрессии мРНК в этих группах является статистически значимой ($p=0,0081$).

Уровень экспрессии мРНК гена BCRP был низким у 11 (58%) больных и у 8 (42%) повышен в 2 раза и более. Средние значения экспрессии мРНК гена BCRP в группах G (низкий уровень экспрессии) и H (высокий уровень экспрессии) представлены на рис. 2г. Различия в экспрессии мРНК в этих группах является статистически значимым ($p=0,0128$).

Всем пациентам, включенным в исследование, в дальнейшем проводилось лечение бортезомиб-содержащими схемами полихимиотерапии. Анализ выживаемости выполнялся по законченным случаям (16 из 19). Несмотря на однородность исследуемой группы, в образцах наблюдалась заметная гетерогенность в экспрессии мРНК генов МЛУ. Поскольку уровни экспрессии мРНК каждого из генов МЛУ у всех пациентов заметно различались, мы использовали среднее значение уровня экспрессии по четырем генам суммарно. Исходя из этого, нами было выделено две группы пациентов: с уровнем экспрессии генов МЛУ выше и ниже среднего (5 и 11 наблюдений соответственно). Анализ выживаемости этих пациентов показал, что в группе с уровнем экспрессии выше среднего медиана выживаемости составила 34 месяца, ниже среднего – 63 месяца ($p=0,0004$), рис. 3.

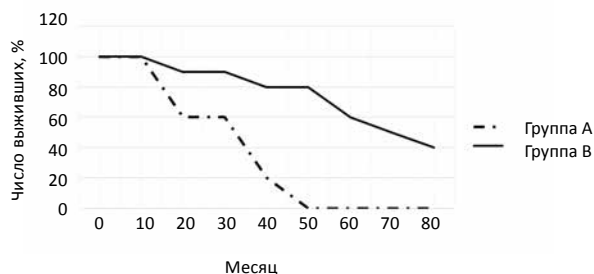


Рис. 3. Кривая выживаемости пациентов с различным уровнем средней экспрессии мРНК генов МЛУ: группа А (5 из 16 – 31%) – уровень экспрессии выше среднего; группа В (11 из 16 – 69%) – уровень экспрессии ниже среднего, $p<0,05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у пациентов, резистентных к стандартной полихимиотерапии, мРНК генов МЛУ MDR1, MRP1, BCRP экспрессировались в 100% случаев, а мРНК гена LRP – в 84% наблюдений.

После проведенного лечения бортезомиб-содержащими схемами полихимиотерапии медиана выживаемости в группах пациентов с уровнем экспрессии мРНК генов МЛУ выше и ниже среднего

достоверно различается. Присоединение бортезомиба к стандартным химиопрепаратам (мелфалан, преднизолон) позволяет преодолеть лекарственную устойчивость опухолевых клеток в случаях с исходно невысоким уровнем экспрессии мРНК генов МЛУ.

Литература

1. Митина Т.А., Голенков А.К., Трифонова Е.В., Луцкая Т.Д., Катаева Е.В., Высоцкая Л.Л., Дудина Г.А., Черных Ю.Б., Захаров С.Г., Клинушкина Е.Ф., Белоусов К.А. Эффективность бортезомиба, мелфалана и преднизолона (ВМП) у пациентов с впервые выявленной множественной миеломой. Биомедицинский журнал Medline.ru 2013;14:1030-50. [Mitina T.A., Golenkov A.K., Trifonova E.V., Lutskaia T.D., Kataeva E.V., Vysotskaya L.L., Dudina G.A., Chernykh Yu.B., Zakharov S.G., Klinushkina E.F., Belousov K.A. Efficiency of Bortezomib, Melphalan and Prednisolone (BMP) in patients with primarily revealed multiple myeloma. Biomeditsinskiy zhurnal Medline.ru 2013;14:1030-50 (in Russian)].
2. Голенков А.К., Митина Т.А., Когарко И.Н., Любимова Н.В., Клинушкина Е.Ф., Барышников А.Ю. Фармакодинамическая характеристика эффективности велкейда при резистентной и рецидивной множественной миеломе: определение свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови. Терапевтический архив 2009;81(7):37-41. [Golenkov A.K., Mitina T.A., Kogarko I.N., Lyubimova N.V., Klinushkina E.F., Baryshnikov A.Yu. Pharmacodynamic characteristic of Velcade efficiency in resistant and recurrent multiple myeloma: detection of free light chains of serum immunoglobulins. Terapevticheskiy arkhiv 2009;81(7):37-41 (in Russian)].
3. Панищева Л.А., Какпакова Е.С., Рыбалкина Е.Ю., Ставровская А.А. Влияние ингибитора протеасом бортезомиба на экспрессию и активность ABC-транспортеров в опухолевых клетках. Биологические мембраны 2010;27(2):195-201. [Panishcheva L.A., Kakpakova E.S., Rybalkina E.Yu., Stavrovskaya A.A. Effect of inhibitors of bortezomib proteasomes on the expression and activity of ABC-transporters in tumor cells. Biologicheskie membrany 2010;27(2):195-201 (in Russian)].
4. Ставровская А.А. Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная активностью транспортных белков клетки: некоторые новые факты и перспективы исследований. Биологические мембраны 2003;20(3):196-205. [Stavrovskaya A.A. Multidrug resistance due to the activity of cellular transport proteins: some new facts and study perspectives. Biologicheskie membrany 2003;20(3):196-205 (in Russian)].
5. Schwarzenbach H. Expression of MDR1/P-glycoprotein, the multidrug resistance protein MRP, and the lung-resistance protein LRP in multiple myeloma. Med Oncol 2002;19(2):87-104.
6. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. J Intern Med 2000;247(5):521-34.
7. Ставровская А.А. Опухолевая клетка в обороне. Соросовский образовательный журнал 2001;(7):17-23. [Stavrovskaya A.A. Tumor cell in the defense. Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal 2001;(7):17-23 (in Russian)].
8. Hatok J., Račay P., Hudeček J., Dobrota D. Genes of multidrug resistance in haematological malignancies. Biologia (Bratislava) 2006;61(3):247-56.
9. Durie B.G., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer 1975;36(3):842-54.
10. Шушанов С.С., Марьяна Л.Г., Черных Ю.Б., Какпакова Е.С. Коэкспрессия мРНК генов систем IGF/инсулин и множественной лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой. Клиническая онкогематология 2010;3(2):105-113. [Shushanov S.C., Mar'ina L.G., Chernykh Yu.B., Kakpakova E.S. Co-expression of mRNA genes of the systems both IGF/insulin and multidrug resistance in patients with multiple myeloma. Klinicheskaya onkogematologiya 2010;3(2):105-113 (in Russian)].

ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ И ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ СУБЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ПИГМЕНТНЫХ ПЯТЕН ТРАХЕОБРОНХИАЛЬНОГО ДЕРЕВА, ПО ДАННЫМ БРОНХОСКОПИИ

Штейнер М.Л.

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России;

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, Российская Федерация

ГБУЗ Самарской области «Самарская городская больница №4»; 443056, г. Самара, ул. Мичурина, 125, Российская Федерация

Актуальность. Этиология выявляемых при эндоскопическом осмотре пигментных пятен слизистой трахеобронхиального дерева окончательно не установлена. Ряд авторов связывает их с активным туберкулезным процессом или его исходом; другие исследователи указывают на связь с профессиональной патологией.

Цель — изучить в рамках общего бронхологического приема частоту выявления и этиологическую принадлежность субэпителиальных пигментных пятен.

Материал и методы. Проанализированы данные 3404 первичных лечебно-диагностических бронхоскопий. Исследования проводились бронхоскопами BF-1T60 и MAF-TM (Olympus, Япония). Эндобронхиальные фотографии выполнялись с помощью бронхоскопа MAF-TM.

Основные результаты. В процессе исследования у 20 (0,59%) пациентов были выявлены субэпителиальные пигментные пятна. Ни в одном из этих случаев не был подтвержден активный туберкулезный процесс или профессиональная патология. У трех пациентов были выявлены свищевые устья в проекции субэпителиальных пигментных пятен.

Заключение. Выявляемость субэпителиальных пигментных пятен в структуре общего бронхологического приема невелика — менее 1% (в нашем исследовании — 0,59%). Клинико-лабораторный, инструментальный, анамнестический анализ позволил связать изучаемую патологию с перенесенным туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов.

Ключевые слова: гибкая бронхоскопия, субэпителиальные пигментные пятна трахеобронхиального дерева.

THE SUBEPITHELIAL PIGMENT SPOTS OF TRACHEOBRONCHIAL TREE: DETECTION RATE AND ETIOLOGY ACCORDING TO BRONCHOSCOPY FINDINGS

Shteiner M.L.

Samara State Medical University; 89 Chapayevskaya ul., 443099 Samara, Russian Federation

Samara City Hospital No.4; 125 Michurina ul., 443056 Samara, Russian Federation

Background: The etiology of tracheobronchial tree subepithelial pigment spots, detected by endoscopic examination, has not been yet finally established. Some authors attribute them to an active tuberculous process or its outcome; other researchers suggest their association with the professional pathology.

Aim: To study the detection rate and etiology of tracheobronchial tree subepithelial pigmented spots within the unspecialized bronchoscopic examination.

Materials and methods: A total of 3404 primary therapeutic and diagnostic bronchoscopic data were analyzed. The examinations were conducted using bronchoscopes BF-1T60 and MAF-TM (Olympus, Japan). Endobronchial photos were performed using a bronchoscope MAF-TM.

Results: During the study, the subepithelial pigment spots were detected in 20 (0.59%) cases. In none of these cases, an active tuberculous process or professional pathology was confirmed. Fistulas in projection of subepithelial pigmented spots were found in 3 cases.

Conclusions: Detection rate of subepithelial pigmented spots during the non-specialized bronchoscopic procedure is low, less than 1% (0.59% in our study). Clinical, laboratory, instrumental, and anamnestic analyses allowed us to associate the studied pathology with the previous tuberculosis of intrathoracic lymph nodes.

Key words: flexible bronchoscopy, subepithelial pigment spots, tracheobronchial tree.

История бронхоскопии началась в 1897 г., когда Густав Киллиан удалил из правого промежуточного бронха аспирированную мясную кость. Несмотря на довольно долгий срок использования бронхоскопии в медицинской практике для оценки визуальной эн-

добронхиальной симптоматики, еще остаются нерешенные вопросы. К ним, в частности, относится этиологическая трактовка так называемых пигментных пятен слизистой трахеобронхиального дерева, которые являются находкой эндоскопического осмотра —

не слишком частой, но и не казуистической. Практически все исследователи сходятся во мнении, что подобная симптоматика отражает патологию перибронхиальных или бифуркационных лимфатических узлов [1, 2, 3].

Существует точка зрения, свидетельствующая о том, что причиной специфического поражения лимфоидного аппарата служит профессиональная пылевая патология легких [2, 3]. Ряд авторов рассматривают специфическую пигментацию как следствие активного туберкулезного процесса в легких с развитием специфического бронхоаденита и туберкулеза бронхов [1, 4]. Другие бронхологи, исследовавшие различные эндобронхиальные варианты течения туберкулеза бронхов, вообще не упоминают о пигментных пятнах [5, 6, 7].

Часто пигментные пятна трактуются как визуальные признаки кальцинированных элементов первичного туберкулезного комплекса во внутригрудных лимфатических узлах, нередко развивающихся как на фоне медикаментозного лечения туберкулезного процесса, так и при спонтанном излечении [8].

Учитывая неоднозначную трактовку этой эндобронхиальной симптоматики, мы предприняли собственное исследование этого вопроса в рамках общего бронхологического приема. Были изучены выявляемость и этиологическая принадлежность субэпителиальных пигментных пятен.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проанализированы данные 3404 первичных лечебно-диагностических бронхоскопий, выполненных в 2010-2012 гг. пациентам пульмонологического отделения стационара Самарского городского пульмонологического центра, развернутого на базе Самарской городской больницы №4.

Бронхоскопия проводилась фибробронхоскопом BF-1T60 и видеобронхоскопом MAF-TM (Olympus, Япония). Эндобронхиальные фотографии выполнялись с помощью мегапиксельной камеры, вмонтированной в пульт управления бронхоскопа MAF-TM.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 3404 первичных лечебно-диагностических бронхоскопий, проведенных по различным показаниям,

пигментные пятна были выявлены в 20 (0,59%) случаях. Все они находились под эпителиальным слоем, при этом изменения слизистой в проекции пятен чаще всего носили фондовый характер. Это позволило нам использовать термин «субэпителиальные пигментные пятна». Типичные примеры таких пятен представлены на рис. 1-4.

В трех наблюдениях в проекции пигментных пятен на слизистой бронха отмечались свищевые отверстия – как obturated, так и зияющие (рис. 5-7).

Нозологический состав пациентов с обнаруженными субэпителиальными пигментными пятнами представлен в таблице.

Состав пациентов с обнаруженными субэпителиальными пигментными пятнами

Нозологический состав пациентов	Число больных	Больные со свищевым устьем в проекции субэпителиального пигментного пятна
Внебольничная пневмония	6 (30%)	1 (5%)
ХОБЛ	9 (45%)	1 (5%)
Внебольничная пневмония на фоне ХОБЛ	4 (20%)	1 (5%)
Бронхиальная астма	1 (5%)	–
Всего	20 (100%)	3 (15%)

Все пневмонии были подтверждены рентгенологически. Они имели обычную динамику на фоне адекватной антибактериальной терапии. Рентгенологически зафиксирована также инверсия синдрома инфильтрата легочной ткани.

При проведении первичной лечебно-диагностической бронхоскопии всем пациентам с внебольничной пневмонией, в том числе на фоне хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), выполнялся диагностический бронхоальвеолярный лаваж с последующим определением в бронхоальвеолярной жидкости кислотоустойчивых микробактерий. Эти микроорганизмы выявлялись путем окраски мазков, полученных в результате центрифугирования бронхоальвеолярной жидкости по методу Циля – Нильсена.

Девяти пациентам с ХОБЛ и одному с бронхиальной астмой диагностический бронхоальвеоляр-

Штейнер Михаил Львович — д-р мед. наук, врач-эндоскопист СГБ №4 и СамГМУ, ассистент курса эндоскопии кафедры хирургии института последипломного образования СамГМУ.

Для корреспонденции: Штейнер Михаил Львович – 443069, г. Самара, ул. Аэродромная, 28-57, Российская Федерация. Тел.: +7 (927) 207 71 18. E-mail: ishte@mail.ru

Shteiner Mikhail L'vovich — MD, PhD, physician-endoscopist, Samara City Hospital No.4; Assistant of the Course of Endoscopy, the Chair of Surgery, Institute of Postgraduate Training, Samara SMU.

Correspondence to: Shteiner Mikhail L'vovich – 57-28 ul. Aerodromnaya, 443069 g. Samara, Russian Federation. Tel.: +7 (927) 207 71 18. E-mail: ishte@mail.ru



Рис. 1. Субэпителиальные пигментные пятна в области промежуточного бронха левого легкого



Рис. 2. Субэпителиальное пигментное пятно в области бронха S_{10} правой базальной пирамиды



Рис. 3. Субэпителиальные пигментные пятна в области верхнедолевого бронха правого легкого



Рис. 4. Множественные субэпителиальные пигментные пятна в области бронха S_6 левого легкого



Рис. 5. В проекции субэпителиального пигментного пятна верхнедолевого бронха правого легкого находится зияющее свищевое устье, дно которого заполнено антракотически измененной тканью



Рис. 6. В проекции субэпителиального пигментного пятна, расположенного в области шпоры бронха S_6 левого легкого, отмечается облитерированное свищевое устье



Рис. 7. В проекции субэпителиального пигментного пятна, расположенного в области левого верхнедолевого бронха, отмечается облитерированное свищевое устье

ный лаваж с последующим определением кислотоустойчивых бактерий проводился при повторной бронхоскопии. Показанием к его выполнению явились обнаруженные при первичной лечебно-диагностической бронхоскопии субэпителиальные пигментные пятна. Ни у одного пациента не было клинических, лабораторных и эндоскопических признаков активного туберкулезного процесса, никто из них никогда не состоял на учете в противотуберкулезных диспансерах. Не был также установлен контакт обследованных с больными туберкулезом. Один пациент, госпитализированный с внебольничной пневмонией, указывал на работу в запыленных условиях, но при этом отмечал, что производство не имеет официального статуса вредного.

Отсутствие признаков активного туберкулезного процесса позволяет исключить туберкулез как этиологический фактор субэпителиальных пигментных пятен. Не нашла своего подтверждения и версия о специфическом поражении лимфоидного аппарата профессионального характера при пылевых воздействиях. У 19 пациентов полностью отсутствовал соответствующий профессиональный анамнез, а у одного эти сведения носили субъективный характер, не подтвержденный официально. Кроме того, логично было предположить, что если произошло пылевое поражение лимфоидного аппарата трахеобронхиального дерева, следовало бы ожидать пылевую импрегнацию слизистой. Однако этого не наблюдалось: все пигментные пятна носили субэпителиальный характер.

Представляется правильной версия о перенесенном туберкулезном поражении лимфатических узлов с наступившим самоизлечением и антракотизацией их ткани, что визуально воспринимается как субэпителиальные пигментные пятна. Наличие

у ряда пациентов свищевых устьев в проекции субэпителиальных пигментных пятен свидетельствует о прошедшем активном туберкулезном процессе, сопровождавшемся формированием бронхолимфонодулярного свища. Возможно, сформированные субэпителиальные пигментные пятна являются следствием различных этиологических моментов и патогенетических механизмов, приводящих к общему исходу – антракотизации лимфатических узлов, имеющих сходную визуальную эндобронхальную симптоматику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявляемость субэпителиальных пигментных пятен в структуре общего бронхологического приема невелика: менее 1% (в нашем исследовании – 0,59%). У обследованного контингента пациентов субэпителиальные пигментные пятна связаны, по всей вероятности, с ранее перенесенным туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов.

Литература

1. Васильев Н.А., Семиошин В.В. Клиническое значение пигментных пятен слизистой бронхов в практике эндоскопии. *Лечащий врач* 1998;(5):48-9. [Vasil'ev N.A., Semioshin V.V. Clinical significance of bronchial mucosa pigmented spots in endoscopic practice. *Lechashchiy vrach* 1998;(5):48-9 (in Russian)].
2. Падерин В.Ф. Эндоскопия силикотуберкулеза и его основных аденогенных проявлений. *Уральский медицинский журнал* 2007;(13):47-56. [Paderin V.F. Endoscopy of silicotuberculosis and its main adenogenous manifestations. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal* 2007;(13):47-56 (in Russian)].
3. Падерин В.Ф., Чугаев Ю.П., Теряев М.В. Сравнительная характеристика кониотуберкулеза внутригрудных лимфатических узлов профессионального и бытового генеза. *Проблемы туберкулеза* 1995;(6):27-9. [Paderin V.F., Chugaev Yu.P., Teryaev M.V. Comparative characteristic of coniotuberculosis of intrathoracic lymph nodes of professional and domestic genesis. *Problemy tuberkuleza* 1995;(6):27-9 (in Russian)].
4. Баранова О.П., Илькович М.М., Сперанская А.К. Трудности диагностики саркоидоза органов дыхания. *Клиническая медицина* 2011;(3):58-62. [Baranova O.P., Il'kovich M.M., Speranskaya A.K. Diagnostic difficulties in sarcoidosis of the respiratory apparatus. *Klinicheskaya meditsina* 2011;(3):58-62 (in Russian)].
5. Жингель И.П. Туберкулез бронхов – проблема бронхологии или фтизиатрии? *Проблемы туберкулеза* 2001;(9):43-6. [Zhingel' I.P. Bronchial tuberculosis – a problem of bronchology or phthisiology? *Problemy tuberkuleza* 2001;(9):43-6 (in Russian)].
6. Жингель И.П. Туберкулез бронхов – проблемы патогенеза и дифференциальной диагностики. *Лечащий врач* 2000;(3):22-7. [Zhingel' I.P. Bronchial tuberculosis – a problem of pathogenesis and differential diagnostics. *Lechashchiy vrach* 2000;(3):22-7 (in Russian)].
7. Серов О.А., Колпаков О.А., Краснов В.А. Комплексное обследование больных в диагностике туберкулезного поражения бронхов. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН* 2011;(2):48-54. [Sеров О.А., Kolpakov O.A., Krasnov V.A. Complex examination of patients during diagnosis of bronchial tuberculous lesions. *Byulleten' VSNTs SO RAMN* 2011;(2):48-54 (in Russian)].
8. Стаханов В.А., Каторгин Н.А., Цыганков Е.В. Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов у лиц пожилого и старческого возраста. *Лечебное дело* 2008;(3):48-54. [Stakhanov V.A., Katorgin N.A., Tsygankov E.V. Tuberculosis of intrathoracic lymph nodes in elderly and senile patients. *Lechebnoe delo* 2008;(3):48-54 (in Russian)].

РЕАБИЛИТАЦИЯ БОЛЬНЫХ С АФАЗИЕЙ ПО МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДИКАМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

Щербакова М.М., Котов С.В.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Актуальность данной работы обусловлена высокой распространенностью сосудистых заболеваний головного мозга среди взрослого населения. Одним из самых тяжелых последствий сосудистых заболеваний является афазия, так как она приводит к инвалидизации больного. Наиболее тяжелой и необратимой для реабилитации выступает группа больных, у которых вследствие развития афазии доминируют импрессивные речевые нарушения.

Цель — поиск наиболее эффективного способа реабилитации больных с последствиями нарушения мозгового кровообращения в виде речевых нарушений в форме афазии.

Материал и методы. Изучена теоретическая составляющая вопроса реабилитации постинсультных больных с афазией при доминировании импрессивных речевых нарушений. Проведены неврологическое обследование, динамическое логопедическое обследование, магнитно-резонансная томография. Проводилась реабилитация больных по модифицированной методике восстановления речи.

Основные результаты. Внедрение в логопедическую практику модифицированных методик восстановления доказало их высокую эффективность. Значительное улучшение наблюдалось: в 64% случаев у больных с акустико-мнестической афазией, в 57% случаев у больных с акустико-гностической афазией, в 60% случаев у больных с семантической афазией.

Заключение. Ключевым моментом достижения высоких результатов восстановления служит комплексный подход, необходимый при реабилитации больных с последствиями острого нарушения мозгового кровообращения.

Ключевые слова: реабилитация больных с последствиями мозгового инсульта, импрессивные речевые нарушения, задние формы афазии, модификация методов восстановления.

REHABILITATION OF PATIENTS WITH APHASIA USING MODIFIED RESTORATION METHODS

Shcherbakova M.M., Kotov S.V.

Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul.,
129110 Moscow, Russian Federation

Background: There is a high prevalence of vascular diseases of the brain in adult population. One of the most severe complications of the cerebral vascular diseases is an aphasia leading to patient's disability. An extremely severe and irreversible condition for further rehabilitation is noted in a group of patients which develops an impressive speech impairment as a dominant disturbance associated with aphasia.

Aim: To identify the most effective rehabilitation method for patients with complications of cerebral circulation disturbances manifesting as speech impairment in a form of aphasia.

Materials and methods: Theoretical aspect of rehabilitation in post-stroke aphasia patients with a dominant impressive speech impairment was studied. All patients underwent neurologic examination, dynamic logopedic observation, and magnetic resonance imaging. The patients of the chosen group underwent rehabilitation with a modified modality of speech restoration.

Results: Introduction of the modified rehabilitation methods into the logopedics practice proved their high efficiency. Significant improvement was seen in 64% of patients with acoustic-amnesic aphasia, in 57% of patients with acoustic-gnostic aphasia, and in 60% of those with semantic aphasia.

Conclusion: A key moment for achievement of the high rehabilitation outcome is a complex approach needed for rehabilitation of patients with the consequences of the acute impairments of cerebral circulation.

Key words: consequences of cerebral stroke, impressive speech disturbances, posterior forms of aphasia, rehabilitation, modification of the restoration methods.

Сосудистые заболевания головного мозга по причине высокой распространенности и тяжести протекания представляют одну из важнейших медицинских проблем. В большинстве случаев больным с локальным нарушением мозгового крово-

обращения требуются сосудистая терапия и занятия с логопедом. Это связано в первую очередь с тем, что фактически у одной трети больных вследствие мозгового инсульта развивается афазия и происходит системное нарушение речи, которое охватыва-

ет различные уровни ее организации, что приводит к дезинтеграции всей психической сферы человека [1, 2]. В результате подобного заболевания люди трудоспособного возраста становятся инвалидами 1-й и 2-й группы.

Наибольшую сложность в реабилитации больных с афазиями представляет группа пациентов, у которых доминируют импрессивные речевые нарушения. В данном случае тяжесть протекания и трудности восстановления обусловлены тем, что больные не способны осознать наличие у себя речевого дефекта [3]. Нарушается слуховой контроль воспринимаемой речи, поэтому положительный прогноз восстановления затруднен. В настоящее время причинами невысоких результатов восстановления этой группы больных являются отсутствие систематизированных методик с учетом всей структуры дефектов и изолированность работы специалистов (логопедов и неврологов), занимающихся их реабилитацией.

Актуальность работы обусловлена необходимостью преобразования традиционных методик коррекции на основе пересмотра механизмов протекания речевых расстройств и способов реабилитации афазий с доминированием импрессивных речевых нарушений. В последнее время появились новые данные о задействованности полушарий головного мозга в обработке речевой информации и о компенсаторных процессах, происходящих в коре головного мозга у больных с локальным нарушением мозгового кровообращения [4, 5].

При разработке методики восстановления мышления у больных с доминированием импрессивных речевых нарушений учитывались особенности обработки речевой информации головным мозгом и избирательная активность определенных областей мозга при решении тех или иных речевых задач [6]. Новизна модифицированных методик заключается в следующих аспектах:

– учет специфических факторов, влияющих на протекание и возможности восстановления речевого мышления у больных с локализацией очага поражения в задних отделах коры головного мозга (неоднородность неязыковых когнитивных расстройств, нарушение процесса называния, изменение беглости мыслительных процессов) [1, 7, 8, 9];

– дифференцирование степеней тяжести всех форм речевых расстройств (в том числе выделение грубых степеней тяжести у больных с акустико-мнестической и семантической афазией);

– учет характера течения (легче воспринимаются осмысленные слова, чем бессмысленные сочетания звуков; целостные фразы, чем отдельные слова, и т.д.);

– учет факторов, влияющих на прогноз восстановления (этиология, первичность, давность возникновения, обширность очага поражения, состояние других когнитивных функций, преморбид, возраст, пол).

Основная идея данной работы заключается в предположении, что модификация методик восстановления в сочетании с применением адекватных и эффективных медикаментозных препаратов может привести к высокому проценту восстановления.

В 2013 г. в неврологическом отделении МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского наблюдались 23 больных, у которых в ходе логопедического обследования было определено доминирование импрессивных речевых нарушений над экспрессивными. Эти формы афазии обусловлены локализацией очага поражения в задних отделах головного мозга. По данным объективных исследований (компьютерной и магнитно-резонансной томографии (МРТ)), у этой группы пациентов регистрировались патологические очаги в следующих областях коры головного мозга:

– среднезадние отделы височной области у больных с акустико-гностической афазией (рис. 1);
– задняя треть верхней височной извилины у больных с акустико-мнестической афазией (рис. 2);
– теменно-височно-затылочные отделы у больных с семантической афазией (рис. 3).

Больным выбранной группы (23 человека) был поставлен 31 логопедический диагноз (с учетом того, что в большинстве случаев наблюдалась картина сочетанных речевых нарушений). Нарушения распределялись следующим образом: 14 больных с акустико-мнестической афазией, 7 – с акустико-гностической, 10 – с семантической.

Рассмотрим план восстановления каждой степени тяжести речевых нарушений по модифицированным методикам.

Щербакова Мария Михайловна – логопед высшей категории МОНИКИ. **Котов Сергей Викторович** – д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения неврологии МОНИКИ.

Для корреспонденции: Щербакова Мария Михайловна – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: +7 (910) 452 97 39. E-mail: mmsch@mail.ru

Shcherbakova Mariya Mikhaylovna – first category logopedist, MONIKI. **Kotov Sergey Viktorovich** – MD, PhD, Professor, Head of the Department of Neurology, MONIKI.

Correspondence to: Shcherbakova Mariya Mikhaylovna – 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Tel.: +7 (910) 452 97 39. E-mail: mmsch@mail.ru

При работе с больными, имеющими грубую степень тяжести, граничащую с тотальной, задачей методик восстановления является стимуляция компенсаторных возможностей субдоминантного полушария. На данном этапе восстановление психической функции в прежнем виде оказывается невозможным, необходима перестройка для радикального изменения ее психофизиологической структуры. Существует определенная закономерность восстановления функции у больных после



Рис. 1. МРТ головного мозга больного с акустико-гностической афазией. Картина ишемического инфаркта в левой височно-теменной и частично затылочной области

перенесенного ими инфаркта мозга. Рядом с очагом поражения мозга формируются зоны пластичности и вторичной замены утраченных функций, при этом аналогичные зоны гиперметаболизма формируются в симметричных областях противоположного полушария мозга [10]. Целый ряд ученых считают, что благоприятный прогноз восстановления речевого мышления у больных с афазиями напрямую зависит от того, способно ли правое полушарие на начальных этапах временно взять на себя функцию левого [11]. Поэтому на первом этапе восстановления больным с акустико-гностической афазией предлагается прием глобального чтения текста, а с акустико-мнестической – работа по нормализации зрительно-предметного гнозиса. Так, например, пациент должен рассмотреть недорисованные предметные картинки и назвать их (рис. 4). С больными с семантической афазией проводится работа над восстановлением зрительно-пространственного восприятия и преодолением акалькулии.

На следующем этапе при работе с больными, имеющими среднюю степень тяжести, стимулируется активность угнетенного доминантного полушария. При этом в методиках учитывается необходимость дальнейшего участия субдоминантного полушария для повышения эффективности восстановления. У больных с акустико-гностической афазией фонематическое восприятие и семантика речи восстанавливаются при помощи введения слова в контекст. Больным с акустико-мнестической афазией для расширения объема слухо-речевой памяти предлагается запоминать адреса и номера телефонов. С больными с семантической афазией проводится работа над восстановлением глубинного значения слова при помощи интерпретации пословиц.

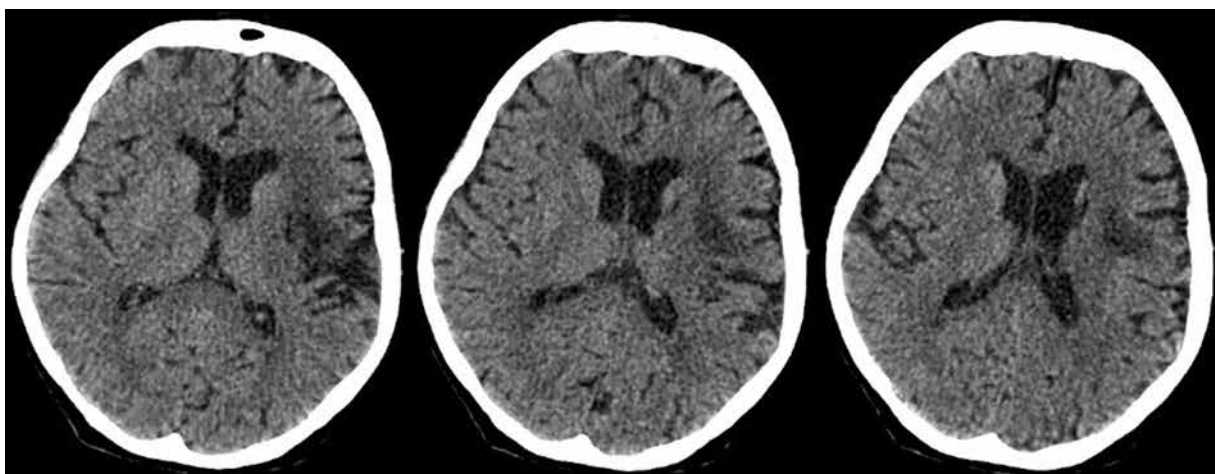


Рис. 2. МРТ головного мозга больного с акустико-мнестической афазией. Картина внутримозгового кровоизлияния в левой гемисфере большого мозга (в переднебазальных отделах левой височной области и латеральных отделах подкорковых ядер)

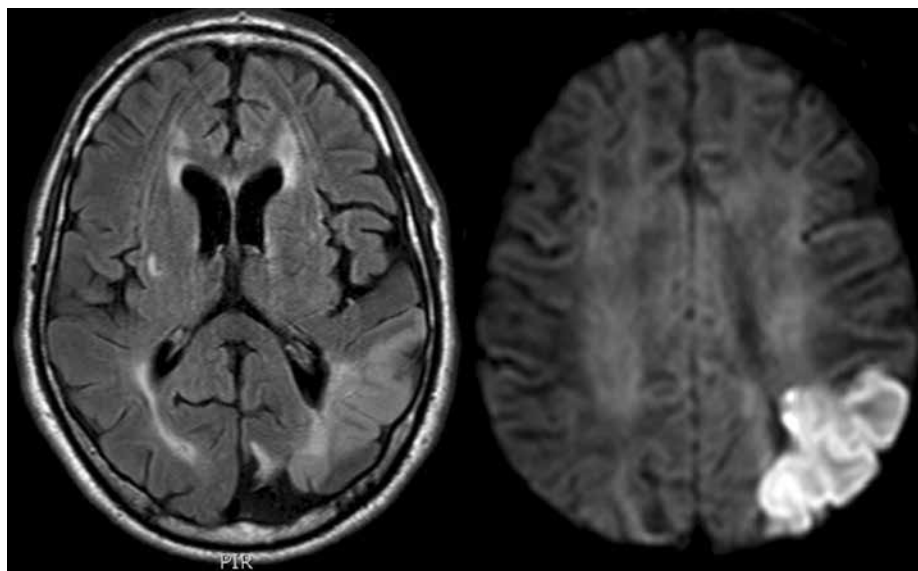
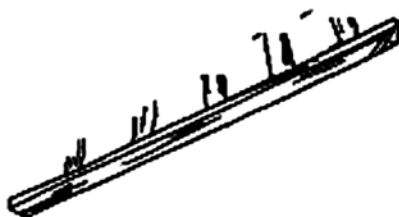


Рис. 3. МРТ головного мозга больной с семантической афазией. Картина внутримозгового кровоизлияния в левой височной области и в прилежащих к ней задних отделах

Инструкция: «Посмотрите на эти картинки. Назовите предметы, которые на них нарисованы».



«Что-то такое. А, да это лестница»



«Что-то лежит»



«Вилка, что ли?»



«Не знаю»

Рис. 4. Пример называния недорисованных картинок больным с грубой степенью тяжести акустико-мнестической афазии

Процедура: данное задание проводим в два этапа. На первом этапе читаем больному пословицу, затем предлагаем на выбор несколько вариантов ее интерпретации. На втором этапе просим больного самостоятельно объяснить значение каждой пословицы, которая была ему прочитана.

Инструкция: «Прочитайте/прослушайте пословицу и найдите ей верное объяснение».

Семь раз отмерь, один раз отрежь.

— Если сам отрезал неправильно, то не следует винить ножницы.

— Прежде чем сделать, надо хорошо подумать.

— Продавец отмерил семь метров ткани и отрезал кусок.

Нечего на зеркало пенять, коли рожа крива.

— Не стоит кивать на обстоятельства, если дело в тебе самом.

— Хорошее качество зеркала зависит не от рамы, а от самого стекла.

— Зеркало висит криво.

На третьем, заключительном этапе, при восстановлении легкой степени выраженности речевых нарушений в каждом отдельном случае учитывается не только очаг поражения, но и его связи с другими, более сложными по организации отделами коры головного мозга, которыми являются третичные отделы второго функционального блока (при синдромах акустико-гностической и акустико-мнестической афазии) и префронтальная кора передних отделов головного мозга, соответствующая третичным полям третьего функционального блока (при синдроме семантической афазии). Это отражается в следующих видах заданий: при акустико-гностической афазии предлагается разгадывать кроссворды (рис. 5), а также объяснять логико-грамматические обороты; при акустико-мнестической – пересказывать тексты и объяснять переносные значения слов; при семантической – выявлять логические и стилистические ошибки, допущенные в тексте.

Инструкция: «Перед Вами кроссворд. Все слова в нем загаданы по горизонтали. В каждом кроссворде есть ключевое слово, которое Вы сможете отгадать, разгадав все слова в данном кроссворде».

Слова:

1. Предмет мебели. Бывает письменный, обеденный или кухонный.
2. Сооружение для переправы через водное пространство (реку). Бывают раздвижные, а также пешеходные.
3. Прозрачная жидкость для питья.
4. У человека есть тело и она, вечная...



вода

Рис. 5. Пример разгадывания кроссворда больным с легкой степенью выраженности акустико-гностической афазии

Внедрение модифицированных методик восстановления в логопедическую практику доказало их высокую эффективность. Значительное улучшение наблюдалось:

- в 64% случаев у больных с акустико-мнестической афазией (у 9 из 14);
- в 57% случаев у больных с акустико-гностической афазией (у 4 из 7);
- в 60% случаев у больных с семантической афазией (у 6 из 10).

При этом, несмотря на сокращенный курс логопедических занятий из-за ограничения сроков госпитализации, наблюдалось практическое восстановление речи у больных с акустико-мнестической и семантической афазией в 7 и 10% случаев соответственно (у двух человек).

Важно отметить, что ключевым моментом достижения высоких результатов восстановления служит комплексный подход, необходимый при реабилитации больных с последствиями острого нарушения мозгового кровообращения.

Литература

1. Sarno M.T., Postman W.A., Cho Y.S., Norman R.G. Evolution of phonemic word fluency performance in post-stroke aphasia. J Commun Disord 2005;38(2):83-107.
2. Цветкова Л.С. Афазия и восстановительное обучение. М.: Издательство МГУ; 2001. [Tsvetkova L.S. Aphasia and restorative teaching. Moscow: Izdatel'stvo MGU; 2001 (in Russian)].
3. Бурлакова (Шохор-Троцкая) М.К. Речь и афазия. М.: Эксмо-Пресс, В. Секачев; 2001. [Burlakova (Shokhor-Trotskaya) M.K. Speech and aphasia. Moscow: Eksmo-Press, V. Sekachev; 2001 (in Russian)].
4. Дамулин И.В., Кононенко Е.В. Постинсультные нарушения и процессы нейропластичности. М.: Издательство Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; 2009. [Damulin I.V., Kononenko E.V. Post-stroke disturbances and neuroplasticity processes. Moscow: Izdatel'stvo Pervogo MGU im. I.M. Sechenova; 2009 (in Russian)].
5. Aben L., Busschbach J.J., Ponds R.W., Ribbers G.M. Memory self-efficacy and psychosocial factors in stroke. J Rehabil Med 2008;40(8):681-3.
6. Можейко Е.Ю. Диагностика нейродинамических нарушений речи у постинсультных больных. Неврологический вестник 2008;(2):42-6. [Mozheyko E.Yu. Diagnosis of neurodynamic speech impairments in post-stroke patients. Nevrologicheskiy vestnik 2008;(2):42-6 (in Russian)].
7. Mihăilescu L. Communicative disorders in Wernicke's aphasics. Rom J Neurol Psychiatry 1993;31(2):85-96.
8. Pulvermüller F., Berthier M.L. Aphasia therapy on a neuroscience basis. Aphasiology 2008;22(6):563-99.
9. Seniów J., Litwin M., Leśniak M. The relationship between non-linguistic cognitive deficits and language recovery in patients with aphasia. J Neurol Sci 2009;283(1-2):91-4.
10. Friederici A.D., Rüschemeyer S.A., Hahne A., Fiebach C.J. The role of left inferior frontal and superior temporal cortex in sentence comprehension: localizing syntactic and semantic processes. Cereb Cortex 2003;13(2):170-7.
11. Nair K.P., Taly A.B. Stroke rehabilitation: traditional and modern approaches. Neurol India 2002;50 Suppl:S85-93.

БИОАНТИОКСИДАНТЫ (часть 1)

Гудков С.В.^{1,2,3}, Брусков В.И.^{1,2}, Куликов А.В.¹, Бобылёв А.Г.¹, Куликов Д.А.^{1,4}, Молочков А.В.⁴

¹ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук; 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация

²Пущинский государственный естественно-научный институт; 142290, Московская обл., г. Пущино, пр-кт Науки, 3, Российская Федерация

³ФГБУН «Институт общей физики им. А.М. Прохорова» Российской академии наук; 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 38, Российская Федерация

⁴ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

В статье представлена синтетическая классификация известных биоантиоксидантов, описаны особенности их строения и функционирования. В данной части рассмотрены ферментативные и фенольные антиоксиданты, миметики ферментов.

Ключевые слова: антиоксиданты, окислительный стресс, активные формы кислорода.

THE BIOANTIOXIDANTS (part 1)

Gudkov S.V.^{1,2,3}, Bruskov V.I.^{1,2}, Kulikov A.V.¹, Bobylev A.G.¹, Kulikov D.A.^{1,4}, Molochkov A.V.⁴

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS; 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

²Pushchino State Scientific Institute; 3 Prospekt Nauki, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

³A.M. Prokhorov General Physics Institute of RAS; 38 Vavilova ul., 119991 Moscow, Russian Federation

⁴Moscow Regional Research and Clinical Institute; 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

Based on the analysis of the latest scientific data, the paper suggests synthetic classification of known bioantioxidants, peculiarities of their structure and functioning. Enzymatic, phenolic antioxidants, and enzyme mimetics are described in this part of the review.

Keywords: antioxidants, oxidative stress, reactive oxygen species.

Антиоксидант – это любое вещество, которое, присутствуя в низких по сравнению с окисляемым субстратом концентрациях, существенно задерживает или ингибирует его окисление [1]. В настоящее время изучением антиоксидантных свойств различных соединений занимаются многие исследователи. Этой проблеме посвящен ряд монографий [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Одним из наиболее значимых окисляющих агентов, действующих на биологические макромолекулы – нуклеиновые кислоты, белки и липиды – являются активные формы кислорода (АФК). Их образование происходит при нормальном клеточном метаболизме, а также при воздействии факторов внешней среды: ионизирующего и ультрафиолетового излучений, тепла, света, электромагнитного излучения крайне высоких частот и др. [7, 8, 9, 10, 11,

12, 13]. Высокая реакционная способность АФК делает их чрезвычайно токсичными для биологических систем на молекулярно-клеточном уровне. Считается, что нормальное функционирование и развитие клеток в кислородсодержащем окружении было бы невозможно без существования защитных антиоксидантных систем [3].

По химической природе антиоксиданты представляют собой широкий класс химических соединений. Структурное сходство является основным параметром классификации. Антиоксиданты классифицируют также в зависимости от растворимости, например, жирорастворимые и водорастворимые [4]. Систематики могут быть построены на делении по молекулярной массе, способности проникать через биологические барьеры, по механизму дей-

ствия, способности к катализу и т.п. [6]. В этой обзорной статье предложена синтетическая классификация, объединяющая большую часть биоантиоксидантов.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ

К ферментативным антиоксидантам относят ферменты, способные в существенной степени подавлять реакции свободнорадикального окисления. Для них характерны высокая специфичность, строго определенная органная и клеточная локализация, а также использование в активном центре металлов переменной валентности.

Супероксиддисмутаза (1.15.1.1). В 1969 г., изучая супероксидингибирующую активность различных субстратов, Дж. МакКорд и И. Фридович [13] впервые описали супероксиддисмутазу (СОД, супероксид-оксидоредуктаза). Позже выяснилось, что СОД имеет несколько изоформ, отличающихся в основном строением активного центра. Структура и свойства этих ферментов в настоящее время всесторонне изучены [14]. Нативные изоформы СОД чрезвычайно устойчивы, они выдерживают прогревание при 100 °С в течение одной минуты и сохраняют каталитическую активность в широком диапазоне pH (от 2 до 12) [15]. Все изоформы СОД катализируют реакцию $2\cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. В настоящее время выделяют следующие изоформы СОД: медь, цинковую форму (Cu- и Zn-СОД), марганцевую форму (Mn-СОД), железосодержащий изофермент (Fe-СОД), экстрацеллюлярную высокомолекулярную форму СОД (Э-СОД).

Каталаза (1.11.1.6). Каталаза катализирует реакцию $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Это гемсодержащий фермент с молекулярной массой около 250 кДа. По структуре каталаза – тетрамер, содержащий по одной связанной гемовой простетической группе на субъединицу [5], при этом сами по себе субъединицы не обладают каталитической активностью. Каталазная активность обнаруживается во всех растениях и микроорганизмах, за исключением облигатных анаэробов [16]. В организме человека и животных максимальное содержание фермента обнаружено

в эритроцитах, а также в печени и почках; концентрация его в мозге, щитовидной железе, половых железах и соединительной ткани мала. В клетках каталаза локализована преимущественно (80%) в пероксисомах [17]. Низкая проницаемость мембран для каталазы и подверженность действию протеолитических ферментов ограничивают ее фармакологическое применение.

Глутатионзависимые ферменты. Пероксидазы катализируют реакцию $2\text{RH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{R}$. Пероксидазы в отличие от каталазы используют в качестве донора водорода органический восстановитель.

Se-содержащая глутатионпероксидаза (1.11.1.9), существование которой обнаружено в 1957 г. [18], служит для инактивации перекиси водорода в клетках высших животных. Показано, что этот фермент представляет собой тетрамер, состоящий из четырех идентичных сферических субъединиц с молекулярной массой около 19 кДа. Каждая субъединица содержит по одному атому селена, входящему в состав селеноцистеиновых остатков; на тетрамер имеются два активных GSH-связывающих центра. У млекопитающих основная часть глутатионпероксидазы (~70%) локализована в цитозоле, и около 20-30% – в митохондриях [19]. Глутатионпероксидаза катализирует реакции:

- восстановления глутатионом нестойких органических гидропероксидов, включая гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот, в стабильные соединения – оксикислоты: $2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$;
- расщепления H_2O_2 : $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$;
- расщепления пероксинитрита: $2\text{GSH} + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{GSSG} + \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$;
- восстановления окисленного глутатиона (GSSG), образующегося в GSH-пероксидазной реакции; осуществляется с участием глутатионредуктазы (1.6.4.2) и систем восстановления НАДФ⁺.

Глутатионтрансфераза (2.5.1.18) – это белки, использующие восстановленный глутатион для конъюгации с гидрофобными соединениями и восстано-

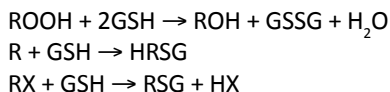
Гудков Сергей Владимирович – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Брусков Вадим Иванович** – д-р хим. наук, профессор, зав. лабораторией изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Куликов Александр Владимирович** – д-р биол. наук, ученый секретарь ИТЭБ РАН. **Бобылёв Александр Геннадьевич** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории структуры и функции мышечных белков ИТЭБ РАН. **Куликов Дмитрий Александрович** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории медико-физических исследований МОНИКИ. **Молочков Антон Владимирович** – д-р мед. наук, профессор, зам. директора МОНИКИ по науке, учебной работе и международным связям.

Для корреспонденции: Гудков Сергей Владимирович – 142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация. Тел.: +7 (4967) 73 94 97. E-mail: s_makariy@rambler.ru

Gudkov Sergey Vladimirovich – PhD, leading scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigation, ITEB of RAS. **Bruskov Vadim Ivanovich** – PhD, Professor, Head of the Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB of RAS. **Kulikov Aleksandr Vladimirovich** – PhD, Scientific Secretary, ITEB of RAS. **Bobylev Aleksandr Gennad'evich** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of Structure and Functions of Muscular Proteins, ITEB of RAS. **Kulikov Dmitriy Aleksandrovich** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of Medical and Physical Investigations, MONIKI. **Molochkov Anton Vladimirovich** – MD, PhD, Professor, Deputy Director on science, educational work and international relations, MONIKI.

Correspondence to: Gudkov Sergey Vladimirovich – 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation. Tel.: +7 (4967) 73 94 97. E-mail: s_makariy@rambler.ru

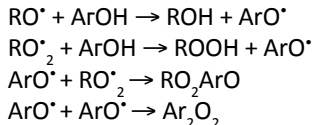
ления органических пероксидов [20]. Глутатионтрансферазы локализованы преимущественно в цитозоле клеток. Основная функция этих ферментов – защита клеток от ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) посредством их восстановления, присоединения к субстрату молекулы глутатиона или нуклеофильного замещения гидрофобных групп:



Глутатионтрансферазы не могут расщеплять H_2O_2 , однако эффективно восстанавливают гидрофобные гидроперекиси с большим объемом молекулы: гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и арахидоновой), фосфолипидов, мононуклеотидов и дезоксирибонуклеиновой кислоты, участвуя тем самым в их репарации [21].

ФЕНОЛЬНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ

К фенольным антиоксидантам относят соединения, имеющие в своей структуре ароматическое кольцо, связанное с одной или несколькими гидроксильными группами (ArOH) [22]. Такие соединения являются перехватчиками перекисных и алкоксильных радикалов в реакциях:



Простые фенольные соединения (C_6 -ряд) – фенол и продукты его гидроксирования. К ним относятся $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ (фенол), изомеры $\text{C}_6\text{H}_5(\text{OH})_2$ – 2-гидроксифенол (пирокатехин), 3-гидроксифенол (резорцин), 4-гидроксифенол (гидрохинон) и изомеры $\text{C}_6\text{H}_5(\text{OH})_3$ – 2,3-дигидроксифенол (пирогаллол), 3,5-дигидроксифенол (флороглюцин), 3,4-дигидроксифенол (оксигидрохинон). Простые фенольные соединения могут встречаться только у растений и только в следовых количествах. Они не являются вторичными метаболитами растений, однако входят в состав ряда эфиров и гликозидов [23].

Оксибензойные кислоты (ряд C_6 - C_1). Эти фенольные соединения кислоты – одни из типичных вторичных метаболитов растений. Наиболее известными представителями являются: оксибензойная, протокатеховая, ванилиновая, галловая, гентизиновая, салициловая, сиреневая кислоты. Кроме того, оксибензойные кислоты входят в структуру эфиров. Некоторые кислоты, как, например, галловая, встречаются в виде димеров [2].

Оксикоричные кислоты (ряд C_6 - C_3). Соединения играют важную роль в обмене веществ и служат био-

генетическими предшественниками подавляющего большинства других фенольных соединений. Наиболее известными представителями являются оксикоричная, кофейная, феруловая и синаповая кислоты. У растений оксикоричные кислоты также представлены в виде эфиров или полимеров. Наиболее известным примером является куркумин, состоящий из двух молекул феруловой кислоты. В тканях ряда животных оксикоричные кислоты могут также возникать в процессе метаболизма полифенолов [24].

Кумарины (ряд C_6 - C_3) отличаются от оксикоричных кислот тем, что боковая трехуглеродная группировка замыкается через атом кислорода в дополнительный шестичленный гетероцикл [24].

Стильбены (ряд C_6 - C_3 - C_6) не являются в полном смысле вторичными метаболитами. Основными представителями служат: ресвератрол, птеростильбен, пиносильвин, рапонтицин [23].

Флавоноиды (ряд C_6 - C_3 - C_6) – самый многочисленный класс природных фенольных соединений. Они представляют собой полифенолы, структурной основой которых служит флавоновое ядро, содержащее два ароматических кольца, соединенных C_3 -мостиком. Флавоноиды можно также рассматривать как производные хромана [25]. В зависимости от структуры ядра выделяют катехины, лейкоантоцианы, антоцианы, флавононы, флавоны, флавонолы, халконы [24]. Флавоноиды широко представлены в овощах, фруктах, цветах, семенах растений, орехах, коре деревьев, и поэтому являются важной составной частью рациона питания животных и человека [26].

Токоферолы. Так же, как и флавоноиды, токоферолы являются производными хромана (6-гидрокси-хроманами с изопреновыми заместителями). С 1926 г. α -токоферол (витамин Е) известен как фактор, содержащийся в высоких концентрациях в семенах пшеницы и масле семян салата, предотвращающий стерильность крыс, питавшихся прогорклыми липидами [27]. В чистом виде первые два токоферолы – α и β – были выделены из зародышей пшеницы в 1936 г. [28]. Витамин Е имеет четыре формы, проявляющие антиоксидантную активность: токоферолы α , β , γ и δ [29]. Токоферолы эффективно элиминируют: супероксидный анион-радикал, синглетный кислород, пероксирадикалы, ОН-радикал, индуцированные $\text{ROO}^\bullet$ и ОН-радикалами процессы ПОЛ и окисление липидов низкой плотности [23].

МИМЕТИКИ ФЕРМЕНТОВ

Миметики ферментов – это, как правило, небольшие соединения, обладающие каталитическими свойствами, аналогичными свойствам ферментов. В настоящее время известны миметики таких ферментов, как СОД, каталаза и глутатионпероксидаза. Большинство из них являются миметиками СОД [30].

По большей части они представляют собой марганец-органические комплексы. Первая группа миметиков СОД включает в себя ряд макроциклических соединений на основе марганца: М40401, М40403 и М40419 [31, 32, 33]. Второй класс представляет собой марганец-соединения на основе металлопорфиринов: АЕОЛ-10113 и АЕОЛ-10150 [30, 33]. Третий класс миметиков СОД – это, как правило, ароматические соединения с этилен- и диамин-заместителями, образующие комплексы с марганцем. Ярким примером служит ЕУК134 [34]. Они обладают также некоторой второстепенной каталитической активностью и могут разлагать перекись водорода и пероксинитрит [35].

Финансирование

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 13-04-00730-а.

Литература

1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика»; 2001. [Zenkov N.K., Lan-kin V.Z., Men'shchikova E.B. Oxidative stress: biochemical and pathophysiological aspects. Moscow: MAIK «Nauka/Interperiodika»; 2001 (in Russian)].
2. Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б., Проценко А.Е. Фенольные биоантиоксиданты. Новосибирск: СО РАМН; 2003. [Zenkov N.K., Kandalintseva N.V., Lan-kin V.Z., Men'shchikova E.B., Prosenko A.E. Phenolic bio-antioxidants. Novosibirsk: SO RAMN; 2003 (in Russian)].
3. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиокси-данты. Минск: Издательство БГУ; 2004. [Kostyuk V.A., Pota-povich A.I. Bioradicals and bioantioxidants. Minsk: Izdate'lstvo BGU; 2004 (in Russian)].
4. Барабой В.А. Биоантиоксиданты. М.: Книга плюс; 2006. [Baraboy V.A. Bioantioxidants. Moscow: Kniga plyus; 2006 (in Russian)].
5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Кру-говых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксидан-ты и антиоксиданты. М.: Слово; 2006. [Men'shchikova E.B., Lan-kin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A. Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants. Moscow: Slovo; 2006 (in Russian)].
6. Агабейли Р.А. Биоантиоксиданты: роль в генетической устой-чивости и охране биоразнообразия. Баку: Элм; 2008. [Agabeyli R.A. Bioantioxidants: role in genetic stability and preservation of biovariety. Baku: Elm; 2008 (in Russian)].
7. Попова Н.Р., Гудков С.В., Брусков В.И. Природные пуриновые соединения как радиозащитные средства. Радиационная биология. Радиоэкология 2014;54(1):38-49. [Popova N.R., Gud-kov S.V., Bruskov V.I. Natural purine compounds as radioprotective agents. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya 2014;54(1): 38-49 (in Russian)].
8. Chernikov A.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V. Heat-induced formation of nitrogen oxides in water. J Biol Phys 2013;39(4):687-99.
9. Bruskov V.I., Karp O.E., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Cherni-kov A.V., Gudkov S.V. Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation and their genotoxic action. Free Radic Res 2012;46(10):1280-90.
10. Гудков С.В., Карп О.Э., Гармаш С.А., Иванов В.Е., Черников А.В., Манохин А.А., Асташев М.Е., Ягужинский Л.С., Брусков В.И. Образование активных форм кислорода в воде под воздей-ствием видимого и инфракрасного излучения в полосах по-глощения молекулярного кислорода. Биофизика 2012;57(1): 5-13. [Gudkov S.V., Karp O.E., Garmash S.A., Ivanov V.E., Cherni-kov A.V., Manokhin A.A., Astashev M.E., Yaguzhinskiy L.S., Brus-kov V.I. Production of reactive oxygen forms in water under the influence of visual and infra-red radiation in lines of the molecular oxygen absorption. Biofizika 2012;57(1):5-13 (in Russian)].
11. Gudkov S.V., Bruskov V.I., Astashev M.E., Chernikov A.V., Yaguzhinskiy L.S., Zakharov S.D. Oxygen-dependent autooscil-lations of water luminescence triggered by the 1264 nm radiation. J Phys Chem B 2011;115(23):7693-8.
12. Гудкова О.Ю., Гудков С.В., Гапеев А.Б., Брусков В.И., Рубаник А.В., Чемерис Н.К. Исследование механизмов образования актив-ных форм кислорода в водных растворах под действием им-пульсного электромагнитного излучения крайне высоких частот с большой пиковой мощностью. Биофизика 2005; 50(5):773-9. [Gudkova O.Yu., Gudkov S.V., Gapeev A.B., Brus-kov V.I., Rubanik A.V., Chemeris N.K. Studying the mechanisms of the reactive oxygen forms production in aqueous solutions under the influence of impulse electromagnetic radiation of extremely high frequencies with large peak power. Biofizika 2005;50(5):773-9 (in Russian)].
13. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244(22):6049-55.
14. Bafana A., Dutt S., Kumar S., Ahuja P.S. Superoxide dismutase: an industrial perspective. Crit Rev Biotechnol 2011;31(1):65-76.
15. Побережкина Н.Е., Лосинская Л.Ф. Биологическая роль супер-оксиддисмутазы. Украинский биохимический журнал 1989; 61(2):14-27. [Poberezkina N.E., Losinskaya L.F. Biological role of super-peroxide-dismutase. Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal 1989;61(2):14-27 (in Russian)].
16. Никольская Е.А., Синявская О.И. Каталазы, выделяемые микроорганизмами. Микробиология 1984;46(4):83-93. [Nikolskaya E.A., Sinyavskaya O.I. Catalases excreted by microorganisms. Mikrobiologiya 1984;46(4):83-93 (in Russian)].
17. Fernandez V., Videla L.A. Biochemical aspects of cellular antioxidant systems. Biol Res 1996;29(2):177-82.
18. Mills G.C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxida-tive breakdown. J Biol Chem 1957;229(1):189-97.
19. Логинов А.С., Матюшин Б.Н., Ткачев В.Д., Якимчук Г.Н. Новый подход к диагностике холестаза по активности медьсодержа-щих ферментов. Терапевтический архив 1993;(2):34-6. [Logi-nov A.S., Matyushin B.N., Tkachev V.D., Yakimchuk G.N. A new approach to cholestasis diagnosis based on the activity of the copper-containing enzymes. Terapevticheskiy arkhiv 1993;(2): 34-6 (in Russian)].
20. Pearson W.R. Phylogenies of glutathione transferase families. Methods Enzymol 2005;401:186-204.
21. Гудков С.В., Брусков В.И. Гуанозин и инозин (рибоксин). Анти-оксидантные и радиозащитные свойства. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2011. [Gudkov S.V., Bruskov V.I. Guanosine and inosine (riboxin). Antioxidant and radioprotective properties. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2011 (in Russian)].
22. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты: реакционная спо-собность и эффективность. М.: Наука; 1988. [Roginskiy V.A. Phenolic antioxidants: reactive capacity and effectiveness. Moscow: Nauka; 1988 (in Russian)].
23. Гудков С.В. Механизмы образования активных форм кислоро-да под влиянием физических факторов и их генотоксическое действие [диссертация]. Пушкино: ИТЭБ РАН; 2012. [Gudkov S.V. The mechanisms of the reactive oxygen species production under the influence of physical factors and their genotoxic activity [dissertation]. Pushchino: ITEB RAS; 2012 (in Russian)].
24. Кретович В.Л. Биохимия растений. М.: Высшая школа; 1980. [Kretovich V.L. Plant biochemistry. Moscow: Vysshaya shkola; 1980 (in Russian)].
25. Terao J., Mukai R. Prenylation modulates the bioavailability and bioaccumulation of dietary flavonoids. Arch Biochem Biophys 2014;pii:S0003-9861(14)00125-8. [Epub ahead of print].
26. Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal 2013;162750.
27. Pekmezci D. Vitamin E and immunity. Vitam Horm 2011;86: 179-215.

28. Evans H., Emerson O., Emerson G. The isolation from wheat germ of an alcohol α -tocopherol. *J Biol Chem* 1936;113:319-25.
29. Jiang Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med* 2014;72C:76-90. [Epub ahead of print].
30. Rahman I. Antioxidant therapeutic advances in COPD. *Ther Adv Respir Dis* 2008;2(6):351-74.
31. Salvemini D., Wang Z.Q., Zweier J.L., Samouilov A., Macarthur H., Misko T.P., Currie M.G., Cuzzocrea S., Sikorski J.A., Riley D.P. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 1999;286(5438):304-6.
32. Muscoli C., Sacco I., Alecci W., Palma E., Nisticò R., Costa N., Clementi F., Rotiroli D., Romeo F., Salvemini D., Mehta J.L. The protective effect of superoxide dismutase mimetic M40401 on balloon injury-related neointima formation: role of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:44-50.
33. Thompson J.S., Chu Y., Glass J., Tapp A.A., Brown S.A. The manganese superoxide dismutase mimetic, M40403, protects adult mice from lethal total body irradiation. *Free Radic Res* 2010;44(5):529-40.
34. Chatterjee P.K., Patel N.S., Kvale E.O., Brown P.A., Stewart K.N., Mota-Filipe H., Sharpe M.A., Di Paola R., Cuzzocrea S., Thiemermann C. EUK-134 reduces renal dysfunction and injury caused by oxidative and nitrosative stress of the kidney. *Am J Nephrol* 2004;24(2):165-77.
35. Sharpe M.A., Ollosson R., Stewart V.C., Clark J.B. Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics. *Biochem J* 2002;366(Pt 1):97-107.

БИОАНТИОКСИДАНТЫ (часть 2)

Гудков С.В.^{1,2,3}, Брусков В.И.^{1,2}, Куликов А.В.¹, Шарапов М.Г.^{2,4}, Куликов Д.А.^{1,5}, Молочков А.В.⁵

¹ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук; 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация

²Пушчинский государственный естественно-научный институт; 142290, Московская обл., г. Пущино, пр-кт Науки, 3, Российская Федерация

³ФГБУН «Институт общей физики им. А.М. Прохорова» Российской академии наук; 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 38, Российская Федерация

⁴ФГБУН «Институт биофизики клетки» Российской академии наук; 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация

⁵ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

На основе анализа последних научных данных представлена синтетическая классификация известных биоантиоксидантов, рассмотрены особенности их строения и функционирования. Во второй части описаны серосодержащие соединения, хелаторы ионов металлов переменной валентности, соединения, содержащие гидроксильную или аминогруппу, а также наночастицы.

Ключевые слова: антиоксиданты, окислительный стресс, активные формы кислорода.

THE BIOANTIOXIDANTS (part 2)

Gudkov S.V.^{1,2,3}, Bruskov V.I.^{1,2}, Kulikov A.V.¹, Sharapov M.G.^{2,4}, Kulikov D.A.^{1,5}, Molochkov A.V.⁵

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS; 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

²Pushchino State Scientific Institute; 3 Prospekt Nauki, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

³A.M. Prokhorov General Physics Institute of RAS; 38 Vavilova ul., 119991 Moscow, Russian Federation

⁴Institute of Cell Biophysics of RAS; 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

⁵Moscow Regional Research and Clinical Institute; 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

Based on the analysis of the latest scientific data, the paper suggests a synthetic classification of the known bioantioxidants, peculiarities of their structure and functioning. The second part of the review describes the sulfur-containing compounds, chelators of the metal ions of variable valency, compounds containing hydroxyl or amino group, and nanoparticles.

Keywords: antioxidants, oxidative stress, reactive oxygen species.

SH-СОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Важную роль в антиоксидантной защите организма играют легкоокисляющиеся пептиды, в состав которых входят SH-содержащие аминокислоты. Им принадлежит ведущая роль в защите клеток от OH-радикала, образующегося в реакции Фентона или в результате радиолитического распада молекул воды под воздействием ионизирующего излучения.

Глутатион – трипептид, образованный аминокислотами цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. Глутатион занимает первое место среди органических соединений по содержанию в клетках эукариот, он обнаруживается даже в миллимолярной концентрации [1]. Уровень глутатиона в плазме здоровых людей в восстановленной форме (GSH) – $4,50 \pm 0,65$ ммоль, в окисленной (GSSG) – $0,19 \pm 0,12$ ммоль [2]. Основным антиоксидантным эффектом глутатиона реализуется посредством его участия в работе ферментативных антиоксидантов. Являясь субстратом для глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, глутатион выступает донором атомов водорода для нейтрализации H_2O_2 и липидных перекисей [2]. Вместе с тем GSH, как и другие SH-содержащие белки, является ингибитором активных форм кислорода (АФК) и стабилизатором мембран [3, 4].

Тиоредоксины – низкомолекулярные белки, имеющие активный дитиол/дисульфидный участок и проявляющие оксидоредуктазную активность [1]. В семейство редоксинов входят: тиоредоксин, тиоредоксин 2, тиоредоксинподобный белок, глутаредоксин 1, глутаредоксин 2, нуклеоредоксин, тиоредоксинподобный трансмембранный белок, протеиндисульфидизомераза, кальцийсвязывающий белок 1, фосфолипаза C- α [5].

Пероксиредоксины (Prx) – белки с молекулярным весом 20-30 кДа. Они могут иметь различную локализацию в клетке [6]. Пероксиредоксины способны восстанавливать гидропероксиды как органической, так и неорганической природы [7]. Все пероксиредоксины имеют общую тиоредоксиновую укладку, и их трехмерная структура довольно

консервативна, несмотря на отличия в аминокислотной последовательности. Значительные структурные различия между разными представителями семейства пероксиредоксинов наблюдаются на уровне четвертичной структуры. Так, 1-Cys Prx – это гомодимеры, атипичные 2-Cys Prx – мономерные формы фермента, в то время как типичные 2-Cys Prx могут быть гомодимерами или олигомерами (декамерами) [8].

Металлотионеин – низкомолекулярный белок-антиоксидант. Первичная структура представлена 60 аминокислотами, из которых одна треть – это аминокислотные остатки цистеина [9].

SH-содержащие аминокислоты. К ним относятся цистеин, цистин, N-ацилцистеин. Все SH-содержащие аминокислоты крайне активны в окислительно-восстановительном плане и способны защищать клетки млекопитающих от повреждающего эффекта различных АФК. В медицинской практике используется только N-ацилцистеин.

ХЕЛАТОРЫ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ ПЕРЕМЕННОЙ ВАЛЕНТНОСТИ

В присутствии металлов переменной валентности усиливается образование высокореакционных гидроксильного и алкоксильного радикалов: $ROOH + Me^{n+} \rightarrow RO^{\cdot} + OH^{\cdot} + Me^{(n+1)+}$. Поэтому хелатные соединения, связывающие ионы металлов переменной валентности и тем самым препятствующие их вовлечению в реакции разложения перекисей, представляют собой важный компонент антиоксидантной защиты организма [1]. Считается, что хелаторы являются главными компонентами в защите от окисления сывороточных белков и клеточных рецепторов [3].

Сидерофилины. К ним обычно относят трансферрин, сывороточный трансферрин, лактоферрин, овотрансферрин, меланотрансферрин, ферритин, гемосидерин [1].

Церулоплазмин (1.16.3.1) – главный медьсодержащий фермент (134 кДа) внеклеточных жидкостей млекопитающих, связывающий 90-95% сыво-

Гудков Сергей Владимирович – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Брусков Вадим Иванович** – д-р хим. наук, профессор, зав. лабораторией изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Куликов Александр Владимирович** – д-р биол. наук, ученый секретарь ИТЭБ РАН. **Шарапов Марс Галиевич** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории механизмов рецепции ИБК РАН. **Куликов Дмитрий Александрович** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории медико-физических исследований МОНИКИ. **Молочков Антон Владимирович** – д-р мед. наук, профессор, зам. директора МОНИКИ по науке, учебной работе и международным связям.

Для корреспонденции: Гудков Сергей Владимирович – 142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация. Тел.: +7 (4967) 73 94 97. E-mail: s_makariy@rambler.ru

Gudkov Sergey Vladimirovich – PhD, leading scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigation, ITEB of RAS. **Bruskov Vadim Ivanovich** – PhD, Professor, Head of the Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB of RAS. **Kulikov Aleksandr Vladimirovich** – PhD, Scientific Secretary, ITEB of RAS. **Sharapov Mars Galievich** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of the Reception Mechanisms, ICB of RAS. **Kulikov Dmitry Aleksandrovich** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of Medico-Physical Investigations, MONIKI. **Molochkov Anton Vladimirovich** – MD, PhD, Professor, Deputy Director on science, educational work and international relations, MONIKI.

Correspondence to: Gudkov Sergey Vladimirovich – 3 Institutsкая ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation. Тел.: +7 (4967) 73 94 97. E-mail: s_makariy@rambler.ru

роточной меди. В плазме крови человека церулоплазмин находится преимущественно в виде полипептидного мономера (около 1000 аминокислотных остатков), состоящего из трех почти полностью идентичных фрагментов по 42-45 кДа каждый [10]. Каждая его молекула содержит шесть прочно связанных атомов Cu^{2+} [11]. Церулоплазмин проявляет каталитическую активность в отношении большого числа субстратов, он эффективно окисляет ионы Fe^{2+} , аскорбиновую кислоту, фенолы, амины, катехолы, являясь одновременно ферро-, аскорбат- и аминоксидазой [12]. В физиологических условиях этот белок на порядок более эффективно захватывает OS1^- , чем трансферрин, альбумин, супероксиддисмутаза или IgG. Церулоплазмин также эффективно элиминирует ряд АФК [3].

СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИДРОКСИЛЬНУЮ ИЛИ АМИНОГРУППУ

Гистидинсодержащие дипептиды. В этот класс химических соединений входят карнозин, анзерин и гомокарнозин. Все они являются природными гидрофильными антиоксидантами. По антиоксидантной активности карнозин и анзерин равно эффективны, гомокарнозин проявляет менее выраженный эффект. Карнозин способен взаимодействовать с синглетным кислородом, гидроксильным радикалом, перекисью водорода и гипохлоритом [13].

Олигопептиды. В настоящее время охарактеризованы существенные антиоксидантные свойства виллона (Lys-Glu), везугена (Lys-Glu-Asp), пинеалона (Glu-Asp-Arg), хонлутена (Glu-Asp-Gly), овагена (Glu-Asp-Leu), кристагена (Glu-Asp-Pro), эпیتالона (Ala-Glu-Asp-Gly) и карталакса (Ala-Glu-Asp) [3].

Нуклеозиды и их производные. В настоящее время охарактеризованы антиоксидантные свойства инозина, гуанозина, аденозина, инозин- и гуанозинмонофосфата, ксантозина и т.п. [14, 15, 16, 17, 18, 19].

Мелатонин – гормон эпифиза, который синтезируется из серотонина в ночное время суток. Помимо своей основной функции мелатонин обладает выраженными антиоксидантными свойствами. Он наиболее эффективно по сравнению с другими антиоксидантами элиминирует $\text{OH}^\bullet$ -радикалы [20]. Высокая $\text{OH}^\bullet$ -ингибирующая активность этого соединения определяется его структурой и наличием метоксигруппы в положении пятого бензольного кольца. Установлена высокая эффективность мелатонина против NO -радикалов, пероксинитрита, синглетного кислорода [1]. Выявлено, что мелатонин *in vivo* эффективно защищает от окислительного повреждения липиды и нуклеиновые кислоты, обладает антиканцерогенным и радиопротекторным свойством [21].

Каротиноиды. В настоящий момент выделено и охарактеризовано более 600 различных каротиноидов, среди которых наиболее изученным и часто встречающимся является β -каротин. Молекулы всех каротиноидов имеют в своей структуре полиеновую цепь с чередующимися двойными связями, однако их концевые группы могут отличаться. К каротиноидам относятся ликопины, параксантины, лютеины, ксантофиллы [22]. Каротиноиды являются эффективными антиоксидантами и тушителями синглетного кислорода ($^1\text{O}_2 + \beta\text{-каротин} \rightarrow \text{O}_2 + {}^3(\beta\text{-каротин})$) [23].

Витамин С (аскорбиновая кислота) – наиболее важный антиоксидант плазмы крови человека, его содержание в плазме в норме составляет 20-60 мкмоль [24]. Многие клетки имеют механизмы активного транспорта аскорбиновой кислоты, реализованные преимущественно через глюкозный транспортер, поэтому в клетках аскорбат может накапливаться в миллимолярных концентрациях [25]. Витамин С обнаружен практически во всех тканях млекопитающих, однако больше всего его содержится в надпочечниках, гипофизе и вилочковой железе; в меньшей степени он представлен в печени, селезенке, поджелудочной железе и головном мозге [3]. В биологических субстратах аскорбиновая кислота обладает чрезвычайно широким спектром антиоксидантных свойств, в число элиминируемых ею АФК входят: HOCl , супероксид анион-радикал, синглетный кислород, $\text{HO}_2^\bullet$, $\text{RO}_2^\bullet$, гидроксильный радикал [1]. Кроме того, витамин С обезвреживает нитрозамины и озон [26].

НАНОЧАСТИЦЫ

Фуллерены являются одной из аллотропных форм чистого углерода. Молекулы фуллеренов состоят только из атомов углерода и представляют собой каркасные сферические структуры, характеризующиеся наличием системы делокализованных π -электронов и сопряженных двойных связей. Наиболее изученным представителем семейства фуллеренов является бакминстерфуллерен, или фуллерен C_{60} [27]. Фуллерен C_{60} , а также некоторые его водорастворимые производные обладают мощными антиоксидантными свойствами. Способность фуллеренов взаимодействовать со свободными радикалами известна давно [28]. В системах *in vitro* фуллерены могут взаимодействовать с гидроксильным радикалом [29], супероксид анион-радикалом, синглетным кислородом и бикарбонатным радикалом [30]. Кроме прямого перехвата АФК фуллерены могут уменьшать окислительную нагрузку путем ингибирования NO -синтазы [31]. Долгое время считалось, что мощная антирадикальная активность

фуллеренов определяется электронодефицитными свойствами системы 30 сопряженных двойных связей, что делает молекулу C_{60} весьма эффективным акцептором свободных радикалов. Благодаря тому, что в отличие от многих известных антиоксидантов молекула C_{60} теоретически может связать 60 свободных радикалов, фуллерен получил название «губки для радикалов» [28].

Углеродные нанотрубки. Атомы углерода в нанотрубках находятся в sp^2 -гибридизованном состоянии. Изначально по аналогии с фуллеренами предполагалось, что из-за такой особенности строения углеродные нанотрубки будут проявлять антиоксидантные свойства [3, 32]. Существует небольшое количество работ о потенциальных антиоксидантных свойствах нанотрубок. Так, обнаружено, что одностенные [33] и многостенные [34] нанотрубки проявляют существенные антиоксидантные свойства, нейтрализуя преимущественно гидроксильный и супероксид анион-радикал. В настоящее время создаются химически модифицированные углеродные нанотрубки, которые также проявляют антиоксидантные свойства [35]. Существует большое количество работ, где показана их цитотоксичность и яркие прооксидантные свойства [36]. В целом вопрос адекватности применения углеродных нанотрубок в качестве антиоксидантов на моделях *in vivo* остается открытым, что, безусловно, связано с отсутствием в большинстве статей информации о физико-химических и химико-аналитических характеристиках препаратов нанотрубок [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги, следует отметить, что с каждым годом становится известным все большее количество отдельных антиоксидантов и их групп. Будущее исследований в области антиоксидантов и интерес к ним связаны с решением как фундаментальных, так и прикладных, в том числе и медицинских, проблем. Фундаментальные проблемы в рассматриваемой области прежде всего связаны с исследованием роли антиоксидантов в сигнальных системах клетки, адаптации, экспрессии генов, их влияния на стабильность генома, действия в малых дозах, неканонических антиоксидантных механизмов и т.д. Прикладные исследования в основном сосредоточены в областях коррекции свободнорадикальных патологий, использовании антиоксидантов при защите от продолжительного действия низкоинтенсивного ионизирующего излучения, разработке консервантов, пищевых добавок и т.д. Область исследований, связанных с биоантиоксидантами, бурно развивается, в ней следует ожидать новых открытий, которые могут полностью изменить существую-

ющую классификацию. Однако пока этого не произошло, предлагаем читателям пользоваться классификацией, предложенной в этой работе.

Финансирование

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 13-04-00730-а.

Литература

1. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово; 2006. [Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A. Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants. Moscow: Slovo; 2006 (in Russian)].
2. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы. Успехи современной биологии 1989;107(2):179-94. [Kolesnichenko L.S., Kulinskiy V.I. Glutathionoxidase. Uspekhi sovremennoy biologii 1989;107(2):179-94 (in Russian)].
3. Гудков С.В. Механизмы образования активных форм кислорода под влиянием физических факторов и их генотоксическое действие [диссертация]. Пушкино: ИТЭБ РАН; 2012. [Gudkov S.V. The mechanisms of the reactive oxygen species production under the influence of physical factors and their genotoxic activity [dissertation]. Pushchino: ITEB RAS; 2012 (in Russian)].
4. Гудков С.В., Брусков В.И. Гуанозин и инозин (рибоксин). Антиоксидантные и радиозащитные свойства. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2011. [Gudkov S.V., Bruskov V.I. Guanosine and inosine (ribosin). Antioxidant and radioprotective properties. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2011 (in Russian)].
5. Collet J.F., Messens J. Structure, function, and mechanism of thio-redoxin proteins. Antioxid Redox Signal 2010;13(8):1205-16.
6. Seo M.S., Kang S.W., Kim K., Baines I.C., Lee T.H., Rhee S.G. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. J Biol Chem 2000;275(27):20346-54.
7. Wood Z.A., Poole L.B., Karplus P.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. Science. 2003; 300(5619):650-3.
8. Hanschmann E.M., Godoy J.R., Berndt C., Hudemann C., Lillig C.H. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. Antioxid Redox Signal 2013;19(13):1539-605.
9. Sharma S., Rais A., Sandhu R., Nel W., Ebadi M. Clinical significance of metallothioneins in cell therapy and nanomedicine. Int J Nanomedicine 2013;8:1477-88.
10. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Runova O.L., Gorudko I.V., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M. Pro-atherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase. Chem Phys Lipids 2014;180:72-80.
11. Sokolov A.V., Solovyov K.V., Kostevich V.A., Chekanov A.V., Pulina M.O., Zakharova E.T., Shavlovski M.M., Panasenko O.M., Vasilyev V.B. Protection of ceruloplasmin by lactoferrin against hydroxyl radicals is pH dependent. Biochem Cell Biol 2012;90(3): 397-404.
12. Giurgea N., Constantinescu M.I., Stanciu R., Suciu S., Muresan A. Ceruloplasmin – acute-phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease. Med Sci Monit 2005;11(2):RA48-51.
13. Болдырев А.А. Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине. М.: Издательство МГУ; 1998 [Boldyrev A.A. Carnosin. Biological significance and possibilities of medical application. Moscow: Izdatel'stvo MGU; 1998 (in Russian)].
14. Гудков С.В., Штаркман И.Н., Смирнова В.С., Черников А.В., Брусков В.И. Гуанозин и инозин как природные антиоксиданты и радиопротекторы для мышей при действии летальных доз γ -облучения. Доклады Академии наук 2006;

- 407(1):115-8. [Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Smirnova V.S., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Guanosine and inosine as natural antioxidants and radioprotectors for mice under lethal doses of γ -radiation. Doklady Akademii nauk 2006;407(1):115-8 (in Russian)].
15. Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Smirnova V.S., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. Radiat Res 2006;165(5):538-45.
16. Гудков С.В., Гудкова О.Ю., Штаркман И.Н., Гапеев А.Б. Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток крови мышей при воздействии рентгеновского излучения. Радиационная биология. Радиоэкология 2006;46(6):713-8. [Gudkov S.V., Gudkova O.Yu., Shtarkman I.N., Gapeev A.B. Guanosine and inosine as natural genoprotectors for mice blood cells under X-ray radiation. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya 2006;46(6):713-8 (in Russian)].
17. Асадуллина Н.Р., Гудков С.В., Брусков В.И. Антиоксидантные свойства ксантозина при воздействии рентгеновского излучения. Фундаментальные исследования 2011;(10):22-5. [Asadullina N.R., Gudkov S.V., Bruskov V.I. Antioxidant properties of Xantosine under X-ray radiation. Fundamentalnye issledovaniya 2011;(10):22-5 (in Russian)].
18. Asadullina N.R., Usacheva A.M., Gudkov S.V. Protection of mice against X-ray injuries by the post-irradiation administration of inosine-5'-monophosphate. J Radiat Res 2012;53(2):211-6.
19. Попова Н.Р., Гудков С.В., Брусков В.И. Природные пуриновые соединения как радиозащитные средства. Радиационная биология. Радиоэкология 2014;54(1):38-49. [Popova N.R., Gudkov S.V., Bruskov V.I. Natural purine compounds as radioprotective agents. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya 2014;54(1):38-49 (in Russian)].
20. Tan D.-X., Chen L.D., Poeeggeler B., Manchester L.C., Reiter R.J. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocr J 1993;1:57-60.
21. Salucci S., Burattini S., Battistelli M., Baldassarri V., Curzi D., Valmori A., Falcieri E. Melatonin prevents chemical-induced haemopoietic cell death. Int J Mol Sci 2014;15(4):6625-40.
22. Jucker W. Carotenoids. Chimia (Aarau) 2011;65(1-2):109-10.
23. Bolhassani A., Khavari A., Bathaie S.Z. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. Biochim Biophys Acta 2014;1845(1):20-30.
24. Halliwell B., Gutteridge J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 1990;280(1):1-8.
25. Chambial S., Dwivedi S., Shukla K.K., John P.J., Sharma P. Vitamin C in disease prevention and cure: An overview. Indian J Clin Biochem 2013;28(4):314-28.
26. Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. J Am Coll Nutr 2003;22(1):18-35.
27. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. СПб.: Росток; 2006. [Piotrovskiy L.B., Kiselev O.I. Fullerenes in Biology. Saint Petersburg: Rostok; 2006 (in Russian)].
28. Krusic P.J., Wasserman E., Keizer P.N., Morton J.R., Preston K.F. Radical reactions of c60. Science 1991;254(5035):1183-5.
29. Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostructures in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med 2009;47(6):786-93.
30. Bensasson R.V., Brettreich M., Frederiksen J., Göttinger H., Hirsch A., Land E.J., Leach S., McGarvey D.J., Schönberger H. Reactions of e(-)(aq), CO(2)(*)(-), HO(*), O(2)(*)(-) and O(2)((1) delta(g)) with a dendro[60]fullerene and C(60)[C(COOH)(2)](n) (n = 2-6). Free Radic Biol Med 2000;29(1):26-33.
31. Wolff D.J., Barbieri C.M., Richardson C.F., Schuster D.I., Wilson S.R. Trisamine C(60)-fullerene adducts inhibit neuronal nitric oxide synthase by acting as highly potent calmodulin antagonists. Arch Biochem Biophys 2002;399(2):130-41.
32. Engel P.S., Billups W.E., Abmayr D.W. Jr., Tsvaygboym K., Wang R. Reaction of single-walled carbon nanotubes with organic peroxides. J Phys Chem C 2008;112(3):695-700.
33. Lucente-Schultz R.M., Moore V.C., Leonard A.D., Price B.K., Kosynkin D.V., Lu M., Partha R., Conyers J.L., Tour J.M. Antioxidant single-walled carbon nanotubes. J Am Chem Soc 2009; 131(11):3934-41.
34. Fenoglio I., Tomatis M., Lison D., Muller J., Fonseca A., Nagy J.B., Fubini B. Reactivity of carbon nanotubes: free radical generation or scavenging activity? Free Radic Biol Med 2006;40(7):1227-33.
35. Cirillo G., Hampel S., Klingeler R., Puoci F., Iemma F., Curcio M., Parisi O.I., Spizzirri U.G., Picci N., Leonhardt A., Ritschel M., Büchner B. Antioxidant multi-walled carbon nanotubes by free radical grafting of gallic acid: new materials for biomedical applications. J Pharm Pharmacol 2011;63(2):179-88.
36. Galano A. Carbon nanotubes: promising agents against free radicals. Nanoscale 2010;2(3):373-80.
37. Hsieh S.F., Bello D., Schmidt D.F., Pal A.K., Rogers E.J. Biological oxidative damage by carbon nanotubes: fingerprint or footprint? Nanotoxicology 2012;6(1):61-76.

ВЛИЯНИЕ КАЧЕСТВА ООЦИТОВ И СОСТОЯНИЯ ОВАРИАЛЬНОГО РЕЗЕРВА НА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПАЦИЕНТОК ПОЗДНЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Крстич Е.В.¹, Крстич М.^{2,3}, Юдаев В.Н.^{2,4}

¹ООО «Клиника здоровья» группы компаний «Мать и дитя»; 127015, г. Москва, ул. Бутырская, 46/2, Российская Федерация

²ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

³Клиника «Семейная» ООО «Сеть семейных медицинских центров»; 105120, г. Москва, ул. Сергея Радонежского, 5/2, стр. 1, Российская Федерация

⁴ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»; 101000, г. Москва, ул. Покровка, 22а, Российская Федерация

Обсуждается влияние качества ооцитов и состояния овариального резерва на терапевтический потенциал экстракорпорального оплодотворения у женщин позднего репродуктивного возраста. Обоснована роль возрастного фактора в снижении фертильности и уменьшении вероятности успешного зачатия.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, ооциты, овариальный резерв.

EFFECT OF OOCYTES QUALITY AND OVARIAN RESERVE ON THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF IN VITRO FERTILIZATION IN PATIENTS OF LATE REPRODUCTIVE AGE

Krstic E.V.¹, Krstic M.^{2,3}, Yudaev V.N.²

¹LLC Clinic of Health, group of companies "Mother and Child"; 46/2 Butyrskaya ul., 127015 Moscow, Russian Federation

²Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

³Family Clinic, Ltd., the Net of Family Centers; 5/2 s.1 Sergiya Radonezhskogo ul., 105120 Moscow, Russian Federation

⁴Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology; 22a Pokrovka ul., 101000 Moscow, Russian Federation

The paper discusses the interference of the quality of oocytes and ovarian reserve status in the therapeutic potential of *in vitro* fertilization in women of late reproductive age. It was substantiated that the age factor decreased both female fertility and possibility of the successful fertilization.

Key words: *in vitro* fertilization, oocytes, ovarian reserve.

Во всех сообщениях о влиянии возрастного фактора на результаты экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) указывается на существенное снижение терапевтической эффективности данной процедуры у женщин старшей репродуктивной группы. Частота наступления беременности (ЧНБ) в группе пациенток 37-44 лет составляет 18,5% против 41% у более молодых женщин [1, 2, 3].

Согласно современным представлениям, возрастной фактор снижает фертильность и уменьшает вероятность успешного зачатия при использовании ЭКО в основном вследствие ухудшения качества созревающих ооцитов, происходящего на

фоне прогрессирующей редукции овариального резерва. Наблюдаемое сокращение провоцирует при использовании ЭКО ослабленную реакцию (бедный ответ) яичников на применяемые стимуляторы суперовуляции, в качестве которых используют экзогенные гонадотропины или препараты, обуславливающие возрастание эндогенного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) [2]. С учетом очевидной негативной значимости ухудшения качества ооцитов и редукции овариального резерва для результатов ЭКО мы представляем более подробную патогенетическую характеристику этих факторов.

Снижение качества ооцитов в позднем репродуктивном возрасте

Результаты цитогенетического анализа ооцитов, полученных от пациенток разных возрастных групп, указывают на рост частоты их дегенеративных форм у женщин старше 35 лет. В таких ооцитах могут обнаруживаться деформация и лизис структурных компонентов, фрагментация и вакуолизация ядра и другие визуально определяемые признаки клеточной дегенерации.

При инсеминации ооцитов возрастных пациенток отмечается, с одной стороны, снижение их оплодотворяемости на 30–40% от уровня, регистрируемого у молодых женщин, а с другой – учащение образования полиплоидов с 4,7% в возрасте 26–30 лет до 12,4% у лиц старше 40 лет. Полиплоидию связывают с результатом дигении (диандрии) и/или нарушением блока полиспермии [4].

Следует подчеркнуть, что наличие многих хромосомных аномалий (трисомий, моносомий, хромосомных aberrаций) далеко не всегда сказывается на фенотипе женских гамет и полученных из них эмбрионов, т.е. не позволяет выявлять их визуально [3, 5]. На практике это приводит к тому, что в программе ЭКО часть переносимых эмбрионов имеет скрытые (визуально нераспознаваемые) дефекты. Последствием переноса таких эмбрионов становится либо их неспособность к имплантации, либо (при успешном зачатии) нарушение развития, провоцирующее репродуктивные потери, в особенности на ранних сроках беременности. У пациенток позднего репродуктивного возраста, по сравнению с более молодыми женщинами, в программе ЭКО отмечается как уменьшение частоты имплантации переносимых эмбрионов, так и рост частоты ранних репродуктивных потерь, что косвенно указывает на увеличение с возрастом в женских гаметах разного рода скрытых генетических аномалий, не выявляемых *in vitro* ни визуально, ни с помощью существующих сегодня методов преимплантационной генетической диагностики [6].

Заслуживает внимания тот факт, что применение в программе ЭКО полученных от молодых женщин донорских ооцитов сопровождается

у возрастных пациенток увеличением частоты имплантации и уменьшением ранних репродуктивных потерь по сравнению с их сверстницами, у которых в процедуре ЭКО используются собственные ооциты [7, 8]. Очевидно, что эти наблюдения также указывают на возрастное снижение качества женских гамет; кроме того, из них следует, что для успеха ЭКО определяемое возрастным фактором качество ооцитов имеет большее значение, чем фактор соматического старения пациентки.

Состояние овариального резерва и риск бедного ответа на гонадотропины у возрастных пациенток программы ЭКО

Несмотря на широкое использование специалистами-репродуктологами понятия «овариальный резерв», разные авторы трактуют его отнюдь не одинаково. Так, по мнению Т.А. Назаренко и соавт. [2], этот термин обозначает количество фолликулов, которые потенциально способны отвечать на стимулирующее действие гонадотропинов. Исходя из такого определения, можно прийти к заключению, что, например, инфертильные пациентки с синдромом поликистозных яичников, несмотря на постоянное фоновое возрастное сокращение фолликулярного запаса, имеют даже повышенный овариальный резерв, поскольку при стимуляции гонадотропинами у них удается получить гораздо больше фолликулов, ооцитов и, соответственно, эмбрионов, чем у более молодых женщин с нормальными яичниками [9, 10].

Другие исследователи используют термин «овариальный резерв» для обозначения всего запаса ооцитов, неизрасходованных к данному возрастному периоду и содержащихся в фолликулах на всех стадиях их развития, в том числе и на примордиальной [11]. Эти авторы акцентируют внимание на том, что на гонадотропиновую стимуляцию способны отвечать лишь те фолликулы, которые завершили базальную фазу роста и вступили в гормонозависимую (от ФСГ) фазу своего последующего развития. Очевидно, что такие фолликулы (по морфологии – малые антральные [12]) являются лишь частью аппарата, включающего еще преантральные и примордиальные фолликулы, и поэтому не

Крстич Екатерина Викторовна – канд. мед. наук, врач акушер-гинеколог, репродуктолог ООО «Клиника здоровья» группы компаний «Мать и дитя». **Крстич Миролюб** – канд. мед. наук, врач-уролог хирургического отделения органного донорства МОНИКИ, врач-уролог Клиники «Семейная» ООО «Сеть семейных медицинских центров». **Юдаев Виктор Николаевич** – д-р мед. наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии факультета усовершенствования врачей МОНИКИ.

Для корреспонденции: Крстич Миролюб – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: +7 (926) 284 04 59. E-mail: dolce-vita07@mail.ru

Krstic Ekaterina Viktorovna – MD, PhD, physician obstetrician-gynecologist, reproducer of the “Clinic of Health”, Ltd., Group of companies “Mother and a Child”. **Krstic Miroljub** – MD, PhD, physician-urologist, Surgical Department of Organ Donorship, MONIKI; physician-urologist of the “Family clinic”, Ltd., “The Net of the Family Medical Centers”. **Yudaev Viktor Nikolaevich** – MD, PhD, Professor, the Chair of Obstetrics and Gynecology, the Faculty of Postgraduate Medical Training, MONIKI.

Correspondence to: Krstic Miroljub – 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Tel.: +7 (926) 284 04 59. E-mail: dolce-vita07@mail.ru

отражают истинный резерв, сосредоточенный в основном в пуле примордиальных фолликулов.

Согласно современным представлениям, уменьшение количества исходно сформировавшихся зародышевых клеток начинается с 24-26-й недели внутриутробного развития и продолжается до менопаузы. Если к моменту родов количество половых клеток в яичниках достигает 1 млн, то к менархе оно снижается за счет фоновой атрезии примордиальных фолликулов до 270-500 тыс. [13]. В репродуктивном периоде сокращение фолликулярного аппарата происходит как за счет регулярного убывания овулирующих ооцитов, так и из-за атрезии недозревших антральных фолликулов и продолжающейся фоновой элиминации примордиальных. В результате этих процессов к 37 годам общий фолликулярный запас снижается до 25 тыс. [14]. После 36 лет скорость атрезии фолликулов возрастает вдвое, что резко ускоряет истощение остающегося запаса [13, 15]. Сокращение пула примордиальных фолликулов способствует уменьшению количества зародышевых клеток, регулярно иницируемых к последующему развитию. Так, согласно сообщению A. Faddi и соавт. [13], если в возрасте 20-25 лет ежедневно уходят в рост 50 примордиальных фолликулов, то в 34-35 лет – лишь 17, а в 44-45 лет – не более трех.

Отражением возрастного снижения активности инициации роста примордиальных фолликулов является прогрессирующее уменьшение у женщин старше 38 лет количества малых антральных фолликулов, обладающих чувствительностью к стимулирующему эффекту ФСГ. Именно это и становится одной из очевидных причин ослабленной реакции яичников на гонадотропины в стимулируемых циклах (СЦ) ЭКО [2]. Вопрос о конкретном количестве созревших фолликулов (три, четыре или пять), которое следует расценивать как недостаточное, все еще остается открытым [16], хотя на практике бедный ответ в стимулируемых циклах ЭКО чаще всего констатируют при созревании трех и менее доминантных фолликулов диаметром не менее 15 мм к моменту введения триггера овуляции (человеческий хорионический гонадотропин).

Негативное влияние на результаты ЭКО бедного ответа яичников, независимо от причин их ослабленной реакции на стимуляторы овуляции, состоит в затруднении или даже невозможности обеспечения этапа переноса эмбрионов (ПЭ). По этой причине отмечается снижение эффективности ЭКО как по показателю ЧНБ_{пэ} (из-за возможности переноса лишь одного или двух эмбрионов вместо рекомендуемых трех), так и по показателю ЧНБ_{сц} (за счет учащения случаев прерывания процедуры при невозможности получения хотя бы одного эмбриона

приемлемого качества, а также из-за сниженного показателя ЧНБ_{пэ}). В программах ЭКО лишь большое количество получаемых фолликулов (8-12) и, как следствие, ооцитов (6-10) и эмбрионов (5-8) позволяет отобрать для переноса наилучшие по качеству эмбрионы, и при этом в достаточном количестве (оптимально – три) [17]. При общем же числе полученных эмбрионов от одного до трех (в результате созревания менее четырех фолликулов) проблема отбора становится практически неразрешимой. На практике это приводит к тому, что приходится использовать для переноса не лучшие эмбрионы, а те, что есть, или вообще прерывать лечебный цикл при наличии очевидных дефектов раннего эмбриогенеза (отсутствие дробления, морфологические дегенеративные признаки) [16]. Таким образом, при бедном ответе отбор ооцитов и эмбрионов основывается не на показателе качества, а на характеристике жизнеспособности, что снижает эффективность лечения.

Характеризуя негативное влияние на эффективность ЭКО самого бедного ответа на гонадотропины, следует принимать во внимание, что для контингента возрастных пациенток типично сочетание данного осложнения со снижением качества созревающих ооцитов [3, 4]. Очевидно, что у женщин позднего репродуктивного возраста такая комбинация ослабленной реакции яичников с увеличением доли дефектных ооцитов и, как следствие, получаемых из них дефектных эмбрионов существенно усугубляет негативные последствия бедного ответа. Это хорошо объясняет более выраженное негативное влияние ослабленной реакции на результаты ЭКО у женщин в позднем репродуктивном возрасте в сравнении с молодыми пациентками, у которых качество женских гамет значительно лучше [16].

С учетом очевидной негативной значимости бедного ответа яичников на гонадотропины для результатов ЭКО представляется вполне оправданным поиск надежных предикторов данного осложнения. Большее количество выполненных к настоящему времени исследований по прогнозированию эффективности стимуляции суперооуляции было связано с определением базальных уровней гонадотропинов и эстрадиола (Е₂). При этом установлено, что в стимулируемых циклах риск бедного ответа возрастает при:

- повышении базального уровня ФСГ более 15 мЕД/л [18, 19], более 12 мЕД/л [20] или даже более 10 мЕД/л [21];
- базальном уровне лютеинизирующего гормона (ЛГ) ниже 3 мЕД/л [22];
- соотношении базальных концентраций ЛГ/ФСГ выше 3 [22], хотя некоторые исследователи

отмечают прогностическую значимость измерения этого соотношения лишь у пациенток с повышенным уровнем ФСГ;

– повышении базальной концентрации E_2 более 60, более 80 или более 100 пг/мл [16].

Помимо описанных исследований для прогнозирования активности индуцируемого фолликулогенеза разные авторы предлагают отслеживать динамику изменений концентрации ФСГ в фолликулярной фазе цикла [16, 23], использовать пробы с кломифеном [24], экзогенным ФСГ [16, 25], агонистами гонадотропин-рилизинг-гормона. С аналогичной целью сегодня широко применяют ультразвуковые методы, предусматривающие оценку объема яичников и определение базального числа антральных фолликулов. Так, во многих сообщениях отмечается, что вероятность недостаточного ответа на овариальную стимуляцию существенно возрастает при сокращении объема яичников до значений менее 3 см^3 [26, 27, 28].

Известно также, что риск бедного ответа повышается при выраженном снижении базального числа антральных фолликулов диаметром 2-10 мм. Здесь, однако, приходится констатировать, что в литературе приводятся разные значения данного числа (от 4 до 10), которые при прогнозировании ответной реакции яичников на гонадотропины следует трактовать как недостаточные [29, 30, 31]. Например, Т.А. Назаренко и соавт. [32] при прогнозировании характера ответной реакции на индукторы фолликулогенеза рекомендуют считать фактором риска бедного ответа снижение числа антральных фолликулов до значений менее 7. По мнению этих специалистов, базальное число, равное именно 7, наиболее часто фигурирует в сообщениях разных авторов при обозначении минимального нормативного значения (т.е. нижней границы нормы) для данного показателя. Предполагается, что уменьшение объема яичников и базального числа малых антральных фолликулов не только позволяет прогнозировать адекватность ответа на стимуляторы суперовуляции, но и объективно отражает истинное количественное уменьшение фолликулярного резерва, образуемого примордиальными фолликулами [33].

Еще одним инструментальным методом прогнозирования активности ответа яичников в стимулируемых циклах является трансвагинальная цветная пульсовая доплерометрия, с помощью которой оценивается пиковая систолическая скорость кровотока [30, 34, 35]. Снижение этого показателя до значений менее 10 см/с на 2-3-й день цикла достоверно ассоциируется с ослаблением реакции на стимуляторы суперовуляции [35]. К факторам риска бедного ответа относят также повышение пульса-

ционного давления и индекса резистентности перифолликулярных сосудов яичников [30].

В последние годы к перечисленным тестам, применяемым для прогнозирования адекватности ответной реакции на гонадотропины, были добавлены методики, предусматривающие определение уровней ингибина В [37] и антимюллерова гормона (АМГ) [19, 36, 37, 38]. С учетом относительной новизны этих методов оценки овариального резерва представляется полезным дать краткую характеристику биологической роли ингибина В и АМГ и привести данные об их диагностическом потенциале при прогнозировании характера ответной реакции на индукторы суперовуляции.

Ингибины относятся к лигандам суперсемейства трансформирующего фактора роста β и представляют собой гетеродимеры, включающие субъединицы α и β , образующие изоформы А и В. Эти изоформы обозначаются как ингибин А ($\alpha\beta A$) и ингибин В ($\alpha\beta B$). В экспериментальных исследованиях было установлено, что ингибин В по сравнению с ингибином А и актинами играет более значимую роль в регуляции синтеза ФСГ [36, 39], в связи с чем в клинической практике с диагностической целью (при оценке овариального резерва) определяют именно эту изоформу [32, 40, 41].

В репродуктивном периоде во время фолликулярной фазы уровни ингибина В и ФСГ обратно пропорциональны. Увеличение образования ингибина В наблюдается главным образом при преобладании в яичниках малых антральных фолликулов перед их включением в созревающую когорту. Из этого следует, что его базальный уровень зависит от количества и состояния антральных фолликулов, сформировавшихся (т.е. прошедших стадии инициации и базального роста) из примордиального пула. Это косвенно позволяет судить о состоянии всего фолликулярного резерва, составляемого в том числе и примордиальными фолликулами, поскольку при их прогрессирующей с возрастом редукции параллельно уменьшается количество образующихся из них малых антральных фолликулов [41].

Таким образом, уровень ингибина В отражает состояние овариального резерва, что позволяет использовать показатель концентрации этой белковой субстанции для прогнозирования характера ответной реакции (адекватная или ослабленная) яичников на гонадотропины. Полагают, что о существенном снижении овариального резерва свидетельствует падение ингибина В до значений менее 40-45 пг/мл [10, 36]. У женщин с такими низкими значениями в программе ЭКО отмечается высокая частота отмены лечебных циклов на дотрансферном этапе и низкая частота наступления беременности [32, 42].

Важно также отметить, что, по сообщению некоторых специалистов [42], уровень ингибина В по сравнению с ФСГ оказывается более чувствительным к начинающейся редукции фолликулярного аппарата. Об этом свидетельствуют случаи регистрации аномально низких значений ингибина В на фоне нормальных (не повышенных) концентраций ФСГ. Из этих наблюдений, как полагают их авторы, можно сделать вывод о большей значимости определения уровня ингибина В для ранней диагностики начинающегося необратимого угасания репродуктивной функции, связанного с нарастающим сокращением овариального резерва.

АМГ, как и ингибины, также относится к семейству трансформирующего фактора роста β [36]. В течение фетального периода у плодов мужского пола АМГ, образуемый в клетках Сертоли-тестикулов, вызывает регрессию мюллеровых протоков [43]. У плодов женского пола этот гормон начинает синтезироваться в яичниках в гранулезных клетках ранних развивающихся фолликулов уже с начала 3-го триместра беременности. В репродуктивном периоде АМГ синтезируется в клетках гранулезы малых антральных и преантральных фолликулов. При этом в его функции входит стимуляция выхода покоящихся примордиальных фолликулов в фазу активного роста и, возможно, регуляция процесса формирования из числа малых антральных фолликулов ФСГ-чувствительной когорты, предназначенной для окончательного созревания [36, 37, 44].

Существует мнение [36, 45], что синтез АМГ в меньшей степени зависит от уровня ФСГ, чем, например, образование ингибина В или E_2 . Вероятно, это объясняется тем, что АМГ секретируется гранулезой преантральных фолликулов, на которые ФСГ не оказывает какого-либо влияния. Поэтому концентрация АМГ, в отличие от ингибина В и E_2 , является достаточно независимой от циклических колебаний ФСГ. При этом уровень АМГ более выраженно коррелирует с базальным числом антральных фолликулов, чем уровни ингибина В и E_2 , что позволяет рассматривать показатель концентрации данного гормона как более точный маркер овариального резерва [45, 46].

Нормативные значения показателя АМГ, рассчитанные С.Л. Соок и соавт. [19], колеблются в интервале от 1,0 до 2,5 нг/мл и более. Падение уровня АМГ ниже минимального нормативного значения (менее 1 нг/мл) трактуется как признак редукции овариального резерва и ассоциируется с риском ослабления реакции яичников на экзогенные гонадотропины в стимулируемых циклах [47].

Литература

1. Кустаров В.Н., Боярский К.Ю. Влияние возраста на частоту наступления беременности в программе ЭКО. Проблемы репродукции 1999;(1):46-9. [Kustarov V.N., Boyarskiy K.Yu. Age effect on fertilization rate using IVF program. Problemy reproduksii 1999;(1):46-9 (in Russian)].
2. Назаренко Т.А., Мишиева Н.Г., Фанченко Н.Д., Соловьева Н.Г., Муллабаева С.М., Белоусова Н.Ю. Значение оценки овариального резерва в лечении бесплодия у женщин старшего репродуктивного возраста. Проблемы репродукции 2005;(2):56-9. [Nazarenko T.A., Mishieva N.G., Fanchenko N.D., Solov'eva N.G., Mullabaeva S.M., Belousova N.Yu. Significance of ovarian reserve assessment in treatment of infertility in women of the late reproductive age. Problemy reproduksii 2005;(2):56-9 (in Russian)].
3. Тишкевич О.Л., Жабинская А.Б., Малышева Е.В. Клинико-эмбриологическая оценка результатов экстракорпорального оплодотворения в зависимости от возраста пациенток. Проблемы репродукции 2004;(2):33-7. [Tishkevich O.L., Zhabinskaya A.B., Malysheva E.V. Clinical-and-embriologic assessment of in vitro fertilization outcome depending on patients' age. Problemy reproduksii 2004;(2):33-7 (in Russian)].
4. Battaglia D.E., Goodwin P., Klein N.A., Soules M.R. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. Hum Reprod 1996;11(10):2217-22.
5. Wells D., Delhanty J.D. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. Mol Hum Reprod 2000;6(11):1055-62.
6. Белоцерковцева Л.Д., Коноваленко Л.В., Корнеева Е.В., Бондарева Е.В., Шишанок О.Ю. Влияние возраста пациенток на частоту биологических потерь в программах ЭКО: опыт работы. Проблемы репродукции 2008;(3):53-6. [Belotserkovtseva L.D., Konovalenko L.V., Korneeva E.V., Bondareva E.V., Shishanok O.Yu. Effect of women's age on the frequency of biological losses in implications of IVF program: investigation experience. Problemy reproduksii 2008;(3):53-6 (in Russian)].
7. Назаренко Т.А., Финогенова Е.Я., Осина О.А. Донация ооцитов в программе ЭКО и ПЭ. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы). Кулаков В.И., Леонов Б.В., ред. М.: МИА; 2000. [Nazarenko T.A., Finogenova E.Ya., Osina O.A. Oocytes donation using IVF and ET programs. In vitro fertilization and its new directions in treatment of female and male infertility (theoretic and practical approaches). Kulakov V.I., Leonov B.V., editors. Moscow: MIA; 2000 (in Russian)].
8. Cohen M.A., Lindheim S.R., Sauer M.V. Donor age is paramount to success in oocyte donation. Hum Reprod 1999; 14(11):2755-8.
9. Назаренко Т.А., Здановский В.М., Дуринян Э.Р., Чечурова Т.Н., Мишиева Н.Г., Смирнова А.А. Синдром поликистозных яичников (современные подходы к диагностике и лечению бесплодия). М.: МЕДпресс-информ; 2005. [Nazarenko T.A., Zdanovskiy V.M., Durinyan E.R., Chechurova T.N., Mishieva N.G., Smirnova A.A. Syndrome of polycystic ovaries (contemporary approaches to infertility diagnosis and treatment). Moscow: MEDpress-inform; 2005 (in Russian)].
10. Назаренко Т.А., Мишиева Н.Г., Абубакиров А.Н., Жорданидзе Д.О. Овариальный резерв в прогнозе лечения бесплодия. Проблемы репродукции (специальный выпуск «Второй международный конгресс по репродуктивной медицине»); 2008. [Nazarenko T.A., Mishieva N.G., Abubakirov A.N., Zhor-danidze D.O. Ovarian reserve in prognosis of infertility treatment. Problemy reproduksii (special issue «Vtoroy mezhdunarodnyy kongress po reproduktivnoy meditsine»); 2008 (in Russian)].
11. Александрова Н.В., Марченко Л.А. Современные подходы к оценке овариального резерва у женщин с преждевременной недостаточностью яичников (обзор литературы). Проблемы репродукции 2007;(2):22-9. [Aleksandrova N.V., Marchenko L.A. Contemporary approaches to the ovarian reserve assessment in women with premature ovarian insufficiency (review of the literature). Problemy reproduksii 2007;(2):22-9 (in Russian)].
12. Боярский К.Ю. Фолликулогенез и современная овариальная стимуляция (обзор литературы). Проблемы репродукции 2002;(3):36-43. [Boyarskiy K.Yu. Follicular genesis and contemporary ovarian stimulation (review of the literature). Problemy reproduksii 2002;(3):36-43 (in Russian)].

13. Faddy M.J., Gosden R.G. A mathematical model of follicle dynamics in human ovary. *Hum Reprod* 1995;10(4):770-5.
14. Faddy M.J., Gosden R.G., Gougeon A., Richardson S.J., Nelson J.F. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992;7(10):1342-6.
15. Richardson S.J., Senikas V., Nelson J.F. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1231-7.
16. Назаренко Т.А., Краснополянская К.В. «Бедный ответ». Тактика ведения пациенток со сниженной реакцией на стимуляцию гонадотропинами в программах ЭКО. М.: МЕДпресс-информ; 2013. [Nazarenko T.A., Krasnopol'skaya K.V. "Poor response". Management tactics in female patients with decreased reaction to gonadotrophin stimulation in IVF programs. Moscow: MEDpress-inform; 2005 (in Russian)].
17. Azem F., Yaron Y., Amit A., Yovel I., Barak Y., Peyser M.R., David M.P., Lessing J.B. How many embryos to transfer in patients undergoing IVF? *Hum Reprod* 1996;11(1):229-30.
18. Ebrahim A., Rienhardt G., Morris S., Kruger T.F., Lombard C.J., Van der Merwe J.P. Follicle stimulating hormone levels on cycle day 3 predict ovulation stimulation response. *J Assist Reprod Genet* 1993;10(2):130-6.
19. Licciardi F., Liu H., Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;64(5):991-4.
20. Cook C.L., Siow Y., Brenner A.G., Fallat M.E. Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 2002;77(1):141-6.
21. Jacob S., Conroy R., Hurrison R.F. Predictive value of day 3 menstrual cycle FSH in young women (<35 years) undergoing assisted reproduction treatment (ART). *Hum Reprod* 2000;15:23.
22. Howles C., McNamee M., Edwards R. Effect of tonic level of LH on outcome of IVF. *Lancet* 1994;6:521-2.
23. Hansen L.M., Batzer F.R., Gutmann J.N., Corson S.L., Kelly M.P., Gocial B. Evaluating ovarian reserve: follicle stimulating hormone and oestradiol variability during cycle days 2-5. *Hum Reprod* 1996;11(3):486-9.
24. Kahraman S., Vicdan K., İşik A.Z., Özgün O.D., Alaybeyoğlu L., Polat G., Biberoğlu K. Clomiphene citrate challenge test in the assessment of ovarian reserve before controlled ovarian hyperstimulation for intracytoplasmic sperm injection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;73(2):177-82.
25. Ranieri D.M., Quinn F., Makhlof A., Khadum I., Ghutmi W., McGarrigle H., Davies M., Serhal P. Simultaneous evaluation of basal follicle-stimulating hormone and 17 beta-estradiol response to gonadotropin-releasing hormone analogue stimulation: an improved predictor of ovarian reserve. *Fertil Steril* 1998;70(2):227-33.
26. Engmann L., Sladkevicius P., Agraal R., Bekir J., Campbell S., Tan S.L. The pattern of changes in ovarian stromal and uterine artery blood flow velocities during in vitro fertilization treatment and its relationship with outcome of the cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13(1):26-33.
27. Kyei-Mensah A., Zaidi J., Pittrof R., Shaker A., Campbell S., Tan S.L. Transvaginal three-dimensional ultrasound: accuracy of follicular volume measurements. *Fertil Steril* 1996;65(2):371-6.
28. Sharara F.I., McClarmock H.D. Baseline ovarian volume predict stimulation response but not pregnancy outcome in IVF. *Hum Reprod* 2000;15:28.
29. Chang M.Y., Chiang C.H., Hsieh T.T., Soong Y.K., Hsu K.H. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1998;69(3):505-10.
30. Child T.J., Guleki B., Tan S.L. Success during in vitro maturation (IVM) of oocyte treatment is dependent on the numbers of oocytes retrieved which are predicted by early follicular phase transvaginal ultrasound measurement of the antral follicle count and peak ovarian stromal blood flow velocity. *Hum Reprod* 2001;16:41.
31. Fanchin R., Méndez Lozano D.H., Schönauer L.M., Cunha-Filho J.S., Frydman R. Hormonal manipulation in the luteal phase to coordinate subsequent antral follicle growth during ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 2005;10(6):721-8.
32. Назаренко Т.А., Смирнова А.А. Индукция моно- и суперовуляции: оценка овариального резерва, ультразвуковой и гормональный мониторинг. Проблемы репродукции 2004;(1):36-42. [Nazarenko T.A., Smirnova A.A. Induction of mono- and superovulation: assessment of ovarian reserve, ultrasound and hormone monitoring. *Problemy reproduksii* 2004;(1):36-42 (in Russian)].
33. Lass A., Skull J., McWeigh E., Margara R., Winston R.M. Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod* 1997;12(12):294-7.
34. Coulam C.B., Rinchart J.S. Baseline ovarian stromal blood flow predicts pregnancy after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;70(3 Suppl 1):181.
35. Engmann L., Sladkevicius P., Agraal R. The value of stromal blood flow velocity measurement after pituitary suppression in the prediction of ovarian responsiveness and outcome of IVF treatment. *Fertil Steril* 1998;70(3 Suppl 1):S105-6.
36. Deffieux X., Antoine J.M. Inhibins, activins and anti-Müllerian hormone: structure, signaling pathways, actions and clinical relevance in assisted reproductive therapy. *Gynecol Obstet Fertil* 2003;31(11):900-11.
37. de Vet A., Laven J.S., de Jong F.H., Themmen A.P., Fauser B.C. Anti-müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77(2):357-62.
38. Teixeira J., Maheswaran S., Donahoe P.K. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 2001;22(5):657-74.
39. Casper F.W., Seufert R.J., Schaffrath M., Pollow K. Concentrations of inhibins and activin in women undergoing stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone for in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 2001;75(1):32-7.
40. Khalaf Y., Sheward V., Wheeler M. Correlation between serum levels of LH, oestradiol, and inhibin A and inhibin B and outcome of ovarian stimulation for IVF using pure FSH following pituitary down-regulation with mid-luteal GnRH agonist. *Hum Reprod* 2001;16:150.
41. Tinkanen H., Bläuer M., Laippala P., Tuohimaa P., Kujansuu E. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94(1):109-13.
42. Назаренко Т.А., Мишиева Н.Г., Соловьева Н.Г., Фанченко Н.Д., Муллабаева С.М., Ревিশвили Н.А. Ингибин В как маркер овариального резерва у женщин с различными формами бесплодия. Проблемы репродукции 2005;(3):15-9. [Nazarenko T.A., Mishieva N.G., Solov'eva N.G., Fanchenko N.D., Mullabaeva S.M., Revishvili N.A. Inhibin B as a marker of ovarian reserve in women with different forms of infertility. *Problemy reproduksii* 2005;(3):15-9 (in Russian)].
43. Черных В.Б., Курило Л.Ф. Синдром персистенции мюллеровых протоков (обзор литературы). Проблемы репродукции 2001;(4):20-3. [Chernykh V.B., Kurilo L.F. Syndrome of Müllerian ducts persistence (review of the literature). *Problemy reproduksii* 2001;(4):20-3 (in Russian)].
44. La Marca A., Malmusi S., Guillini S., Tamaro L.F., Orvieto R., Levrat P., Volpe A. Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 2004;19(12):2738-41.
45. Fanchin R., Schönauer L.M., Righini C., Guibourdenche J., Frydman R., Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003;18(2):323-7.
46. Penarrubia J., Fabreque F., Manau D., Creus M., Casals G., Casamitjana R., Carmona F., Vanrell J.A., Balasch J. Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005;20(4):915-22.
47. Назаренко Т.А., Мишиева Н.Г., Фанченко Н.Д. Роль антимюллерова гормона в оценке овариального резерва. Проблемы репродукции 2005;(6):26-30. [Nazarenko T.A., Mishieva N.G., Fanchenko N.D. Role of anti-Müllerian hormone in assessment of ovarian reserve. *Problemy reproduksii* 2005;(6):26-30 (in Russian)].

ОСНОВНЫЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ АКТИВАЦИИ Т-КЛЕТОК В ОТТОРЖЕНИИ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

Ватазин А.В.¹, Зулькарнаев А.Б.¹, Федулкина В.А.¹, Крстич М.^{1,2}

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

²Клиника «Семейная» ООО «Сеть семейных медицинских центров»; 105120, г. Москва, ул. Сергея Радонежского, 5/2, стр. 1, Российская Федерация

В настоящее время отторжение – ведущая причина потери почечных трансплантатов. Эффективная терапия невозможна без четкого представления о механизмах реакции отторжения. В предлагаемой работе обобщаются взгляды отечественных и иностранных авторов на особенности Т-клеточной активации.

Ключевые слова: ко-стимуляция, активация клеток, иммунный ответ, Т-клетки, антигенпрезентирующие клетки.

MAJOR INTERCELLULAR INTERACTIONS AT THE T CELL ACTIVATION IN RENAL TRANSPLANT REJECTION

Vatazin A.V.¹, Zul'karnaeV A.B.¹, Fedulкина V.A.¹, Krstic M.^{1,2}

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

²Family Clinic, Ltd., the Net of Family Centers; 5/2 s. 1 Sergiya Radonezhskogo ul., 105120 Moscow, Russian Federation

Currently, an organ rejection is a leading cause of kidney transplants loss. Effective therapy is impossible without a clear understanding of the rejection mechanisms. In this paper, we summarize the views of domestic and foreign authors on the role of T cell activation in kidney transplant rejection.

Key words: co-stimulation, cell activation, immune response, T cells, antigen-presenting cells.

Под отторжением понимают патологический процесс, возникающий в донорском органе вследствие специфического ответа иммунной системы реципиента на антигены донора и проявляющийся нарушением функции трансплантированной почки. Отторжение трансплантата – это нормальная реакция иммунной системы. Непосредственно после включения трансплантата в системный кровоток реципиента начинается иммунный конфликт, который обусловлен активацией как нативного, так и адаптивного иммунитета. Ведущая роль в развитии реакции отторжения отводится Т-клеткам. В настоящей работе приводится описание некоторых клеточных механизмов, которые играют важную роль в патогенезе отторжения почечного трансплантата и могут служить потенциальными целями для специфической терапии.

В эксперименте установлено, что животные с удаленным в неонатальный период тимусом и не

имеющие зрелых Т-клеток не отторгают трансплантат. При введении Т-клеток нормальных животных той же линии способность к отторжению трансплантата восстанавливается. Таким образом, очевидно, что этим клеткам принадлежит ключевая роль в развитии отторжения [1, 2].

Можно выделить следующие принципиальные этапы клеточных взаимодействий в течении Т-клеточного ответа: антигенспецифичная активация CD4-клетки путем презентации антигена в комплексе с собственными HLA (human leukocyte antigens) антигенпрезентирующим клеткам (АПК) – распознавание антигена комплексом Т-клеточного рецептора (ТКР) – ко-стимуляция – продукция цитокинов и заключительный этап – цитотоксичность.

Для начала клеточного иммунного ответа требуется активация Т-клеток. Этот процесс реализуется через несколько синергичных сигналов. Одного первого сигнала (презентации антигена) недостаточно

для нормальной активации. При отсутствии второго (костимуляторного) сигнала Т-клетки, встретившись с антигеном, подвергаются неудачной активации: они не вырабатывают значительного количества цитокинов и не делятся, а вместо этого на срок до нескольких недель перестают отвечать на соответствующую стимуляцию (антигензависимая клональная анергия) или подвергаются апоптозу. Т-клетки, получившие костимуляторные сигналы, продуцируют воспалительные цитокины (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИНФ γ и др.), инициируя каскад физиологических реакций и обеспечивая иммунный ответ, который реализуется зрелыми эффекторными клетками: Т-, В-, NK-клетками, макрофагами и др. [3, 4].

ПЕРВЫЙ СИГНАЛ АКТИВАЦИИ Т-КЛЕТОК

Первым сигналом является презентация антигена наивным CD4- и CD8-клеткам, которая может происходить двумя путями: прямым и косвенным. В связи с тем, что в трансплантате могут присутствовать «клетки-пассажиры», в том числе и АПК – дендритные клетки донора, в процессе перфузии эти клетки поступают в системный кровоток реципиента и мигрируют в лимфатические узлы и селезенку, где они способны прямым путем активировать Т-лимфоциты реципиента. Считается, что активация Т-клеток по прямому пути возможна вследствие молекулярной мимикрии: чужеродные молекулы МНС (major histocompatibility complex) могут быть ошибочно приняты Т-клеточным рецептором за комплекс собственных HLA и аллоантигена. Этот путь активации, как правило, приводит к первичному цитотоксическому CD8-Т-клеточному ответу. Способствовать активации Т-клеток по прямому пути может и их контакт с эндотелиоцитами донора, поскольку они тоже могут выступать в роли АПК. В результате прямого пути активации может быть инициировано острое и сверхострое отторжение [3, 5].

Существует и косвенный путь. Дендритные клетки реципиента, проникая в почечный аллотрансплантат (ПАТ), пиноцитируют различные фрагменты донорских пептидов, подвергают их процессингу и презентуют чужеродные антигены Т-клеткам

в связи с собственными молекулами МНС. Такая активация Т-клеток сопровождается развитием гиперчувствительности замедленного типа и продукцией большого количества антител за счет стимуляции В-лимфоцитов.

Первый (активационный) сигнал определяет специфичность иммунного ответа и реализуется через Т-клеточный рецептор и комплекс молекул МНС и аллоантигена. Определенные домены молекул HLA имеют участки связывания с корцепторами CD4 или CD8: α_3 -домен молекул I класса способен связываться с α -доменом CD8-цитотоксических лимфоцитов, V_2 -домен молекул II класса – с D_1 -доменом Т-хелперов. CD4 и CD8 служат важными элементами Т-клеточной активации, инициируя специфические внутриклеточные реакции и усиливая активационный сигнал (рис. 1).

ТКР является ключевой субстанцией в реакции отторжения ПАТ, его основная функция – распознавание антигена и передача сигнала внутрь Т-клетки. ТКР относится к семейству Ig, он распознает широкий спектр антигенов. Структурно он включает две цепи (α и β или γ и δ), представляющие собой антигенраспознающую часть комплекса и имеющие наружную вариабельную и внутреннюю константную области: $V\alpha V\beta + C\alpha C\beta$ или $V\gamma V\delta + C\gamma C\delta$ соответственно. Антигенраспознающая часть схожа по строению с Fab-фрагментом В-клеточного рецептора. ТКР также содержит трансмембранный и внутриклеточные домены. Гетеродимеры $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ вместе с инвариантным комплексом CD3 (состоящим из двух гетеродимеров $\zeta\epsilon$ и $\epsilon\delta$), а также гомодимером $\zeta\zeta$ образуют полный комплекс ТКР, конститутивно экспрессируемый Т-клетками.

«Классический» ТКР, состоящий из $\alpha\beta$ -цепей, встречается преимущественно в тимусе и периферических лимфоидных органах и экспрессируется более чем на 95% Т-лимфоцитов. Лимфоциты, экспрессирующие ТКР, имеющие в своем составе $\gamma\delta$ -цепи, редко встречаются в периферической крови, лимфоузлах и селезенке, однако составляют большую часть Т-клеток эпителиальной ткани: кожи, мочевого пузыря, кишечника. Структурно $\gamma\delta$ ТКР подобен

Ватазин Андрей Владимирович – д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела трансплантологии, нефрологии и хирургической гемокоррекции МОНИКИ. **Зулькарнаев Алексей Батыргараевич** – канд. мед. наук, доцент кафедры трансплантологии, нефрологии и хирургической гемокоррекции МОНИКИ. **Федулкина Вероника Андреевна** – канд. мед. наук, мл. науч. сотр. хирургического отделения трансплантологии и диализа МОНИКИ. **Крстич Мирослав** – канд. мед. наук, врач-уролог хирургического отделения органного донорства МОНИКИ, врач-уролог Клиники «Семейная» ООО «Сеть семейных медицинских центров».

Для корреспонденции: Зулькарнаев Алексей Батыргараевич – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: (+7) 916 705 98 99. E-mail: 7059899@gmail.com

Vatazin Andrey Vladimirovich – MD, PhD, Professor, Head of the Department of Transplantation, Nephrology, and Surgical Hemocorrection, MONIKI. **Zul'karnayev Aleksey Batyrgaraevich** – PhD, assistant Professor, the Chair of Transplantation, Nephrology, and Surgical Hemocorrection, MONIKI. **Fedul'kina Veronika Andreevna** – PhD, junior scientific worker, Surgical Department of Transplantation and Dialysis of MONIKI. **Krstic Miroslav** – MD, PhD, physician-urologist, Surgical Department of Organ Donorship, MONIKI; physician-urologist of the Family Clinic, Ltd., the Net of Family Centers.

Correspondence to: Zul'karnayev Aleksey Batyrgaraevich – 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Tel.: (+7) 916 705 98 99. E-mail: 7059899@gmail.com

$\alpha\beta$ ТКР, однако имеет функциональные отличия. Предполагается, что клетки, экспрессирующие $\gamma\delta$ ТКР, могут быть активированы HLA-независимым способом. Таким образом, активация этих клеток не связана с презентацией антигена обычным способом и имеет некоторые общие черты с нативным иммунитетом. Важно, что антигеном могут быть не пептиды, полученные в ходе процессинга и презентируемые в комплексе с HLA, а чужеродные белки HLA, вирусные и бактериальные белки, молекулы, сигнализирующие о повреждении клетки (например, белки теплового шока), и др. $\gamma\delta$ ТКР-клетки также могут быть активированы посредством взаимодействия с MICA и MICB. Важной особенностью таких клеток является то, что они могут быть активированы без костимуляционного сигнала. Известно, что $\gamma\delta$ ТКР-клетки способны как инициировать, так и супрессировать иммунный ответ.

В основном HLA I класса связываются с эндогенными пептидами, синтезированными клеткой-мишенью, и в таком виде происходит презентация CD8-клеткам – цитотоксическим Т-лимфоцитам. Образование комплекса «HLA I класса – антиген» начинается с деградации эндогенных цитоплазматических белков в органеллах (протеасомах), имеющих мультисубъединичную структуру. Основная функция протеасом – АТФ-зависимая протеолитическая деградация денатурированных или убиквитинированных белков до коротких пептидов различной длины. В протеасомах осуществляется протеолиз 80-90% цитозольных белков. Одной из основных является протеасома 26S, которая состоит из центральной 20S и двух концевых 19S-субъединиц. В результате про-

цессинга в протеасомах образуются пептиды длиной 8-15 аминокислотных остатков, которые при помощи транспортных белков переносятся в полость эндоплазматического ретикула, где присоединяются к белкам HLA I класса. Собранный комплекс молекул HLA I класса и антигена транспортируется на клеточную мембрану, где антиген может быть доступен презентации.

Сборка комплекса «HLA II класса – антиген» происходит несколько иначе, поскольку таким образом осуществляется презентация экзогенных пептидов. Молекула HLA II класса, находящаяся в эндоплазматическом ретикуле, своей антигенсвязывающей областью соединена с Ii-пептидом, который препятствует связыванию с другими пептидами и способствует дальнейшему транспорту к мембране. В процессе транспорта этого комплекса к мембране белок Ii делится на несколько фрагментов, один из которых – CLIP – остается связанным с HLA. Позже CLIP-пептид отсоединяется от молекулы HLA II класса, а его место в антигенсвязывающей области занимает процессированный пептид, поступивший в клетку путем пиноцитоза. Собранный комплекс HLA II класса вместе с экзогенным пептидом транспортируется на клеточную мембрану и участвует в презентации аллоантигена. Процесс замещения CLIP на антиген происходит при помощи молекул HLA-DM и HLA-DO, которые сами не способны к связыванию пептида [3].

Таким образом, описан феномен перекрестной презентации антигенов. В этом случае пептиды экзогенного происхождения могут быть презентированы с участием молекул HLA I класса.

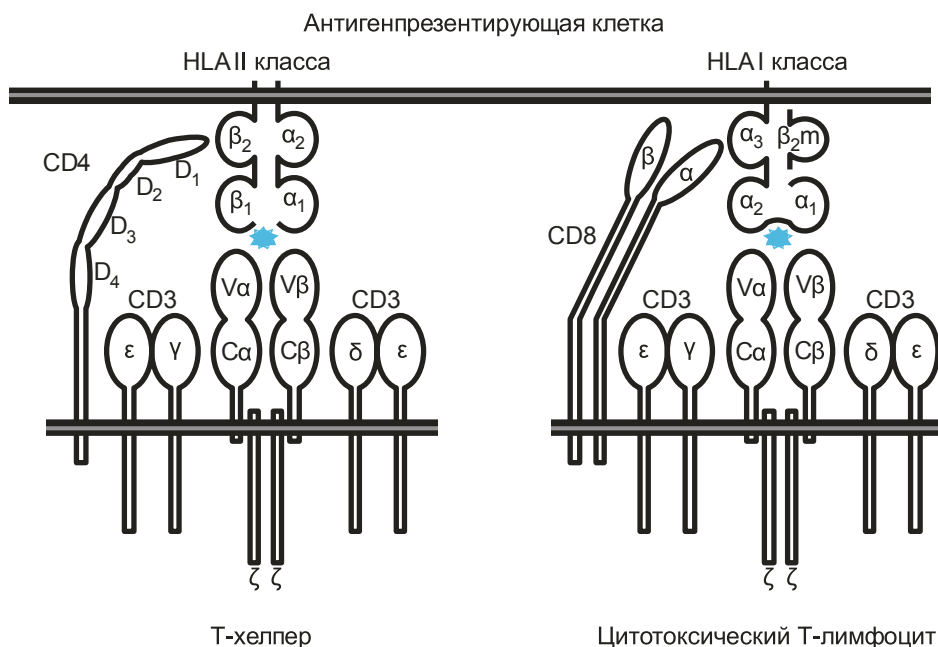


Рис. 1. Презентация аллоантигена в комплексе с HLA T-клеточному рецептору

Молекула OX40 (CD134) экспрессируется на активированных Т-хелперных клетках (главным образом – Th2). Ее лигандом является OX40L (CD252), представленный на дендритных клетках и В-лимфоцитах. Взаимодействие молекул OX40 и OX40L является важным костимуляционным сигналом для Т-клеток, сравнимым по значимости с CD28-B7. Вероятно, OX40 имеет ключевое значение для формирования CD4-аллореактивных клеток памяти. Известно, что активация пути костимуляции OX40-OX40L приводит к двунаправленной стимуляции клеток: активации и усилению пролиферации Т-клеток и повышению выделения провоспалительных цитокинов АПК [9]. В эксперименте, несмотря на то что толерантность не развилась, блокада пути коактивации OX40-OX40L обладает протективным эффектом в отношении трансплантата, что исследователи связывают со снижением выраженности Т-клеточного эффекторного ответа [10]. Блокада пути костимуляции OX40-OX40L снижает выраженность активации и гуморального звена иммунитета: отмечено уменьшение концентрации IgG, что приводит к меньшему повреждению трансплантата [11]. Очевидно, что сигнальные пути OX40-OX40L и CD40-CD154 играют важную роль в CD28-B7-независимой активации Т-клеток, поскольку при блокаде этих путей значительно уменьшается степень повреждения трансплантата [12].

Важным путем костимуляции Т- и В-клеток является взаимодействие молекул ICOS (inducible T cell costimulator, CD278) и B7h. ICOS служит гомологом CD28, но экспрессируется только на активированных Т-клетках (в большей мере на Th2). Лигандом для ICOS является B7h (CD275) – молекула, структурно схожая с B7, однако неспособная взаимодействовать с CD28 и, что крайне важно, с CTLA-4. Стимуляция Т-клеток по пути ICOS-B7h усиливает пролиферацию и выделение цитокинов. Поскольку ICOS экспрессируется также и В-клетками, активация этого пути передачи сигнала может сопровождаться продукцией антител. На данный момент роль этого пути в развитии реакции отторжения до конца не изучена. Тем не менее получены лабораторные данные, свидетельствующие о том, что блокада этого пути костимуляции может обладать протективным эффектом в отношении трансплантата [13].

Еще одним путем коактивации иммунокомпетентных клеток при трансплантации органов является взаимодействие молекулы CD27, конститутивно экспрессированной на наивных Т-, В- и NK-клетках, и CD70, экспрессируемой при активации Т- и В-клетками и АПК (дендритными клетками). Этот путь является важным компонентом костимуляции и, вероятно, может обеспечить CD28-независимую активацию Т-клеток (в большей мере – CD8-клеток). Поскольку стимуляция по пути CD27-CD70 дополняет активацию

CD40-CD40L, происходит активация и В-клеток с формированием развернутой картины гуморального иммунного ответа на аллоантиген. Однако тонкости данного сигнального пути до конца не ясны. Известно также, что CD27 может активировать специфические внутриклеточные сигнальные пути и индуцировать апоптоз клетки.

Данный путь имеет важное значение при трансплантации органов, в частности, при развитии клеточного и С4d-негативного гуморального отторжения [14, 15, 16]. В эксперименте на мышах установлено, что блокада пути костимуляции CD27-CD70 улучшает долгосрочную выживаемость трансплантата. Вероятно, это может быть обусловлено снижением активации аллореактивных CD8-клеток памяти, которые в меньшей степени зависят от CD28-B7-активации, а также уменьшением активации В-клеток [17]. Известно также, что стимуляция пути CD27-CD70 увеличивает популяцию Treg, что может способствовать опухолевому росту [18].

Молекула CD30 экспрессируется на дендритных клетках, активированных Т- (Treg) и В-лимфоцитах. Лигандом этой молекулы является CD30L (CD153), представленная на активированных Т-лимфоцитах и моноцитах/макрофагах. Она может быть экспрессирована на различных АПК. Данный путь коактивации изучен недостаточно. Считается, что CD30 принадлежит значительная роль в развитии реакций отторжения и «трансплантат против хозяина». Известно, что CD30 (растворимая форма – sCD30) является маркером отторжения трансплантата [19, 20, 21].

Т-клетки также могут получать дополнительную костимуляцию через путь 4-1BB – 4-1BBL. В основном молекула 4-1BB (CD137) представлена на активированных CD8- и в меньшей степени – CD4- и NK-клетках, она может индуцированно экспрессироваться на гранулоцитах (тучных клетках, эозинофилах, нейтрофилах), а также макрофагах. Помимо этого существует растворимая форма s4-1BB. CD137 конститутивно представлены на регуляторных клетках FoxP3+ CD4+. Лиганд CD137 (4-1BBL) экспрессируется на АПК: дендритных клетках и активированных В-лимфоцитах. Через путь 4-1BB – 4-1BBL главным образом получают стимуляцию CD8- (как эффекторные, так и клетки памяти) и NK-клетки. Данный путь играет важную роль в развитии клеточно-опосредованного отторжения. Предполагается, что костимуляция Т-клеток через CD137 может препятствовать апоптозу даже в отсутствие CD28-костимуляции [22, 23].

Молекула HVEM представлена в основном на активированных Т-клетках. В-клетки также способны экспрессировать HVEM. Лигандом является белок LIGHT, представленный на дендритных клетках. Взаимодействие молекул HVEM – LIGHT обеспечивает

дополнительный костимуляционный сигнал, усиливая активацию Т-клеток. В эксперименте блокада этого пути костимуляции увеличивает выживаемость трансплантатов [24].

Еще одной костимулирующей молекулой является TIM-1, экспрессируемая CD4- и CD8-клетками. Ее лигандом служит молекула TIM-4, представленная конститутивно на АПК, однако плотность ее экспрессии может меняться. Костимуляция через сигнальный путь TIM-1 – TIM-4 с одновременной стимуляцией через Т-клеточный рецептор и другие молекулы костимуляции обеспечивает мощную стимуляцию Т-клеток, способствует их пролиферации и продукции цитокинов. Активация этого пути на клетках FoxP3+ может снижать их супрессорную активность. Известно, что TIM-1 также может использоваться как маркер острого почечного повреждения. Высокий уровень TIM-1 в моче сопряжен со значительным риском утраты ПАТ. TIM-3 может использоваться как маркер клеточной активации при остром отторжении [25].

Активация Т-клетки АПК происходит с участием множества дополнительных молекул. Взаимодействие комплекса CD3+/CD4+/Т-клеточный рецептор с МНС+антиген, CD28 с B7 и CD40 с CD40L усиливается за счет связывания молекул интегрина LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen 3, CD58) с CD2 (рецептор к LFA-3), а также ICAM-1/2/3 (inter cellular adhesion molecule 1/2/3, CD54/CD102/CD50) с LFA-1 (CD11a) и многими другими молекулами, которые не участвуют непосредственно в костимуляции, но значительно усиливают плотность клеточного контакта [3, 4].

Помимо молекул, передающих костимуляционный сигнал, существуют и молекулы, тормозящие пролиферацию и активацию Т-клеток. Такими свойствами кроме CTLA-4 обладает белок PD-1 (CD279), экспрессируемый на активированных CD4- и CD8-, а также В-лимфоцитах, НК-клетках и макрофагах. Молекула этого белка частично схожа с CTLA-4. PD-1 имеет два лиганда – PD-L1 (B7-H1, CD274) и PD-L2 (B7-DC, CD273), которые, возможно, несут несколько разные функции. Лиганды PD-1 представлены на АПК после их активации, а также на активированных FoxP3+ Treg, эндотелиоцитах, некоторых паренхиматозных клетках. Известно также, что PD-L1 может связываться не только с PD-1, но и с B7-1. Активация данного сигнального пути ингибирует пролиферацию и продукцию цитокинов антигенспецифически CD4- и CD8-клетками. Выраженность ингибирующего действия этих молекул зависит от наличия костимуляционных сигналов, в частности, CD28-B7. Блокада сигнального пути PD-1 – PD-L1/2 ускоряет отторжение трансплантата в эксперименте. Введение PD-L1-Ig при связывании с PD-1 тормозит реакцию отторжения [26].

Неоднозначными биологическими свойствами обладает молекула GITR, представленная на эффекторных Т-клетках, В-, НК-клетках и макрофагах. Активация через эту молекулу даже в отсутствие костимуляционного сигнала CD28-B7 способствует пролиферации Т-клеток и продукции цитокинов. Помимо активации клеток молекула GITR способна активировать специфические внутриклеточные сигнальные пути и индуцировать апоптоз. Лигандом GITR является белок GITRL, экспрессируемый дендритными клетками, эндотелиоцитами и некоторыми паренхиматозными клетками. В результате того, что GITR конститутивно экспрессируется на FoxP3+ Treg, эта молекула может представлять интерес как мишень терапевтического воздействия для предупреждения и лечения отторжения, а также индукции толерантности [27].

Еще одним коингибирующим сигнальным путем является путь BTLA/CD160-HVEM. Молекула BTLA (CD272) представлена на активированных Т- и В-клетках, а также АПК. Основным лигандом для BTLA является HVEM, экспрессируемая активированными Т-, В- и НК-клетками. Взаимодействие этих молекул тормозит активацию и дифференцировку Т-клеток. HVEM на АПК также способна связываться с молекулой CD160, экспрессируемой CD4-, CD8- и НК-клетками, ингибируя их. Роль этого сигнального пути при трансплантации солидных органов еще предстоит установить. Интересно, что выраженность супрессивного эффекта от активации этого сигнального пути может зависеть от числа несовпадений по HLA, а также от активации других коингибирующих сигнальных путей [28].

ТРЕТИЙ СИГНАЛ АКТИВАЦИИ Т-КЛЕТОК

В результате активации Т-лимфоцитов происходит выраженное выделение лимфокинов, которые действуют на различные клетки и координируют их участие в иммунном ответе. Гены, кодирующие ИЛ-2 и его рецептор (CD25 – ИЛ-2R α и CD122 – ИЛ-2R β), активируются одними из первых, поскольку они необходимы для пролиферации Т-клеток. ИЛ-3 стимулирует пролиферацию стволовых клеток, которые, в свою очередь, могут дифференцироваться в гранулоциты и макрофаги. ИНФ γ способствует экспрессии МНС II класса на клетках и активирует макрофаги. В-клеточные факторы роста и дифференциации – ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-6 – вызывают клональную антигенспецифичную пролиферацию В-клеток, что приводит к производству специфических антител. При этом Т-клетки под влиянием ИЛ-2 и ИЛ-4 делятся с образованием CD8+, что сопровождается антигенспецифичной клеточной цитотоксичностью [3, 29].

В результате синергичного взаимодополняющего действия первого сигнала активации и второго ко-

стимуляционного сигнала CD4+ происходит активация факторов транскрипции, что ведет к синтезу и высвобождению ИЛ-2. Взаимодействие ИЛ-2 с его высокоаффинными рецепторами на Т-лимфоцитах (CD25) вызывает транскрипцию дезоксирибонуклеиновой кислоты и прогресс клеточного цикла, стимулируя пролиферацию клеток. Таким образом, ИЛ-2 является третьим костимуляционным сигналом активации лимфоцитов.

Активация и дополнительная костимуляция Т-клеток происходят с участием множества молекул, при этом некоторые из них способны подавлять активацию. Дальнейшее изучение механизмов клеточной активации может улучшить результаты трансплантации почки и повысить выживаемость почечных трансплантатов путем снижения риска развития реакции острого отторжения, а возможно и индукции толерантности к трансплантату.

Литература

- Amirzargar A., Lessanpezheshki M., Fathi A., Amirzargar M., Khosravi F., Ansari pour B., Nikbin B. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37(7):2985-7.
- Karczewski J., Karczewski M., Glyda M., Wiktorowicz K. Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 2008;40(10):3390-2.
- Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А. Иммунология. Пер. с англ. М.: Логосфера; 2007. [Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I. Immunology. Moscow: Logosfera; 2007 (in Russian)].
- Pilat N., Sayegh M.H., Wekerle T. Costimulatory pathways in transplantation. *Semin Immunol* 2011;23(4):293-303.
- Данович Г.М., ред. Трансплантация почки. Пер. с англ. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. [Danovitch G.M., editor. Renal transplantation. Moscow: GEOTAR-media; 2013 (in Russian)].
- Ford M.L., Larsen C.P. Translating costimulation blockade to the clinic: lessons learned from three pathways. *Immunol Rev* 2009;229(1):294-306.
- Karimi M.H., Pourfathollah A.A. CD40 and tolerance induction. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2012;11(1):1-13.
- Xu H., Yan J., Huang Y., Chilton P.M., Ding C., Schanie C.L., Wang L., Ildstad S.T. Costimulatory blockade of CD154-CD40 in combination with T-cell lymphodepletion results in prevention of allogeneic sensitization. *Blood* 2008;111(6):3266-75.
- Sugamura K., Ishii N., Weinberg A.D. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol* 2004;4(6):420-31.
- Kinnear G., Wood K.J., Marshall D., Jones N.D. Anti-OX40 prevents effector T cell accumulation and CD8+ T cell mediated skin allograft rejection. *Transplantation* 2010;90(12):1265-71.
- Burrell B.E., Lu G., Li X.C., Bishop D.K. OX40 costimulation prevents allograft acceptance induced by CD40-CD40L blockade. *J Immunol* 2009;182(1):379-90.
- Habicht A., Najafian N., Yagita H., Sayegh M.H., Clarkson M.R. New insights in CD28-independent allograft rejection. *Am J Transplant* 2007;7(8):1917-26.
- Harada H., Salama A.D., Sho M., Izawa A., Sandner S.E., Ito T., Akiba H., Yagita H., Sharpe A.H., Freeman G.J., Sayegh M.H. The role of the ICOS-B7h T cell costimulatory pathway in transplantation immunity. *J Clin Invest* 2003;112(2):234-43.
- Bullock T.N., Yagita H. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J Immunol* 2005;174(2):710-7.
- Feau S., Garcia Z., Arens R., Yagita H., Borst J., Schoenberger S.P. The CD4+ T-cell help signal is transmitted from APC to CD8+ T-cells via CD27-CD70 interactions. *Nat Commun* 2012;3:948.
- Hirohashi T., Chase C.M., Della Pelle P., Sebastian D., Alessandrini A., Madsen J.C., Russell P.S., Colvin R.B. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant* 2012;12(2):313-21.
- Yamada A., Salama A.D., Sho M., Najafian N., Ito T., Forman J.P., Kewalramani R., Sandner S., Harada H., Clarkson M.R., Mandelbrot D.A., Sharpe A.H., Oshima H., Yagita H., Chalasani G., Lakkis F.G., Auchincloss H. Jr., Sayegh M.H. CD70 signaling is critical for CD28-independent CD8+ T cell-mediated alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 2005;174(3):1357-64.
- Claus C., Riether C., Schürch C., Matter M.S., Hilmenyuk T., Ochsenbein A.F. CD27 signaling increases the frequency of regulatory T cells and promotes tumor growth. *Cancer Res* 2012;72(14):3664-76.
- Hire K., Hering B., Bansal-Pakala P. Relative reductions in soluble CD30 levels post-transplant predict acute graft function in islet allograft recipients receiving three different immunosuppression protocols. *Transpl Immunol* 2010;23(4):209-14.
- Saini D., Ramachandran S., Nataraju A., Benshoff N., Liu W., Desai N., Chapman W., Mohanakumar T. Activated effector and memory T cells contribute to circulating sCD30: potential marker for islet allograft rejection. *Am J Transplant* 2008;8(9):1798-808.
- Zeiser R., Nguyen V.H., Hou J.Z., Beilhack A., Zambricki E., Buess M., Contag C.H., Negrin R.S. Early CD30 signaling is critical for adoptively transferred CD4+CD25+ regulatory T cells in prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood* 2007;109(5):2225-33.
- Gizinski A.M., Fox D.A., Sarkar S. Pharmacotherapy: concepts of pathogenesis and emerging treatments. Co-stimulation and T cells as therapeutic targets. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;24(4):463-77.
- Wang C., Lin G.H., McPherson A.J., Watts T.H. Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunol Rev* 2009;229(1):192-215.
- Fan K., Wang H., Wei H., Zhou Q., Kou G., Hou S., Qian W., Dai J., Li B., Zhang Y., Zhu T., Guo Y. Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance. *Transplantation* 2007;84(6):746-54.
- Yeung M.Y., McGrath M., Najafian N. The emerging role of the TIM molecules in transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11(10):2012-9.
- Del Rio M.L., Buhler L., Gibbons C., Tian J., Rodriguez-Barbosa J.I. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation. *Transpl Int* 2008;21(11):1015-28.
- Ronchetti S., Nocentini G., Petrillo M.G., Riccardi C. CD8(+) T cells: GTR matters. *Sci World J* 2012: 308265.
- McGrath M.M., Najafian N. The role of coinhibitory signaling pathways in transplantation and tolerance. *Front Immunol* 2012;3:47.
- Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. [Koval'chuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. Clinical immunology and allergology including the principles of general immunology. Moscow: GEOTAR-Media; 2011 (in Russian)].

СИСТЕМА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Дмитриева Н.Г., Яковчик О.Н., Ватазин А.В., Зулькарнаев А.Б., Федулкина В.А.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Изложено современное представление об организации генов главного комплекса гистосовместимости, их белковых продуктах и номенклатуре лейкоцитарных антигенов человека.

Ключевые слова: главный комплекс гистосовместимости, лейкоцитарные антигены человека, белки, гены, трансплантация почки.

HISTOCOMPATIBILITY SYSTEM IN RENAL TRANSPLANTATION

Dmitrieva N.G., Jakovchik O.N., Vatazin A.V., Zul'karnae A.B., Fedulkina V.A.

Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

The paper presents a contemporary view on organization of genes in the major histocompatibility complex, their protein products, and nomenclature of human leukocyte antigens.

Key words: major histocompatibility complex, human leukocyte antigens, proteins, genes, renal transplantation.

В соответствии с современными представлениями о природе иммунитета основным назначением иммунной системы является иммунный ответ, т.е. реакция на агенты, биологически чуждые и потенциально опасные для организма. В основе реакции данной системы лежит распознавание антигенов, которые несут чужеродные агенты, специфическими клонами лимфоцитов с последующей их активацией, размножением и созреванием в клетки-эффекторы (киллеры), ответственные за удаление упомянутых агентов из организма. Поскольку на антигены реагируют лишь те клоны, которые способны распознать их с помощью специальных рецепторов, в иммунный ответ вовлекается относительно небольшая часть клеток системы. После удаления антигенных субстанций иммунная система возвращается к исходному состоянию обогащенная клетками памяти. Наличие иммунологической памяти способствует ускорению реакций на повторное поступление тех же антигенов.

Основой иммунного ответа является активация В-лимфоцитов, ответственных за образование антител, а также Т-лимфоцитов и макрофагов, обеспечивающих клеточный иммунитет. В реакциях обоих типов участвуют вспомогательные клетки – антигенпрезентирующие (АПК) и Т-хелперы. Антиген может быть опознан иммунной системой и спосо-

бен индуцировать ответ лишь при условии его связывания и обработки АПК. Система гистосовместимости (тканевой совместимости) и существует для распознавания «своего» и «чужого».

Важнейшую роль в распознавании чужеродного биологического материала играет главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) – большая группа тесно сцепленных генов, обладающих крайне выраженным полиморфизмом. Эти гены кодируют специфические мембранные белки – главные человеческие лейкоцитарные антигены (human leucocyte antigens, HLA) [1].

В 1952 г. группой ученых под руководством J. Dausset были обнаружены антилейкоцитарные аллоантитела, проявляющие активность против лейкоцитов неродственных индивидуумов. В 1958 г. была выявлена первая специфичность HLA на лейкоцитах, получившая название МАС (в настоящее время – HLA-A2). Следующим этапом исследований явилось обнаружение высокого титра антилейкоцитарных антител в сыворотке крови многократно рожавших женщин.

С 1964 г. началось широкое международное сотрудничество по изучению системы HLA, продолжающееся и сегодня. С этого времени проводятся регулярные рабочие конференции (Workshop and Con-

ference of Histocompatibility). На конференции 1965 г. было постулировано, что открытые специфичности принадлежат одной сложной иммунной системе.

ГЕНЫ СИСТЕМЫ МНС

Специальной комиссией ВОЗ была установлена стандартная номенклатура. Весь комплекс называется HLA. На сегодняшний день представлена полная карта генов короткого плеча 6-й хромосомы, где находятся гены, кодирующие пептиды системы HLA. Эти гены объединены в локусы и составляют три региона, каждый из которых имеет характерные генные продукты и функции. Продуктами данных регионов являются белки HLA классов I, II и III.

К классу I относятся классические HLA-A, -B, -C гены и их серологически выявляемые антигены, неклассические гены: HLA-E, -F, -G; гены, связанные классом I, – MICA и MICB, а также псевдогены. Продуктом классических генов класса I являются гликопротеиновые молекулы, экспрессированные на мембранах почти всех ядросодержащих клеток организма. Особенно плотно они представлены на мембранах Т-лимфоцитов.

Регион класса II (D-регион) состоит из пяти субрегионов: классические гены DR, DQ, DP, неклассические гены, кодирующие минорные антигены, – DO и DM, а также псевдогены. Более плотно продукты этих генов представлены на мембранах В-лимфоцитов и АПК. Продукты генов HLA, расположенные на клеточных мембранах вместе с HLA-рецепторами, составляют эпитопы.

Семейство генов HLA II класса DR включает один ген, кодирующий α -цепь, и до девяти (в том числе и псевдогены), кодирующих цепь β : DRB1-9. При этом все HLA-DR содержат продукты гена DRB1, однако некоторые варианты также включают добавочную β -цепь.

Регион класса III содержит гены структуры компонентов комплемента C2 и C4, а также факторов некроза опухоли и белков теплового шока, вовлеченных в иммунологическую функцию. На схеме строения системы HLA показаны псевдогены и не-

экспрессирующиеся гены с неизвестной функцией (рис. 1).

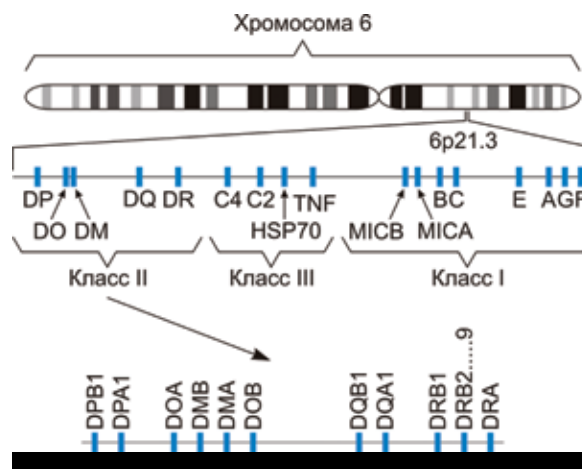


Рис. 1. Главный комплекс гистосовместимости

В развитии реакции отторжения наибольшее значение имеют молекулы МНС I и II классов. Гены, содержащиеся в ядре клетки и кодирующие белки HLA, составляют генотип системы МНС, в то время как HLA-специфичности, выявляемые на клеточных мембранах, образуют фенотип.

Помимо крайне выраженного полиморфизма гены HLA обладают еще одной особенностью. Наследование таких генов происходит по кодоминантному типу, т.е. у потомства в одинаковой степени проявляются HLA-аллели, полученные от каждого из родителей (рис. 2). Комбинация аллелей из разных локусов на одной хромосоме называется гаплотипом и наследуется блоком. В ряде случаев кроссинговера блоковое наследование нарушается и образуется рекомбинантный гаплотип. Такие случаи крайне редки из-за близкого расположения генов на хромосоме [2, 3, 4].

БЕЛКИ СИСТЕМЫ HLA

Строение и функции белковых продуктов экспрессии генов МНС изучены весьма хорошо. Молекула HLA I класса состоит из полиморфной α -цепи, име-

Дмитриева Надежда Григорьевна – канд. мед. наук, врач клинической лаборатории МОНИКИ. **Яковчик Ольга Николаевна** – врач клинической лаборатории МОНИКИ. **Ватазин Андрей Владимирович** – д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела трансплантологии, нефрологии и хирургической гемокоррекции МОНИКИ. **Зулькарнаев Алексей Батыргараевич** – канд. мед. наук, доцент кафедры трансплантологии, нефрологии и хирургической гемокоррекции МОНИКИ. **Федулкина Вероника Андреевна** – канд. мед. наук, мл. науч. сотр. хирургического отделения трансплантологии и диализа.

Для корреспонденции: Зулькарнаев Алексей Батыргараевич – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: (+7) 916 705 98 99. E-mail: 7059899@gmail.com

Dmitrieva Nadezhda Grigor'evna – MD, PhD, physician of the Clinical Laboratory, MONIKI. **Jakovchik Ol'ga Nikolaevna** – MD, physician of the Clinical Laboratory, MONIKI. **Vatazin Andrey Vladimirovich** – PhD, Professor, Head of the Department of Transplantation, Nephrology and Surgical Hemocorrection, MONIKI. **Zul'karnev Aleksey Batyrgaraevich** – PhD, Assistant Professor, the Chair of Transplantation, Nephrology and Surgical Hemocorrection, MONIKI. **Fedulkina Veronika Andreevna** – PhD, junior scientific worker, Surgical Department of Transplantation and Dialysis, MONIKI.

Correspondence to: Zul'karnev Aleksey Batyrgaraevich – 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Tel.: (+7) 916 705 98 99. E-mail: 7059899@gmail.com

ющей три внеклеточных домена, а также трансмембранный и цитоплазматический сегменты. Эта цепь связана с инвариантной молекулой β_2 -микроглобулина. Структура α -цепи такова, что ее домены α_1 и α_2 образуют антигенсвязывающую область. В качестве антигенов выступают аминокислотные последовательности определенной длины. Строение молекул HLA II класса сходно с I с той лишь разницей, что вариабельными являются обе цепи – и α , и β , имеющие по два внеклеточных домена, а также трансмембранный и цитоплазматический сегменты.

В комплексе с молекулами I класса (A, B, C), присутствующими на мембране практически всех клеток (кроме эритроцитов и клеток трофобласта), осуществляется презентация антигенов клеткам CD8⁺ (цитотоксическим лимфоцитам). В ассоциации с молекулами MHC II класса (DR, DQ, DP и др.), экспрессированными на поверхности АПК (дендритные клетки, моноциты/макрофаги, В-лимфоциты), происходит презентация антигенов Т-клеткам CD4⁺ (Т-хелперам).

Молекулы HLA различаются не только по размеру связываемых пептидов, но и по типу этих пеп-

тидов. Как правило, молекулы I класса участвуют в презентации цитозольных (внутриклеточных) пептидов, синтезированных внутри клетки, например, вирусных. Молекулы II класса чаще всего связывают экстрацеллюлярные и экзогенные пептиды, попавшие в клетку путем фагоцитоза или пиноцитоза.

Экспрессия HLA на мембране клеток непостоянна и может меняться в зависимости от влияния различных факторов. Так, в результате действия ИФН γ повышается плотность экспрессии HLA I и II классов на клетках, не являющихся «профессиональными» АПК и обычно не экспрессирующих эти молекулы, – например, эндотелиоцитах и эпителиальных клетках почечных канальцев. Таким образом, большое количество клеток почечного аллотрансплантата способно экспрессировать HLA обоих классов и быть мишенью клеточных реакций иммунной системы реципиента.

Молекулы HLA экспрессируются на поверхности АПК – макрофагов, дендритных клеток, В-лимфоцитов, а также эндотелиальных и мезангиальных клеток почечного аллотрансплантата – и обеспечивают презентацию фрагментов аллоантигенов эффекторным Т-клеткам. Таким образом, реализуется генетическая рестрикция: для взаимодействия с Т-клеточным рецептором чужеродный антиген должен быть представлен в виде комплекса с продуктами HLA I или II класса собственных АПК. Взаимодействующие клетки одновременно распознают «свое» и «чужое» [3, 5].

НОМЕНКЛАТУРА СИСТЕМЫ HLA И МЕТОДЫ ТИПИРОВАНИЯ

HLA-специфичности обозначаются следующим образом: сначала записывается буква, определяющая локус (A, B, C, DR и т.д.), а затем – номер специфичности. Некоторые малоизученные специфичности обозначаются буквой «W» (Workshop) и номером. Такие фенотипы соответственно записываются как HLA-A1,2; B7,35; Cw1,2. Термином «гаплотип» обозначают набор генов одной хромосомы: A1, B7, Cw1.

HLA-специфичности могут быть выявлены с помощью типизирующих сывороток, полученных из крови многократно рожавших женщин. Метод называется «серологическое HLA-типирование», выполняется в микролимфотоксическом тесте с последующим микроскопированием. С разработкой и внедрением новых биотехнологий, а именно получения моноклональных сывороток, были выявлены как новые HLA-специфичности, так и аллели уже известных генов. Поэтому иногда фенотип записывается так: A29(19), 26(10); B44(12), 62(15); DRB1:13(6), 17(3). Цифры в скобках соответствуют

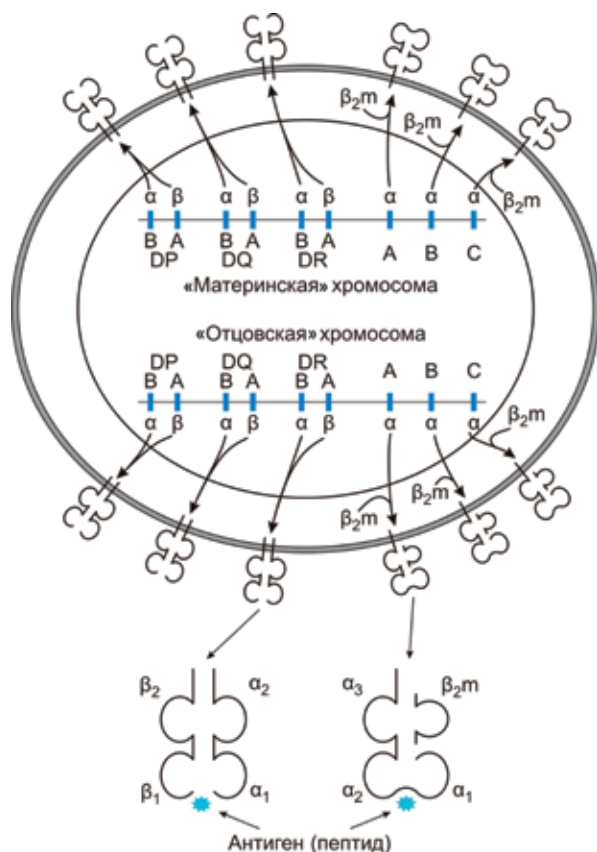


Рис. 2. Гены системы HLA и их продукты

номеру аллеля по старой номенклатуре, т.е. ген A19 имеет аллели 29, 30, 31, 32, 33; A10 – 25, 26, 34, 66; B12 – 44, 45; B15 – 62, 70, 75, 76, 77; DRB1-3 – 17, 18. Цифры без скобок присваиваются аллелям, которые выявляются серологически, еще их называют сплитами. Для HLA-A19 сплиты – это 29, 30, 31 и т.д., для HLA-B12 – 44 и 45, для HLA-DRB1-3 – 17 и 18.

Существуют специфичности, которые не выявляются с помощью сывороток. Они были обнаружены при использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для специфичности HLA-DRB1-17 (3) существует 8 аллелей, для 18 – 3, для 13 – 25 и т.д.

Следующим этапом исследования HLA-специфичностей было внедрение ПЦР. Принципиальное отличие данного метода в том, что выявляются непосредственно гены системы HLA. Метод значительно более чувствительный по сравнению с серологическим, т.к. сыворотки, содержащие антитела, зачастую дают ложноположительные реакции, поскольку могут содержать и другие антитела, а процесс получения моносывороток сложен и трудоемок. Данный метод позволяет открывать не только новые гены HLA, но и аллели уже известных генов. Так, ген HLA-A1 имеет более 80 аллелей, A2 – более 120, B27 – более 60, DRB1-13 – 25. Аллелям, выявляемым при помощи ПЦР, присваиваются четырех- и пятизначные номера. Типирование до этих аллелей называется типированием высокого разрешения (high resolution) и применяется при пересадке костного мозга. При HLA-типировании реципиентов, нуждающихся в трансплантации аллогенной почки, и потенциальных доноров используются наборы низкого разрешения (low resolution) – этого достаточно для трансплантации солидных органов: почки, печени, сердца и др.

Полиморфизм генов HLA является главной причиной развития иммунной реакции и отторжения при пересадке солидных органов и гемопоэтических клеток костного мозга. Подбор максимально генетически совместимого донора был и остается основой для успешного приживания

трансплантата и длительности его функции, несмотря на определенные успехи в области иммуносупрессивной терапии, хирургии и криоконсервации донорских органов. В HLA-номенклатуре в пределах каждого локуса (A, B, DR) различают три уровня генетического полиморфизма: базовый (broad), расщепленный (split) и аллельный (allelic) (рис. 3).

Базовый уровень получил название серологического, поскольку первоначально полиморфизм HLA изучался при помощи лимфоцитотоксического теста или серологического типирования лейкоцитов. Позднее при анализе ДНК было обнаружено, что в пределах одной серологической группы существует широкая генетическая вариабельность. Полиморфные участки ДНК в пределах одной группы называют аллелями. Таблицы HLA-антигенов ежегодно обновляются, поскольку открываются новые аллельные варианты генов.

Хотя генетические различия в пределах одного аллеля не ограничиваются четырехзначными цифрами, дальнейшее расщепление гена не приводит к значимой иммунной атаке со стороны иммунокомпетентных клеток. Поэтому даже при трансплантации костного мозга обычно достаточно генотипирования с точностью до четвертого знака (или аллельного уровня). В случае же трансплантации солидных органов надежная удовлетворительная приживаемость трансплантата достигается при подборе совместимого донора по пяти основным локусам – A, B, Cw, DR, DQ – на уровне серологической группы [4, 5, 6, 7]. Всего на данный момент известно около 8,5 тыс. аллелей, 6725 из которых относятся к HLA I класса, а 1771 – II класса.

МИНОРНЫЕ АНТИГЕНЫ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

Помимо главных HLA существуют и минорные антигены клеточных мембран, роль которых в развитии отторжения менее значима. Минорные антигены гистосовместимости (minor histocompatibility antigens, miHA) – крайне полиморфные по функ-



Рис. 3. Принцип организации номенклатуры HLA

ции и строению белки, которые различаются даже у монозиготных близнецов. Они также способны активировать клетки CD4 и CD8, вызывая иммунный ответ, проявляющийся в виде реакции отторжения. Даже в случае гендерных различий в паре «донор – реципиент» минорные антигены, кодируемые генами Y-хромосомы, могут играть роль в повышении риска развития острого отторжения [8]. При этом известно, что несовпадение по минорным антигенам гистосовместимости также может приводить к развитию иммунологически обусловленной трансплантационной нефропатии.

Таким образом, гены главного комплекса гистосовместимости и кодируемые ими лейкоцитарные антигены – ключевые факторы, определяющие выживаемость почечных трансплантатов. Выявление новых аллелей продолжается несколько десятков лет. Дальнейшее развитие тканевого ДНК-типирования может способствовать более точному подбору пары «донор – реципиент», что позволит улучшить результаты трансплантации органов.

Литература

1. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens* 2009;74(2): 101-16.
2. Шумаков В.И., ред. Трансплантология. Руководство. М.: Медицина – Тула: Репроникс Лтд; 1995. [Shumakov V.I., editor. *Transplantology. Manual*. Moscow: Meditsina – Tula: Reproniks Ltd; 1995 (in Russian)].
3. Klein J., Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(10):702-9.
4. Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Fernández-Viña M., Geraghty D.E., Holdsworth R., Hurley C.K., Lau M., Lee K.W., Mach B., Maiers M., Mayr W.R., Müller C.R., Parham P., Petersdorf E.W., Sasazuki T., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.I., Tiercy J.M., Trowsdale J. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010;75(4):291-455.
5. Данович Г.М. Трансплантация почки. Пер. с англ. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. [Danovich G.M. *Renal transplantology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013 (in Russian)].
6. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens* 2012;80(1):1-11.
7. McCluskey J., Kanaan C., Diviney M. Nomenclature and serology of HLA class I and class II alleles. *Curr Protoc Immunol* 2003; Appendix 1:Appendix 1S.
8. Pabón M.A., Navarro C.E., Martín R., Rodríguez M., Martín I., Gaitán L., Gómez A., Lozano E. Minor histocompatibility antigens as risk factor for poor prognosis in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2011;43(9):3319-23.

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

<i>Basarboliev A.V., Vishnyakova M.V. Jr., Vishnyakova M.V., Kazanchyan P.O., Lar'kov R.N., Zagarov S.S.</i> MSCT perfusion in assessment of brain hemodynamics and in analysis of surgical treatment results in patients with chronic brain ischemia	3
<i>Glazkov A.A., Kulikov D.A., Dreval' A.V., Kovaleva Yu.A., Shumskii V.I., Rogatkin D.A.</i> Development of non-invasive method for blood microcirculation disorders diagnostics in diabetic patients using laser Doppler flowmetry	7
<i>Zakharov S.G., Golenkov A.K., Mitina T.A., Lutskeya T.D., Belousov K.A., Fadeev R.S., Solovieva M.E., Senotov A.S., Akatov V.S.</i> Increase of drug resistance of acute myeloid leukemia cells in multicellular aggregates <i>in vitro</i>	11
<i>Ivanov V.E., Karp O.E., Popova N.R., Chernikov A.V., Gudkov S.V., Bruskov V.I.</i> Formation of long-lived reactive species of blood serum proteins by the action of heat	17
<i>Kulikova P.A., Filyushkin Yu.N., Kulikov D.A., Fedulov A.V., Mashkov A.E., Kulikov A.V.</i> Experimental model of the primary male hypogonadism	21
<i>Mikhaylova D.S., Ilovayskaya I.A.</i> Premature aging markers in women of reproductive age with hypopituitarism	25
<i>Titaeva A.A., Tereshchenko S.G., Lukina E.M., Dreval' A.V., Ilovaiskaya I.A.</i> Background changes of the digestive system mucosa in patients with acromegaly	29
<i>Fedorova S.I., Kulakov N.V., Kulakova E.V.</i> Validation of the MEGG-DP-NS-01 monitor in oscillometry and auscultation modes, according to ESH, BHS and AAMI protocols	34
<i>Fomina O.A., Molochkov A.V., Kil'dyushevsky A.V.</i> Clinical significance of extracorporeal photochemotherapy in complex treatment of localized scleroderma	40
<i>Chernykh Yu.B., Shushanov S.S.</i> Expression of genes responsible for multidrug resistance in relapsed/refractory multiple myeloma patients	47
<i>Shteiner M.L.</i> The subepithelial pigment spots of tracheobronchial tree: detection rate and etiology according to bronchoscopy findings	52
<i>Shcherbakova M.M., Kotov S.V.</i> Rehabilitation of patients with aphasia using modified restoration methods	56

REVIEWS

<i>Gudkov S.V., Bruskov V.I., Kulikov A.V., Bobylev A.G., Kulikov D.A., Molochkov A.V.</i> The bioantioxidants (part 1)	61
<i>Gudkov S.V., Bruskov V.I., Kulikov A.V., Sharapov M.G., Kulikov D.A., Molochkov A.V.</i> The bioantioxidants (part 2)	65
<i>Krstic E.V., Krstic M., Yudaev V.N.</i> Effect of oocytes quality and ovarian reserve on the therapeutic potential of <i>in vitro</i> fertilization in patients of late reproductive age	70

LECTURES

<i>Vatazin A.V., Zul'karnaev A.B., Fedulkina V.A., Krstic M.</i> Major intercellular interactions at the T cell activation in renal transplant rejection	76
<i>Dmitrieva N.G., Jakovchik O.N., Vatazin A.V., Zul'karnaev A.B., Fedulkina V.A.</i> Histocompatibility system in renal transplantation	83

Редакторы: Л.Ю. Заранкина, Л.И. Шахриманьян
 Дизайн и компьютерная верстка: М.Ю. Грибова
 Подписано в печать????? Формат 60х84/8. Гарнитура «Calibri».
 Печать офсетная. Тираж 1000 экз. Заказ №

ООО «Полиграфикс»
 Россия, Ярославская обл., г. Рыбинск, ул. Блюхера, 7
 Отпечатано на собственном полиграфическом оборудовании

ISBN 978-5-98511-233-7



9 785985 112337



Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова

«ПЕРВЫЙ СРЕДИ РАВНЫХ...»

Научно-практический рецензируемый журнал
«СЕЧЕНОВСКИЙ ВЕСТНИК» –
официальное издание ГБОУ ВПО
Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения
Российской Федерации.

Журнал «Сеченовский вестник» публикует оригинальные и обзорные статьи по актуальным вопросам медицины, биологии, а также высшего медицинского и фармацевтического образования. Все представленные для публикации материалы проходят независимое рецензирование. Требования к оформлению статей соответствуют общепринятым и размещены на странице журнала на официальном сайте Университета (www.mma.ru). Там же представлен архив номеров в формате pdf.

Редакция журнала «Сеченовский вестник» разрешает некоммерческое использование материалов, опубликованных в журнале, при условии соблюдения норм международного авторского права и обязательной ссылки на первоисточник.



E-mail: sechenov-journal@mma.ru, sechenov-journal@mail.ru

Сайт: <http://www.mma.ru>

ALMANAC

№ 31'14

research and practical journal

of clinical medicine

diagnostic technologies and methods
of treatment in medicine

laboratory, clinical,
and medicobiologic investigations

scientific review, lectures
