



№ 2 (12), 2006 г.

ВЕСТНИК УРАЛЬСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИЧЕСКОЙ НАУКИ

Главный редактор:

В.А. Черешнев, академик РАН и РАМН (г. Екатеринбург)

Заместители главного редактора:

В.Г. Климин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); М.С. Скляр, к.м.н. (г. Екатеринбург)

Ответственный секретарь:

С.Л. Леонтьев, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)

Редакционная коллегия:

Н.А. Агаджанян, академик РАМН (г. Москва); Ф.И. Бадаев, д.м.н. (г. Екатеринбург); А.Б. Блохин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); В.Н. Большаков, академик РАН (г. Екатеринбург); О.В. Бухарин, член-корреспондент РАН, академик РАМН (г. Оренбург); Е.Д. Гольдберг, академик РАМН (г. Томск); В.Н. Журавлев, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Н.В. Зайцева, член-корреспондент РАМН (г. Пермь); Ю.М. Захаров, академик РАМН (г. Челябинск); О.П. Ковтун, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Б.И. Никонов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); М.И. Прудков, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); К.В. Судаков, академик РАМН (г. Москва); Р.М. Хаитов, академик РАМН (г. Москва); Б.И. Чарный (г. Екатеринбург); М.В. Черешнева, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); В.А. Черкасов, д.м.н., профессор (г. Пермь); В.И. Шевцов, член-корреспондент РАМН (г. Курган); В.И. Шилко, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Б.Г. Юшков, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.П. Ястребов, член-корреспондент РАМН (г. Екатеринбург)

Редакционный совет:

Я.Б. Бейкин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.А. Белкин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); С.А. Берзин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Н.П. Глинских, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.М. Дыгай, академик РАМН (г. Томск); В.А. Журавлев, член-корреспондент РАМН (г. Киров); Ф.Х. Камиллов, д.м.н., профессор (г. Уфа); Б.А. Кацнельсон, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); С.А. Коротких, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.И. Кузьмин, к.м.н., доцент (г. Екатеринбург); С.В. Кузьмин, д.м.н. (г. Екатеринбург); Л.П. Ларионов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Н.В. Литусов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); И.Г. Портнов, к.м.н. (г. Екатеринбург); Г.И. Ронь, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Н.С. Стрелков, д.м.н., профессор (г. Ижевск); Ю.Г. Суховой, д.м.н. (г. Тюмень)

**Перспективные научные исследования в области
медицинских клеточных технологий**

Леонтьев С.Л. Перспективные направления научных исследований Института медицинских клеточных технологий	3
Базарный В.В., Ястребов А.П., Мещанинов В.Н. Экспериментальное обоснование иммуноцитотерапии нарушений кроветворения	6
Егоров Д.А., Савельев Л.И., Цвиренко С.В. Компьютерное моделирование сложных лиганд-рецепторных взаимодействий	8
Макеев О.Г., Буханцев В.А., Куликов Е.С., Измаилов И.Х., Костюкова С.В., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Тарасевич А.А. Мониторинг мутаций генов-супрессоров и протоонкогенов в структуре обеспечения безопасности применения клеточных технологий	14
Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Измаилов И.Х., Медведева С.Ю., Костюкова С.В., Буханцев В.А., Куликов Е.С., Ястребов А.П. Перспективы применения культивируемых клеток кожи в терапии деструктивных заболеваний пародонта	22
Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А., Шориков Е.В., Фечина Л.Г. Изучение минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии с целью своевременного планирования стратегии лечения с трансплантацией гемопоэтических клеток	32
Фечина Л.Г. Новые подходы в лечении острых лейкоемий у детей раннего возраста как альтернатива интенсивной программной химиотерапии в сочетании с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток	37
Цаур Г.А., Семенikhина Е.Р., Шориков Е.В., Фечина Л.Г. Молекулярно-биологические методы диагностики как важнейший этап определения показаний для проведения клеточной терапии у онкогематологических пациентов	42

**Научные обзоры, сообщения и оригинальные исследования,
посвященные актуальным проблемам медицины и организации
здравоохранения**

Волков В.И., Лескова С.С., Кирколуп Е.Р. Экспериментальное исследование гистерезиса смачивания с помощью плоского капилляра	47
Дмитриев А.Н., Трельская Н.Ю., Сарapultsev П.А., Трельский П.Е., Футерман Е.М., Салихова Л.Р. Особенности структурно-функциональных изменений сердца в динамике развития метаболического синдрома	50
Куриндина А.А., Сарapultsev П.А. Влияние длительности сахарного диабета 2 типа на взаимосвязь нарушения функции почек с изменением структурно-функциональных показателей сердца	55
Парфенова Г.В. Эндокринно-иммунные изменения у больных с эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом на фоне гепатита В и С	60
Парфенова Г.В., Коновалов В.И., Цуцор В.В. Особенности течения фоновых заболеваний шейки матки у больных гепатитами В и С	63
Покровский Д.Г., Михайленко А.А., Негодина Ю.В. Патохимические и некоторые иммунологические особенности у детей с эмоциональными и поведенческими расстройствами, часто болеющих острыми респираторными заболеваниями	66
Родионов С.Ю., Орлов О.А., Черешнев В.А., Тараненко Л.А., Шур Н.Н., Сибиряк С.В., Гаврилова Т.В., Орлова Е.Г., Лебединская О.В. Иммунокоррекция препаратом «Профеталь» в комплексном лечении онкологических больных	72
Суханов С.Г., Рямзина И.Н., Туев А.В., Тимофеева И.В. Влияние коронарного шунтирования на диастолическую дисфункцию рестриктивного типа у больных ИБС	76
Толкач А.Б., Долгих В.Т., Мороз В.В., Толкач Ю.В. Печеночно-почечная недостаточность при экспериментальном абдоминальном сепсисе	81
Тимофеева И.В. Особенности диастолической функции левого желудочка у больных ИБС после коронарного шунтирования	86

**Perspective scientific researches in the field of medical cellular
technologies**

Leontev S.L. Perspective directions of scientific researches of Institute of medical cellular technologies	3
Bazarny V.V., Yastrebov A.P., Meschaninov V.N. Experimental substantiation for immunocytotherapy of blood disorders	6
Egorov D.A., Saveliev L.I., Tsvirenko S.V. Computer modelling of complex ligand-receptor interactions	8
Makeev O.G., Buhantsev V.A., Kulikov E.S., Izmailov I.H., Kostyukova S.V., Ulybin A.I., Zubanov P.S., Tarasevitch A.A. Monitoring of mutations of gene-suppressors and protooncogenes for guarantee of safety of cell technology	14
Makeev O.G., Ulybin A.I., Zubanov P.S., Izmailov I.H., Medvedeva S.Y., Kostyukova S.V., Buhantsev V.A., Kulikov E.S., Yastrebov A.P. Prospects of application of cultivated skin-derived cells in therapy of destructive diseases of parodontium	22
Popov A.M., Verzhbitskaja T.J., Tsauro G.A., Shorikov E.V., Fechina L.G. Minimal residual disease investigation by flow cytometry for the purpose of timely haematopoietic stem cells transplantation treatment strategy planning	32
Fechina L.G. New treatment modalities in infant acute leukemia are an alternative option to the intensive chemotherapy with the consecutive hematopoietic stem cells transplantation	37
Tsauro G.A., Semenikhina E.R., Shorikov E.V., Fechina L.G. Molecular biology techniques are main methods in the diagnostic strategy of cellular therapy in oncological and hematological disorders	42

**Scientific reviews, reports and original researches, devoted to the
actual problems of medicine and health care**

Volkov V.I., Leskova S.S., Kirkolup E.R. Experimental research of a hysteresis of wetting with the help of a flat capillary	47
Dmitriev A.N., Trelskaya N.Y., Sarapultsev P.A., Trelsky P.E., Futerman E.M., Salihova L.R. Structural and functional condition overpatching of the heart in the metabolic syndrome's dynamics	50
Kurindina A.A., Sarapultsev P.A. Influence duration of type 2 diabetes on relationship between renal dysfunction and structural and functional abnormalities of heart	55
Parphenova G.V. Endocrine-immune changes that has patients with cervix of the uterus ectopia in combination with chronic cervicit against a background of B and C hepatitis	60
Parphenova G.V., Konovalov V.I., Tsutsor V.B. Peculiarities of the course of background cervix of the uterus' illnesses of B and C hepatitis patients	63
Pokrovsky D.G., Michailenko A.A., Negodina J.V. Pathochemical and some immunological characteristics of children having emotional behavioural disorders, who often come down with acute respiratory diseases	66
Rodionov S.Ju., Orlov O.A., Chereshev V.A., Taranenko L.A., Shur N.N., Sibiryak S.V., Gavrilova T.V., Orlova E.G., Lebedinskaya O.V. Immunocorrection by "Profetal" in complex treatment of tumoral diseases	72
Suchanov S.G., Ryamzina I.N., Tuyeve A.V., Timofeeva I.V. Coronary bypass influence at restrictive diastolic function at ischemic heart disease patients	76
Tolkach A.B., Dolgih V.T., Moroz V.V., Tolkach Y.V. Hepaticorenal insufficiency in experimental abdominal sepsis	81
Timofeeva I.V. Left ventricle diastolic function after coronary revascularization	86

**ИЗ ОБРАЩЕНИЯ РУМЯНЦЕВА А.Г. И РУМЯНЦЕВА С.А.
К УЧЕНОМУ СОВЕТУ ГУЗ «ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКИХ
КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»**

16.05.2006 г.

Благодарим Вас и лично Губернатора Свердловской области Эдуарда Эргартовича Росселя за включение нас в состав Ученого Совета ИМКТ и приглашение участвовать в работе института.

Мы поддерживаем инициативу Э.Э. Росселя и Ш.И. Спектора по организации ИМКТ, первого в России учреждения нового типа по внедрению высоких медицинских технологий в практику здравоохранения. Ознакомившись со структурой ИМКТ, мы предлагаем, наряду с научно-производственной деятельностью, организовать консультативно-лечебно-катамнестическое подразделение со штатами специализированной поликлиники и стационара одного дня в штате ИМКТ. Отделения гематологии, онкологии, кардиологии, неврологии могут быть использованы как базы ИМКТ на функциональной основе.

Рекомендуем Вам провести лицензионно-разрешительные мероприятия, а также, организовать Этический комитет ИМКТ для оформления надлежащей документации по проведению клинической работы.

Желаем Вам успешной работы и высоких научных достижений.

Член Ученого Совета ИМКТ
Директор ФГУ ФНКЦ детской гематологии,
онкологии и иммунологии Росздрава
член-корр. РАМН, профессор

А.Г. РУМЯНЦЕВ

Член Ученого Совета ИМКТ
Руководитель отдела молекулярной и экспериментальной
гематологии, онкологии и иммунологии
ФГУ ФНКЦ ДГОИ Росздрава, доцент

С.А. РУМЯНЦЕВ

С.Л. Леонтьев

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИНСТИТУТА МЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

ГУЗ «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург

Когда в начале XX века русский биолог Александр Максимов, исследуя процессы кроветворения, обнаружил пожизненно сохраняющиеся недифференцированные клетки, названные им «стволовыми», вряд ли он мог предположить, что стоит на пороге величайшего открытия в биологии, поставленного в конце XX века журналом «Science» в один ряд по значимости с расшифровкой двойной спирали ДНК и программы «Геном человека».

В начале 60-х появились публикации о содержании в пуповинной крови факторов, подавляющих канцерогенез.

В середине 60-х годов советские ученые А.Я. Фриденштейн и И.Л. Чертков закладывают основы науки о стволовых клетках (СК) костного мозга.

Уже более трех десятков лет клиническая медицина широко использует способность стволовых кроветворных клеток восстанавливать кроветворение. Пересадка костного мозга, а также стволовых кроветворных клеток, полученных из периферической и пуповинной крови, спасла жизни тысяч больных [2].

В конце века появились работы о способности СК взрослого организма к дифференцировке в клетки не только тканей их существования, но и многих других тканей. Фактически речь идет о возможности использования СК [их предполагаемой тотипотентности] для лечения деструктивных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, инфаркт миокарда, диабет, гепатит, поражения суставов, переломы костей, атрофия межпозвоночных дисков и т. д. [3].

В экспериментальных научных исследованиях подтверждается потенциальная способность нейрональных СК из головного мозга взрослых и эмбриональных СК служить источником клеточной трансплантации в качестве нейронных заместителей [1].

Обнадёживающие результаты тканевой регенерации СК на животных моделях при сердечных заболеваниях привели к первым клиническим исследованиям [4].

Описано несколько результатов клинических ис-

следований, свидетельствующих о замещении СК поврежденных кардиомиоцитов после инфаркта миокарда. Одно из первых рандомизированных, контролируемых исследований было проведено Wollert и соавторами. Шестидесяти пациентам с острым ИМ вводились аутологичные клетки путем интракоронарной инфузии. При катамнезе через шесть месяцев у пациентов, получавших инфузию СК, отмечалось значительное улучшение функции левого желудочка по сравнению с контрольной группой [6].

Группа ученых из Университета Миннесоты (США) сумела из человеческих эмбриональных СК создать НК-клетки, способные уничтожать определенные виды раковых клеток *in vitro*.

Согласно отчетам исследовательской группы из Университета Альберты в Эдмонтоне (США), у семи пациентов после трансплантации аллогенных панкреатических островков была получена пролонгированная независимость от инсулина при сахарном диабете [5].

Актуальность этих данных и внимание общественности к ним понятны. В то время, как в ходе серьезных научных исследований изучается вопрос возможности терапии СК, околонучные и коммерческие структуры дискредитируют как идею, так и ее результаты, практически используя непроверенные и нелегитимные методы клеточной терапии.

К сожалению, Свердловская область не стала исключением, и у нас также большое число пациентов пострадало от недостоверной рекламы, иногда от откровенного обмана под вывеской «лечения стволовыми клетками».

Между тем область располагает достаточным научным и клиническим потенциалом как для проведения фундаментальных исследований, так и для разработки и внедрения современных и перспективных технологий лечения.

В соответствии с Указом губернатора Свердловской области от 29.06.2005 в системе здравоохранения области создано государственное учреждение «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий».

Приоритетными задачами института являются:

– сбор и анализ информации о современных мировых исследованиях в сфере клеточных и иных биотехнологий;

– стратегическое планирование и оказание помощи в проведении научно-исследовательской работы в области биотехнологий;

– разработка экспериментальных моделей, осуществление научных исследований, клиническая адаптация и внедрение в практику эффективных методов клеточной терапии;

– противодействие путем компетентной экспертизы распространению научно-необоснованных, опасных для здоровья методов клеточной терапии;

– подготовка и распространение в средствах массовой информации достоверных и подтвержденных материалов о клеточных технологиях и возможностях их применения с целью защиты населения и борьбы с псевдомедицинскими заблуждениями, имеющими общественную опасность;

– участие в российских и международных научных и клинических исследованиях в области клеточных технологий и биотехнологий.

Перспективный план основных направлений научно-исследовательских работ института формировался, во-первых: на основании анализа российского и зарубежного опыта, отражающего достижения в области изучения возможности использования стволовых клеток в лечении различных заболеваний, во-вторых, с учетом научного потенциала уже работающих или вновь создаваемых в клиниках и НИИ области творческих научных коллективов и групп.

В перспективном плане исследований присутствуют как фундаментальные, так и клинические направления. Часть разделов сформулированы достаточно подробно с перечислением основных этапов или сегментов исследования, что свидетельствует об определенной уже проделанной в этом направлении работе. Часть исследований носит поисковый характер, в них вновь сформированные научные коллективы находятся на начальных этапах работ.

Сформированный таким образом перспективный план рассчитан на 3–5 летний период и содержит следующие направления:

1. Проведение фундаментальных и прикладных исследований в области эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК) – разработка методов получения ЭСК, первичное и длительное культивирование, создание клеточных линий, идентификация ЭСК в культуре и дифференцировка, организация криобанка репродуктивных клеток.

2. Изучение дифференцировочных потенциалов мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и возможностей использования полученных клеточных культур для трансплантации – отработка технологии выделения МСК из различных источников, изучение дифференцировочных потенциалов культивируемых МСК, разра-

ботка технологии применения МСК при различных заболеваниях, изучение условий обеспечения безопасности клеточной терапии.

3. Исследование и направленная модификация свойств полипотентных стволовых клеток человека и животных в условиях нормы и патологии, старения физиологического и ускоренного в разных возрастных группах с целью изучения возможности существенного приостановления процесса старения организма и увеличения периода активной жизнедеятельности.

4. Использование клеточных технологий для диагностики и лечения онкологических, гематологических, иммунологических заболеваний.

5. Заготовка, консервация и хранение клеток пуповинной крови для проведения аллогенной/аутологичной трансплантации гемопоэтических клеток предшественников.

6. Использование клеточных технологий в репаративной и корригирующей терапии заболеваний нервной системы.

7. Комплексное изучение возможности применения в клинике клеточной терапии с использованием прогениторных и дифференцированных клеток для лечения сахарного диабета и его осложнений.

8. Комплексное изучение клинических перспектив клеточной терапии заболеваний сердца.

9. Изучение влияния СК на больных с экзо- и эндотоксикозами, оценка возможностей стволовых клеток в заместительной терапии зависимостей разного генеза.

На основании перспективного плана научных исследований формируются годовые планы, которые ежегодно выносятся на утверждение ученым советом института и под которые будет рассчитываться финансирование.

Утверждение годовых тем предполагается производить на конкурсной основе с учетом соответствия перспективным направлениям научно-исследовательских работ института, сформированного научного коллектива, необходимой материальной и лабораторной базы, ожидаемых результатов и так далее.

Под выполнение конкретной работы может создаваться временный научный коллектив, куда могут входить не только штатные сотрудники института.

Исходя из изложенных направлений научных исследований, организационная структура научной части института сформирована в четыре отдела, объединяющих лаборатории, работающие в одном научно-исследовательском цикле или в одной проблематике, и пять самостоятельных лабораторий, тематика исследований которых представляет на данный момент самостоятельное направление, хотя в дальнейшем не исключена их интеграция в составе существующих или новых отделов:

1. Отдел репродуктивных технологий с банком репродуктивных клеток.

2. Отдел онкологии, гематологии и трансплантации с банком пуповинной крови, который входит в состав отдела только на этапе организации и в последующем, безусловно, станет самостоятельным подразделением, стратегически крайне важным для обеспечения научной и практической деятельности института.

3. Отдел клеточных технологий в неврологии и нейрохирургии.

4. Отдел геронтологии и гериатрии.

5. Лаборатория молекулярных медицинских технологий.

6. Экспериментальная лаборатория биотехнологий.

7. Лаборатория гематотоксикологии.

8. Лаборатория эндокринных заболеваний.

9. Лаборатория клеточной терапии зависимостей химической и нехимической природы.

Сформированный в составе перечисленных лабораторий и отделов научный коллектив укомплектован высококвалифицированными специалистами. Участие в работе коллектива подтвердили два члена-корреспондента РАМН, семь докторов наук, девять кандидатов.

Кроме перечисленных подразделений, для проведения полноценных научных исследований и экспериментов в институте планируется создание собственного вивария, обустроенного и оснащенного в соответствии с современными требованиями.

Совершенно очевидно, что для реализации запланированных исследований и получения научных результатов с последующим их практическим применением институту необходима серьезная материальная база. Безусловно, было бы непрактичным и расточительным отказаться от использования уже существующего в научных учреждениях и учреждениях здравоохранения области потенциала в той части, в какой имеющееся оборудование и оснащение могут быть применены для исследований в области клеточных технологий. В частности, значительная часть работ отдела онкологии, гематологии и трансплантации может быть выполнена на базе построенного по инициативе губернатора Свердловской области центра онкологии и гематологии в областной детской клинической больнице, оснащенного самым современным оборудованием для проведения трансплантационных технологий.

Однако в перспективе, говоря о развитии института клеточных технологий и как учреждения здравоохранения, и как важнейшего научно-практического направления, необходимо планировать строительство собственной научной и клинической базы.

Обобщая перспективные направления научных исследований института и опираясь на имеющийся научный кадровый потенциал, можно сделать однозначный вывод о формировании на уровне регионального здравоохранения серьезной научно-практической единицы, способной внести существенный вклад в развитие медицинской науки в области клинического применения клеточных технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцев А.Г. / Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. – М.: ИД Медпрактика-М. – 2005. – 392 с.

2. Румянцев А.Г., Масчан А.А. / Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. – М. – МИА. – 2003. – 912 с.

3. Чертков И.Л., Дризе Н.И. // Вестн. Росс. АМН. – 2005. – № 10. – С. 37–43.

4. Lee M.S., Lill M., Makkar R.R. // Rev. Cardiovasc. Med. – 2004. – Vol. 5. – P. 82 – 98.

5. Shapiro AMJ., Lakey JRT., Ryan EA. et al. // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 343. – P. 230 – 238.

6. Wollert K.C., Meyer GP., Lotz J. Et al. // Lancet. – 2004. – Vol. 364. – P. 141 – 148.

S.L. Leontev

PERSPECTIVE DIRECTIONS OF SCIENTIFIC RESEARCHES OF INSTITUTE OF MEDICAL CELLULAR TECHNOLOGIES

Institute of medical cellular technologies, Ekaterinburg

Within last several years a number of research groups was received with encouraging results concerning an opportunity of use of cellular therapy in clinic. The agiotage around of this subjects has resulted became the reason of the big number of gamble. In Sverdlovsk area State establishment of public health services « Institute of medical cellular technologies » is created. Into problems of institute enters, including counteraction by competent examination to distribution scientific-unreasonable, hazardous to health methods of cellular therapy. Perspective directions of scientific researches of institute and its scientific personnel potential allow to draw a conclusion on formation of the serious scientifically-practical unit, capable to bring the essential contribution to development of a medical science in the field of clinical applications of cellular technologies.

В.В. Базарный, А.П. Ястребов, В.Н. Мещанинов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИММУНОЦИТОТЕРАПИИ НАРУШЕНИЙ КРОВЕТВОРЕНИЯ

ГУЗ «Институт клеточных медицинских технологий»,

Уральская государственная медицинская академия, г. Екатеринбург

Иммуноцитотерапия – лечебное использование иммунокомпетентных клеток (ИКК) – относится к наиболее «научноёмким» лечебным технологиям, начало которой положили пересадки костного мозга. В настоящее время она включает широкий круг вопросов, связанных с созданием вакцин (например основанных на использовании дендритных клеток), адоптивной иммунотерапией (лечебное применение эффекторных клеток, в частности LAK-, CIK-, TIL-терапия) и других. Одним из ее направлений является воздействие на репаративный потенциал ткани. Это стало возможным благодаря открытой у ИКК, прежде всего – лимфоцитов, морфогенетической функции [1]. Она заключается в способности лимфоидных клеток транспортировать регенераторную информацию в условиях адоптивного переноса. Перспективы лечебного использования данного феномена требуют уточнения, что и определило цель нашей работы – оценить эффективность трансплантации лимфоцитов различного происхождения на состояние костно-мозгового кроветворения на примере экспериментальной железодефицитной анемии (ЖДА).

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 48 крысах-самцах породы Вистар. ЖДА моделировали путем повторных кровопусканий, введения железосвязывающего комплекса десферал и содержанием животных на обедненной железом диете. У животных определяли стандартные показатели кроветворения: число миелокариоцитов, миелограмма, общеклинический анализ крови с подсчетом ретикулоцитов, а также уровень сывороточного железа и общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС) бетафенантролиновым способом с использованием тест-систем «Лахема» [2]. Для оценки синтетических процессов оценивали включение меченого 3H-тимидина в миелокариоциты [3]. Результаты выражали в беккерелях на 1 млн клеток. Данный фрагмент исследования выполнен совместно с проф. О.Г. Макеевым.

После развития у крыс ЖДА им с целью коррекции вводили лимфоциты доноров следующих групп:

- 1) интактные тимоциты,
- 2) тимоциты, полученные от животных, подвергнутых гипоксическому воздействию в течение шести часов в барокамере приточно-вытяжного типа

с разряжением воздуха до 40 КПа, что индуцирует появление у клеток «эритропоэзстимулирующих» свойств [4],

3) смесь из равных частей тимоцитов и спленоцитов от животных, полученным аналогичным способом,

4) тимоциты интактных животных, преинкубированные в течение двух часов перед трансплантацией в культуральной среде, содержащей неспецифический митоген – ФГА.

Трансплантацию донорских клеток реципиентов осуществляли в асептических условиях в каудальную вену в количестве 100×10^6 лимфоцитов на 100 г массы животного. Влияние трансплантации на кроветворение оценивали через 72 часа.

Статистическую обработку результатов осуществляли стандартными способами вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение

Трансплантация интактных тимоцитов, как было показано нами в предварительных экспериментах и частично – в данном исследовании, не вызвала существенных изменений кроветворения у нормальных и «железодефицитных» реципиентов. Под влиянием «гипоксических» тимоцитов отчетливо видны признаки стимуляции эритропоэза. Это проявляется увеличением числа эритроидных клеток в костном мозге, что сопровождается усилением в нем синтетических процессов (табл. 1). Одновременно увеличилась концентрация гемоглобина и содержание ретикулоцитов в периферической крови. Внесение в «трансплантат» селезеночных клеток существенно не изменило эритропоэтический эффект, а степень ответа у реципиентов была даже несколько ниже. Это указывает скорее всего на то, что преимущественную роль в стимуляции эритропоэза играют молодые Т-лимфоциты, которые составляют основную часть клеток, полученных из тимуса. Взвесь спленоцитов крысы состоит примерно из равных частей Т- и В-клеток. Вероятно, В-лимфоцитам не присуща подобная эритропоэзстимулирующая активность, чем и обусловлен результат трансплантации.

Обработка тимоцитов ФГА также вызывала у них появление эритропоэтических свойств. В частности, число ретикулоцитов в крови увеличилось практически в два раза в сравнении с контролем. Возможно, это связано с тем обстоятельством, что под

Показатели кроветворения у «железодефицитных» реципиентов лимфоцитов

Показатели	Донорские лимфоциты			
	Интактные тимоциты	«Гипоксические» тимоциты	«Гипоксические» тимоциты + спленоциты	ФГА-активированные тимоциты
Костный мозг				
Миелокарициты, 10 ⁶ /бедро	56,2±3,4	67,3±5,1*	62,8±2,3	64,2±1,5*
Эритроидные клетки	29,2±2,5	33,0±4,2	34,1±1,8	36,9±2,9*
Включение ³ H-тимидина, Бк/1 млн клеток	254,0±16,0	452,0±14,3*	397,5±17,2*	388,2±29,3*
Периферическая кровь				
Гемоглобин, г/л	95,1±2,0	122,0±3,6	123,0±4,1	131,0±6,0
Ретикулоциты, 10 ⁹ /л	127,9±19,3	169,9±11,8*	151,7±21,0	240,7±11,0*

влиянием данного митогена усиливается продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками, в том числе – и обладающих бурстпромоторной активностью.

Следует отметить, что под влиянием трансплантации ИКК существенно не изменились показатели обмена железа у крыс с ЖДА. Вероятно, это можно объяснить усилением утилизации депонированного железа, обеспечивающего гемоглобинизацию эритроцитов.

Таким образом, у «железодефицитных» реципиентов после трансплантации «гипоксических» или ФГА-активированных лимфоцитов нормальных доноров через 72 часа после трансплантации клеток отмечается стимуляция эритропоэза. Последнее связано с миграцией трансплантируемых лимфоцитов в костный мозг, где происходит их межклеточная кооперация с кроветворными предшественниками при участии цитокинов [5, 6].

Следовательно, трансплантация активированных лимфоцитов оказывает влияние на функциональную активность костного мозга, в значительной степени – через взаимодействие со стволовыми кроветворными клетками, что может рассматриваться как один из потенциальных способов ее регуляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза [Текст]/А.Г. Бабаева. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
2. Клиническая лабораторная аналитика. Том 2. [Текст]: справочник //Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабинформ-РАМЛД. – 1999. – 352 с.
3. Макеев О.Г. Применение радионуклидов для характеристики регенерации тканей при повреждении [Текст] / О.Г. Макеев//Применение радионуклидов и ионизирующих излучений в народном хозяйстве и научных исследованиях: Сб. научн. тр. – Свердловск, 1983. – С. 59 – 60.
4. Об участии клеточных систем иммунитета в регенерации при экстремальных воздействиях

[Текст]/ М.В. Попугайло, А.М. Наливайко, Е.С. Тихачек, В.В. Базарный// Механизмы аварийного регуляции и адаптации при действии на организм экстремальных факторов. Сб. научн. трудов. – Свердловск: СГМИ, 1984. – С. 20 – 25.

5. Regulation of hematopoiesis in vitro and in vivo by invariant NKT cells [Text]/

I. Kotsianidis, J.D. Silk, E. Spanoudakis, S. Patterson et al.//

Blood. – 2006. – Vol. 107. – P. 3138 – 3144.

6. Prospective isolation and global gene expression analysis of the erythrocyte colony-forming unit (CFU-E) [Text]/G. Terszowski, C. Waskow, P. Conradt, D. Lenze et al.//Blood. – 2005, Vol. 105. – P.1937 – 1945.

V.V. Bazarny, A.P. Yastrebov,

V.N. Meschaninov

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION FOR IMMUNOCYTOTHERAPY OF BLOOD DISORDERS

The defect response to hypoxic stimulus has been demonstrated for lymphoid cells of rats with iron deficiency anemia. The impaired erythropoietic effect of lymphocytes was restored after pre-activated lymphocytes transplantation was demonstrated.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫХ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Кафедра клинической лабораторной и микробиологической диагностики Уральской государственной медицинской академии, ГУЗ МЗ СО «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург

Введение

Воздействие ростовых и дифференцировочных факторов на клетку-мишень, взаимодействие ферментов с субстратами и ингибиторами, гормонов с рецепторами, антител с антигенами сопровождается образованием комплексов между рецептором и лигандом. Это в полной мере относится к механизмам внутриклеточной регуляции, к взаимодействию клеток на локальном, тканевом уровне и на уровне координации работы целого многоклеточного организма. Выяснение механизмов таких взаимодействий и установление участвующих в них веществ имеет не только ценное теоретическое значение, оно важно и с практической точки зрения. Например, одним из этапов создания современных лекарственных препаратов является скрининг веществ-кандидатов, основанный на эффективности их связывания с целевой молекулой-рецептором [19].

Типичными проблемами при изучении связывания лиганда рецептором являются определение энергии взаимодействия и геометрии взаимного расположения лиганда и рецептора в связанном состоянии. Для изучения строения комплексов применяются в основном кристаллографические методы, например рентгеноструктурный анализ, нейтронография, а также варианты метода ядерного магнитного резонанса. Однако проведение прямых экспериментов и измерений имеет существенные ограничения. Эти ограничения определяются разрешающей способностью существующих методов детекции физического сигнала. С другой стороны, лавинообразное увеличение информации о доступных химических соединениях и способах их взаимодействия делает практически невозможным детальное и исчерпывающее описание изучаемых систем на основе только экспериментального подхода. Поэтому по мере роста имеющейся в распоряжении исследователей экспериментальной информации все большую актуальность приобретают методы компьютерного молекулярного моделирования.

Наиболее точную оценку при компьютерном моделировании молекулярных взаимодействий дают методы квантовой механики (химии). Однако при существующих алгоритмах квантовой механики и возможнос-

тях компьютерной техники получить исчерпывающую информацию о химических структурах с числом атомов больше нескольких десятков не удается. Поэтому наибольшее распространение в настоящее время получил метод молекулярной механики, или силового поля. В этом подходе взаимодействия между атомами описываются набором соответствующих параметров и функций, связывающих конкретную пространственную конфигурацию молекул с отвечающей ей энергией. В дальнейшем изложении все описываемые методы используют модель силового поля.

Методы молекулярной динамики часто помогают найти подходы к установлению механизмов связывания лигандов и рецепторов, особенно в сложных случаях [7, 8]. Однако геометрические данные, полученные в ходе молекулярно-динамического моделирования, все же являются усредненными. Они не дают ответа на вопрос, каковы наиболее вероятные мгновенные конфигурации составляющих комплекс молекул. Такие данные, однако, крайне необходимы в изучении механизмов взаимодействия рецепторов с лигандами. Для решения таких задач применяются методы молекулярного докирования. В этом подходе, в отличие от методов молекулярной динамики, более полно и независимо исследуются конформационные пространства лиганда и рецептора в ходе их взаимодействия. Кроме того, докирование позволяет применять энергетические функции, точнее описывающие геометрию комплекса по сравнению с их аналогами, используемыми в молекулярной динамике.

Одной из наиболее широко используемых в научных исследованиях программ молекулярного докирования является [11], которая с успехом применена в известном проекте по поиску препаратов для антиретровирусной терапии [20]. В AutoDock 3.0 лиганд моделируется как конформационно подвижный, а рецептор – ригидный, что обеспечивает необходимый баланс скорости и аккуратности моделирования при отсутствии крупных конформационных изменений рецептора при взаимодействии с лигандом. Целью данной работы была проверка способности этой программы в решении конкретных задач лиганд-рецепторных взаимодействий различной сложности.

Материалы и методы

Для исследования были отобраны три хорошо изученных комплекса в виде их кристаллографических моделей, взятых из Protein Data Bank (PDB) [3]. Это комплекс лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с ингибитором фермента оксаматом (код 1ldm [1, 18]), комплекс ферредоксинредуктазы с фрагментом кофермента никотинамидадениннуклеотидфосфата (НАДФ+) – аденозин-2',5'-дифосфатом (2',5'-АДФ) (код 1fnc [4]), а также комплекс каталазы с восстановленным коферментом никотинамидадениннуклеотидфосфатом (НАДФН) (код 7cat [6]).

Выбор комплекса лактатдегидрогеназы с оксаматом определяется простотой строения ингибитора. Этот комплекс подробно изучен и положение ингибитора в нем не вызывает сомнений [1, 18].

Комплекс каталазы и НАДФН интересен сложностью и большим разнообразием взаимодействий между ферментом и кофактором. Это обусловлено особенностями химического строения и большой конформационной подвижностью НАДФН (в молекуле насчитывается до 18 связей, относительно которых возможно свободное вращение атомных групп).

В комплексе с ферредоксинредуктазой связана молекула 2',5'-АДФ, отличающаяся сложностью строения и разнообразием атомных групп, однако более простая по сравнению с НАДФН. Результаты моделирования этого комплекса использовали также для оценки адекватности компьютерной симуляции каталазного комплекса, поскольку 2',5'-АДФ является фрагментом НАДФН.

Кристаллографические комплексы содержат информацию не только о координатах белкового компонента и «целевого» лиганда, но также данные о положении атомов еще нескольких соединений – воды, других лигандов и буферных веществ. Поэтому сначала для каждого из отобранных комплексов выделяли по отдельности данные для апобелка и интересующих нас лигандов, данные о других соединениях в дальнейшем моделировании отбрасывали.

Подготовку молекул апобелков и лигандов проводили с помощью программы AutoDockTools 1.1 [15]. Формы протонирования лигандов и аминокислотных остатков выбирали в соответствии с условиями выделения комплексов при кристаллографических исследованиях и константами диссоциации компонентов.

Кристаллы лактатдегидрогеназы были получены при рН=5,5 [1, 18]. Поэтому все карбоксилатные группы, включая оксамат, оставляли отрицательно заряженными, а аминогруппы – положительно заряженными. Остатки гистидина, за исключением гистидина-193, участвующего в связывании оксамата, моделировали в бипротонированной положительно заряженной форме. Правильная ориентация лактата в ходе катализа, так же как и оксамата в непродуктивном комплексе, возможна только в присутствии заряженной бипротонированной формы гистидина-193 (дельта-эпсилон таутомер). Однако для проверки способности AutoDock к

правильному распознаванию оптимальной геометрии комплекса в соответствии с формой протонирования этого ключевого для связывания лиганда аминокислотного остатка рецептора были приготовлены три формы аполактатдегидрогеназы. Они различались только по расположению водорода на гистидине-193 – в первом случае это был дельта-гистидин, во втором – эпсилон-таутомер, в третьем – положительно заряженная дельта-эпсилон форма.

Ферредоксинредуктазный комплекс был выделен при рН=4,6 [4]. Поэтому все аминные группы аминокислотных остатков рассматривали в протонированной, положительно заряженной форме. Остатки гистидина моделировали в бипротонированной форме с общим зарядом +1. Хотя значения рКа для аспартата и глутамата в воде составляют соответственно 3,70 и 4,30 единиц рН и близки к условиям кристаллизации, карбоксилатным группам этих остатков была приписана депротонированная отрицательно заряженная форма. Обе фосфатные группы 2',5'-АДФ были протонированы в одном положении каждая с общим зарядом на молекуле, равном -2.

Комплекс каталазы с НАДФН был получен при рН=8,8 [6]. В соответствии с условиями выделения карбоксилатные группы аминокислотных остатков оставляли депротонированными, отрицательно заряженными, а аминные – в протонированной, положительно заряженной форме. Поскольку гем был удален из структуры комплекса, остаток тирозина-357, координированный в холо-ферменте с атомом железа гема и депротонированный по фенольной группе, моделировался в нейтральной ОН-форме. На основе данных по участию в катализе и связыванию лигандов остаткам гистидина были приписаны следующие формы протонирования – гистидины-174, 234, 304 – дельта, гистидин-361-дельта-эпсилон (бипротонированный), остальные остатки гистидина – в эпсилон форме. НАДФН и 2',5'-АДФ были полностью депротонированы по всем фосфатным группам с общими зарядами на молекулах, равными -4.

Аминокислотные остатки, находящиеся на концах белковых цепей, рассматривали как терминальные в соответствующей форме протонирования – аминной, положительно заряженной, на N-конце и карбоксилатной, отрицательно заряженной, на C-конце.

Заряды на атомах аминокислотных остатков для всех комплексов определяли согласно параметризации Коллмана. Заряды на атомах НАДФН и 2',5'-АДФ для различных форм протонирования определяли в соответствии с данными, любезно предоставленными профессором У. Райдом [10, 12, 13]. Для оксамата атомные заряды вычисляли с помощью программы RESP [2, 5] в одностадийном варианте с ограничением на их равенство на атомах водорода в аминной и атомах кислорода в карбоксилатной группах соответственно. Вычисление электростатического потенциала для программы RESP проводили с помощью программы GAMESS US

[9, 16] по схеме Мерца-Колманна в соответствии с рекомендациями [17] для оптимизированной структуры этого соединения. Первичную 3D-модель аниона оксамата получили с помощью программы CORINA [14] на общедоступном сервере Эрлангенского университета [21]. Затем геометрию этой модели оптимизировали с помощью программы GAMESS US. Вычисление электростатического потенциала и оптимизацию геометрии проводили с использованием ограниченной волновой функции Хартри-Фока и базисного набора 6-31G+ +**.

В качестве стартовой конформации всегда использовали кристаллографическую геометрию комплексов, то есть в начале каждого эксперимента рецептор и лиганд находились в пространственной форме и положении, которое они занимают в комплексе.

Моделирование кристаллографического комплекса проводили только для находящейся в активном центре фермента молекулы оксамата с возможностью вращения атомных групп вокруг всех связей, допускающих такое движение.

При моделировании ферредоксинредуктазного комплекса были использованы две формы кристаллографической конформации «А» 2',5'-АДФ – полностью свободная по вращаемым связям и полностью ригидная.

Моделирование связывания НАДФН в каталазе проводили в трех сериях экспериментов. В первой серии докировали всю молекулу кофермента либо в полностью свободной по вращаемым связям форме, либо в полностью ригидной форме. Большая конформационная подвижность НАДФН может привести к недостаточно полному отбору конформаций кофермента в ходе компьютерной симуляции. Для преодоления этой трудности во второй серии экспериментов адениновый фрагмент НАДФН (2',5'-АДФ) оставляли ригидным в его кристаллографической конформации, а никотинамидный – свободным. Наконец, в третьей серии изучили два варианта моделирования 2',5'-АДФ – в полностью свободной по вращаемым связям форме и полностью ригидной форме.

Для расчета энергии взаимодействия между лигандом и рецептором при образовании ими комплекса в AutoDock использовали кубическую решетку размером 61*61*61 точек с расстоянием между точками 0,375 ангстрема, центрированную в точке, совпадающей с центром координат лиганда в его кристаллическом комплексе с рецептором. При учете электростатического взаимодействия использовали зависящую от расстояния диэлектрическую функцию.

Моделирование проводили по оптимизированной процедуре поиска – ламарковскому генетическому алгоритму с локальной оптимизацией в соответствии с измененной процедурой по Солису и Веттсу. В наших экспериментах использованы одни и те же значения параметров программы для всех изученных комплексов – в одном цикле (генерации) – 50 конформаций лиганда с выходом только одной конформации в следующую генерацию, всего 27 000 генераций и 2 500 000 оценок энергии.

Поскольку алгоритм основан на случайном поиске, необходимым условием успешного моделирования является сходимость полученных результатов. Поэтому для каждого комплекса применяли десять одинаковых по заданным параметрам поисков. Далее программа проводила кластерный анализ. Сначала из десяти результирующих конформаций отбиралась одна с минимальной энергией. Затем вычислялись парные среднеквадратические отклонения (СКО) координат одинаковых атомов этой конформации и девять остальных. Если СКО между первой и какой-то другой конформациями не превышала 0,5 ангстрема, эти конформации объединялись в один кластер. Таким образом, кластер определялся как группа, состоящая не менее чем из двух конформаций с СКО между первой и каждой из остальных конформаций не более 0,5 ангстрема. Если первый кластер содержал меньше десяти конформаций или конформация с минимальной энергией имела СКО более 0,5 ангстрема с остальными конформациями, кластерный анализ проводился по аналогичной схеме до перебора всех возможных оставшихся комбинаций конформаций. В итоге критерием сходимости поиска являлось получение кластера, содержавшего конформацию с минимальной для всех запусков энергией. Чем больше конформаций было в этом кластере, тем лучше была сходимость. Поиск считался успешным, если удавалось получить кластер, содержавший конформацию лиганда с минимальной энергией его взаимодействия с рецептором, такой, что парные СКО между кристаллографической и содержащимися в этом кластере конформациями лиганда были меньше или равны 1 ангстрему.

Остальные параметры программы имели принятые по умолчанию значения.

Результаты

Лактатдегидрогеназа.

При моделировании оксамата в активном центре лактатдегидрогеназы для эпсилон-дельта формы гистидина-193 наблюдается полная сходимость поиска – все конформации оксамата принадлежат единственному кластеру с практически одинаковыми значениями энергии (-7,42...-7,43 ккал/моль), а среднее значение СКО относительно экспериментальной конформации составляет 0,72 ангстрема. Это значение является также минимальным для трех симуляций. В результате компьютерного встраивания оксамата в активный центр лактатдегидрогеназы с эпсилон-таутомером также получен только один кластер конформаций ингибитора. При этом среднее значение СКО между этими конформациями и положением оксамата в кристаллографическом комплексе (0,77 ангстрема) вполне удовлетворительно, но несколько выше, чем в первом случае. Наконец, для дельта-протонированного гистидина-193 ситуация неудовлетворительна. Здесь имеются три кластера с практически одинаковыми и пересекающимися (-6,15...-6,17 ккал/моль для перво-

го, -6,15...-6,16 ккал/моль для второго и -6,10 ккал/моль для третьего кластера) значениями энергии взаимодействия лиганда и рецептора. Средние значения СКО между кристаллографической и входящими в эти кластеры конформациями оксамата слишком велики (для первого – 1,75, для второго – 7,21, для третьего – 1,86 ангстрема соответственно). В этом варианте моделирования единственная конформация ингибитора с удовлетворительным значением СКО относительно экспериментального положения (0,95 ангстрема) имеет максимальную (наихудшую, -0,95 ккал/моль) энергию взаимодействия с ферментом. Таким образом, при компьютерном встраивании оксамата в активный центр лактатдегидрогеназы с дельта-гистидином-193 оказалось невозможным воспроизвести кристаллографическую геометрию комплекса.

Ферредоксиредуктаза.

Компьютерное моделирование ригидной молекулы 2',5'-АДФ в сайте ее связывания в ферредоксиредуктазе привело к однозначному предсказанию геометрии комплекса с группировкой всех конформаций в одном кластере с одинаковой энергией их взаимодействия с рецептором, равной -12,50 ккал/моль. Для девяти первых конформаций СКО по отношению к кристаллографической конформации «А» этого кофермента, выбранной для симуляции, было равно 0,38 ангстрема, для десятой – 0,39 ангстрема.

Результаты симуляции связывания полностью подвижной по вращаемым связям 2',5'-АДФ в ферредоксиредуктазе неоднозначны. Для десяти полученных конформаций энергии взаимодействия различаются незначительно (-11,87...-11,48 ккал/моль). Здесь обнаружен только один кластер из трех конформаций с удовлетворительным значением СКО (0,96 ангстрема для каждой из трех). Однако значения энергии взаимодействия этих конформаций с рецептором лежат в пределах -11,73...-11,68 ккал/моль (2, 3, 4 места соответственно). Геометрия двух конформаций сильно отличается от кристаллографической. Одна из них – с минимальной энергией взаимодействия с ферментом – имеет СКО по отношению к кристаллографической конформации «А» 5,69 ангстрема, а вторая – соответственно 2,99 ангстрема (с энергией взаимодействия -11,71 ккал/моль – 6 место). Остальные модельные конформации заполняют пространство между кристаллографическими конформациями «А» и «В» в комплексе с ферредоксиредуктазой, но и не достигают положения конформации «В».

Каталаза.

НАДФН. Компьютерная симуляция связывания ригидной молекулы НАДФН в соответствующем участке каталазы была полностью успешной. В результате получен один кластер с одинаковыми для всех конформаций значениями энергии взаимодействия (-13,82 ккал/моль) и СКО (0,25 ангстрема).

Моделирование полуригидной формы НАДФН с полностью свободными вращаемыми связями для никотинамидной части молекулы и неподвижным адеиновым фрагментом также было успешным. Здесь выявлены два кластера, один содержит четыре конформации, включая и конформацию с минимальной энергией взаимодействия с рецептором (-14,24 ккал/моль), а другой – две конформации. Значения СКО для конформаций в первом кластере по отношению к кристаллографической конформации лежат в пределах 0,62...0,68 ангстрема, а соответствующие значения для второго кластера находятся в диапазоне 1,30...1,31 ангстрема. Между первым и вторым кластерами находятся две одиночные конформации со значениями СКО соответственно 0,67 и 0,79 ангстрема. Интересно, что значения энергии взаимодействия этих двух конформаций с рецептором (-14,14 ккал/моль для одной и -14,10 ккал/моль для другой) перекрываются с соответствующими энергиями для первого кластера (-14,24...-14,10 ккал/моль). При этом общий для этих шести конформаций диапазон энергии взаимодействия с рецептором отличается от соответствующих энергий для остальных четырех конформаций, для которых также обнаружено перекрывание энергетических диапазонов (-13,67...-12,83 ккал/моль для второго кластера и -13,34 и -12,83 ккал/моль соответственно для оставшихся двух одиночных конформаций). Визуальный анализ геометрии результирующих конформаций показал, что здесь на самом деле имеется два кластера, причем один – из шести первых конформаций – обладает минимальной энергией взаимодействия с рецептором и минимальными значениями СКО, а другой, содержащий четыре оставшиеся конформации, имеет худшие результирующие параметры.

Эксперимент по симуляции связывания полностью свободного по вращаемым связям НАДФН дал отрицательные в смысле воспроизведения кристаллографической геометрии комплекса результаты. Здесь не получен ни один кластер, диапазон значений СКО лежит в интервале 0,83...4,97 ангстрема. Хотя для конформации с минимальной энергией взаимодействия с рецептором (-14,73 ккал/моль) значение СКО также минимально (0,83 ангстрема), в целом для всех десяти конформаций имеется значительное несоответствие между энергиями взаимодействия и отклонением полученных конформаций от кристаллографического положения. Так, для конформации со вторым минимальным СКО (1,78 ангстрема) энергия взаимодействия составляет -11,19 ккал/моль, а вторая и третья по энергии взаимодействия с рецептором конформации лиганда (-14,45 и -14,43 ккал/моль) имеют СКО соответственно 3,91 и 3,74 ангстрема. Таким образом, на основе полученных результатов становится невозможным отбор правильной конформации без знания о ней *a priori*.

2',5'-АДФ. Компьютерное встраивание ригидной формы 2',5'-ADP в соответствующий участок каталазы дало обескураживающие результаты. Получен один

кластер с одним значением энергии взаимодействия лиганда с рецептором (-9,15 ккал/моль) и близкими значениями СКО относительно кристаллографической конформациями лиганда (3,01 – 3,02 ангстрема). Это единственный случай из всей серии компьютерных экспериментов, когда ригидная молекула лиганда занимала на рецепторе совершенно отличное от кристаллографического положение.

При моделировании полностью свободной молекулы 2',5'-ADP в каталазе выявлен лишь один кластер из пяти конформаций со значениями энергии их взаимодействия с рецептором -11,83...-11,38 ккал/моль, находящимися далеко от кристаллографического положения. Значения СКО между этими и кристаллографической конформациями находятся в диапазоне 2,75 – 2,86 ангстрема – это минимальные СКО для всех 10 результирующих конформаций. Конформация с минимальной энергией (-12,54 ккал/моль) имеет значение СКО по отношению к кристаллографическому положению этого фрагмента, равное 5,67 ангстрема.

Обсуждение

Для наиболее простого комплекса лактатдегидрогеназы и оксамата получено не только корректное положение ингибитора в центре его связывания ферментом, но также правильно определены предпочтения связывания по величине энергии взаимодействия в зависимости от формы протонирования ключевого для правильной ориентации субстрата остатка гистидина-193.

В случае более сложного комплекса ферредоксинредуктазы результаты менее однозначны. Если ригидная конформация 2',5'-АДФ в результате моделирования лишь незначительно отклоняется от кристаллографического положения, то для полностью свободной молекулы этого лиганда выбрать правильную кристаллографическую конформацию на основе полученных значений энергии и результатов кластеризации становится невозможным. В самом деле в этом случае имеется очень большой разброс среднеквадратических отклонений полученных конформаций от кристаллографического положения при очень слабом различии в энергиях взаимодействия между рецептором и модельными конформациями лиганда. В этих условиях даже наличие кластера из трех конформаций является очень ненадежным критерием выбора в пользу правильной геометрии. Кроме того, большой разброс модельных положений 2',5'-АДФ в промежутке между кристаллографическими положениями «А» и «В» этого лиганда и отсутствие кластеризации модельных конформаций в этих экспериментальных положениях – кристаллографической конформации «В» не соответствует вообще ни одна модельная форма – может свидетельствовать о неполной адекватности энергетической функции AutoDock в оценке взаимодействия фосфатных групп этого лиганда с соответствующим белковым окружением.

Еще большее усложнение взаимодействующих систем, наблюдаемое в случае комплекса каталазы и НАДФН, при моделировании приводит к неудовлетворительным результатам. Действительно, хотя докирование полностью ригидного НАДФН в каталазу привело к замечательному совпадению с кристаллографической картиной, встраивание полностью подвижного по вращаемым связям кофермента оказалось неудовлетворительным. Кроме того, моделирование не только свободной, но и полностью ригидной молекулы 2',5'-АДФ в сайте связывания каталазы оказалось unsuccessful. Полученные результаты могут указывать на неспособность энергетической функции AutoDock 3.0 учитывать сложный баланс взаимодействий между ферментом и лигандом в этом комплексе. Вероятно, связывание НАДФН каталазой характеризуется большим количеством близких конформаций кофермента, а кристаллографическая картина отражает лишь усреднение по положению этих конформаций на белке. В кристаллографической модели этого комплекса кофермент, а также атомы белка, контактирующие с НАДФН, имеют высокие показатели тепловой подвижности (средняя величина В-фактора для них составляет 50,21 квадратных ангстрем). Кроме того, существует прямое указание авторов модели на неопределенность положения 2'-фосфата аденинового фрагмента НАДФН, а НАДФН в этом комплексе находится в необычной, свернутой конформации [6].

Увеличение сложности моделируемых комплексов привело к нарастающему отклонению полученных с помощью AutoDock 3.0 конформаций от параметров кристаллографических моделей взаимодействий лигандов с рецепторами. Преодоление такой ситуации требует разработки специализированной энергетической функции.

Благодарности

Авторы выражают глубокую признательность профессору Стокгольмского университета У. Райду за предоставление данных об атомных зарядах никотинамидных коферментов и статей, описывающих использование этих данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. J. Adams, A. Liljas, M. G. Rossmann. Functional Anion Binding Sites in Dogfish M4 Lactate Dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology*, 1973, vol. 76, pp. 519–531.
2. C.I. Bayly, P. Cieplak, W.D. Cornell, P.A. Kollman. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints For Determining Atom-Centered Charges: The RESP Model. *Journal of Physical Chemistry*, 1993, vol. 97, pp. 10269–10280.
3. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, pp. 235–242.

4. C. M. Bruns, P. A. Karplus. Refined Crystal Structure of Spinach Ferredoxin Reductase at 1.7 Å Resolution: Oxidized, Reduced and 2'-Phospho-5'-AMP Bound States. *Journal of Molecular Biology*, 1995, vol. 247, pp. 125–145.

5. W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, and P.A. Kollman. Application of RESP Charges to Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. *Journal of American Chemical Society*, 1993, vol. 115, pp. 9620–9631.

6. I. Fita, M. G. Rossmann. The NADPH binding site on beef liver catalase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, vol. 82, pp. 1604–1608.

7. R. Friedman, E. Nachliel, M. Gutman. Molecular Dynamics Simulations of the Adipocyte Lipid Binding Protein Reveal a Novel Entry Site for the Ligand. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, pp. 4275–4283.

8. R. Friedman, E. Nachliel, M. Gutman. Fatty Acid Binding Proteins: Same Structure but Different Binding Mechanisms? *Molecular Dynamics Simulations of Intestinal Fatty Acid Binding Protein*. *Biophysical Journal*, 2006, vol. 90, pp. 1535–1545.

9. M.S.Gordon, M.W.Schmidt. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. In *Theory and Applications of Computational Chemistry, the first forty years*. C.E.Dykstra, G.Frenking, K.S.Kim, G.E.Scuseria, Elsevier, Amsterdam, 2005.

10. N. Holmberg, U. Ryde, L. Bulow. Redesign of the Coenzyme Specificity in L-Lactate Dehydrogenase from *Bacillus Stearothermophilus* Using Site-Directed Mutagenesis and Media Engineering. *Protein Engineering*, 1999, vol. 12, No. 10, pp. 851–856.

11. G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry*, 1998, vol. 19, pp. 1639–1662.

12. U. Ryde. Molecular Dynamics Simulations of Alcohol Dehydrogenase with Varying Coordination Number of the Catalytic Zinc Ion. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1995, vol. 21, pp. 40–50.

13. U. Ryde. On the Role of Glu—68 in Alcohol Dehydrogenase. *Protein Science*, 1995, vol. 4, pp. 1124–1132.

14. J. Sadowski, C.H. Schwab, J. Gasteiger 3D Structure Generation and Conformational Searching. In *Computational Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. P. Bultinck, H. De Winter, W. Langenaeker, J.P. Tollenaere, Ed.; Dekker Inc.: New York, 2003; pp 151–212.

15. M. F. Sanner. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 1999, vol. 17, pp. 57–61.

16. M.W. Schmidt, K.K. Baldridge, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S.J. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery. General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *Journal of Computational Chemistry*, 1993, vol. 14, pp. 1347–1363.

17. E. Sigfridsson, U. Ryde. Comparison of Methods for Deriving Atomic Charges from Electrostatic Potential and Moments. *Journal of Computational Chemistry*, 1998, vol. 19, No. 4, pp. 377–395.

18. J. L. White, M. L. Hackert, M. Buehner, M. J. Adams, G. C. Ford, P. J. Lentz Jr., I. E. Smiley, S. J. Steindel, M. G. Rossmann. A Comparison of the Structures of Apo Dogfish M4 Lactate Dehydrogenase and its Ternary Complexes. *Journal of Molecular Biology*, 1976, vol. 102, pp. 759–779.

19. A. Wlodawer, J. Vondrasek. Inhibitors of HIV-1 Protease: A Major Success of Structure-Assisted Drug Design. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1998, vol. 27, pp. 249–84.

20. <http://fightaidsathome.scripps.edu/>

21. http://www2.chemie.uni-erlangen.de/software/corina/free_struct.html

D.A. Egorov, L.I. Saveliev, S.V. Tsvirenko
**COMPUTER MODELLING OF
COMPLEX LIGAND-RECEPTOR
INTERACTIONS**

Department of Clinical Laboratory and Microbiological
Diagnostics of Ural State Medical Academy, Institute of
medical cellular technologies, Ekaterinburg

ABSTRACT

Dogfish lactate dehydrogenase-oxamate, spinach ferredoxin reductase-2',5'-ADP, and bovine liver catalase-NADPH complexes were simulated by program AutoDock 3.0 to evaluate performance of this program in reproduction correct geometry of ligands in these complexes. Results indicate that for catalase-NADPH AutoDock 3.0 failed in finding correct pose of ligand on enzyme. For ferredoxin reductase-2',5'-ADP complex results also were negative, while less than for catalase with NADPH. Finally lactate dehydrogenase-oxamate complex was reproduced well with correct ranking results according to protonation states of critical residue histidine-193 (195). It was concluded that for complex interactions between ligand and receptor as for NADPH in catalase and 2',5'-ADP in ferredoxin reductase where alternative possibilities for ligand binding are exist Autodock is not able to distinguish right bound configurations of such ligands.

О.Г. Макеев, В.А. Буханцев, Е.С. Куликов, И.Х. Измайлов, С.В. Костюкова,
А.И. Улыбин, П.С. Зубанов, А.А. Тарасевич

МОНИТОРИНГ МУТАЦИЙ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ И ПРОТООНКОГЕНОВ В СТРУКТУРЕ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Уральская государственная медицинская академия, Лаборатория молекулярных медицинских технологий
Средне-Уральского научного центра Российской академии медицинских наук и Правительства Свердловской
области, г. Екатеринбург

Важным условием безопасности применения клеточных технологий является подтверждение отсутствия онкологической трансформации трансплантируемых клеток. При этом традиционные способы контроля атипичности клеток по морфологическим критериям, ввиду гетерогенности клеточной культуры, неэффективны. Последнее предусматривает необходимость разработки поэтапного многоступенчатого мониторинга генетической нестабильности культивируемых клеток как наиболее раннего признака онкотрансформации.

В процессе репликации ДНК и последующего деления каждой эукариотической клетки во вновь синтезированной цепи неизбежно возникают мутации с частотой до 10^{-9} на один нуклеотид за счет спонтанного мутагенеза и ошибок работы клеточной ДНК-полимеразы. Большинство из них не проявляются фенотипически, так как естественная система репарации ДНК восстанавливает ее нативную последовательность [6]. В то же время сохранившиеся трансформированные клетки с нерепарированными мутациями элиминируются собственной иммунной системой – системой клеточного противоопухолевого иммунитета [5]. И хотя интенсивность как спонтанного так и «репликационного» мутагенеза в клетках *in vivo* и *in vitro* не отличается, однако культивируемые клетки при сохранении внутриклеточной репарации ДНК лишены контроля со стороны системы противоопухолевого иммунитета, эффекторное звено которого представлено цитотоксическими киллерными Т-лимфоцитами.

На возможность образования опухолей из экзогенных эмбриональных клеток указывали еще основоположники клеточной терапии – Thomson J.A. и Reubinoff V.E. [23, 29, 30]. В последние годы это нашло подтверждение в экспериментах исследователей, наблюдавших гистологические признаки злокачественных тератокарцином (с зачатками зубов и волос) в месте введения в организм донорских эмбриональных клеток того же фенотипа [4, 9, 31]. При этом частота спонтанного возникновения эмбриональных опухолей составила, по данным авторов, от 25 до 30%. И хотя эксперименты были выполнены на иммунодефи-

цитных бестимусных мышах, можно предположить, что опухолевая трансформация через годы после аллогенной трансплантации эмбриональных клеток при иммунодефицитных состояниях может стать значимым осложнением клеточной терапии. Для линий человеческих эмбриональных клеток также было показано, что их длительное пассирование приводит к генетическим и эпигенетическим изменениям. Так, восемь из девяти линий, полученных и официально зарегистрированных разными компаниями, на поздних пассажах (55–59) несли одну или несколько мутаций, часть из которых характерна для злокачественных трансформаций человеческих клеток [16]. Это одна из причин, по которой применение фетальных клеток человека для терапевтических целей ни в одной стране мира не входит в перечень разрешенных медицинских процедур.

Онкотрансформация не является прерогативой исключительно эмбриональных клеток. Группа Rubio-Bernard показала, что взрослые клетки человека способны к спонтанной онкологической трансформации в культуре без факторов роста. Длительное культивирование мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани (в данной работе продолжительность культивирования составила более двух месяцев), было ассоциировано с высоким онкогенным риском и сопровождалось возникновением пост-M1-туморогенных клеток с развитием опухоли почти в 100% трансплантаций у бестимусных мышей [25]. Данное исследование приобретает особое значение в контексте потенциального клинического применения полипотентных мезенхимальных стромальных клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии.

Аналогичные работы других зарубежных исследователей также продемонстрировали генетическую нестабильность длительно культивируемых постнатальных клеточных линий, в частности 2 Mb амплификацию вблизи тус-онкогена, частичную амплификацию плеча 17q и ряд других генетических и эпигенетических изменений в культивируемых клетках взрослых пациентов [7, 24].

Возможность внесения трансформированных клеток с перспективой развития опухолевого процесса в организме реципиента не только требует поиска молекулярно-генетических маркеров онкотрансформации в культивируемых клетках, но разработки схемы мониторинга клеточных культур как во время культивирования, так и перед их применением в клинике с целью исследования различных уровней молекулярной неопластической трансформации [18].

Ключевую роль в неогенезе неопластической клетки играет мутагенез в строго определенных группах генов, наиболее значимыми из которых являются гены-супрессоры опухолевого роста, протоонкогены и так называемые мутаторные гены. К настоящему времени уже известно около сотни потенциальных онкогенов, как клеточных, так и вирусных, и примерно два десятка генов-супрессоров. Эти группы генов, будучи регуляторами клеточного цикла и компонентами внутриклеточных сигнальных систем, при возникновении в них мутаций обуславливают неконтролируемую пролиферацию и иммортализацию клеток.

Термином «опухолевые супрессоры» (антионкогены, рецессивные опухолевые гены) обозначаются гены, инактивация которых ведет к возникновению и/или прогрессии новообразований. В свою очередь, нарушение функции мутаторных генов увеличивает темп возникновения мутаций и/или иных генетических изменений. Многие гены-супрессоры опухолевого роста одновременно являются мутаторными генами. Инактивация таких генов резко увеличивает вероятность появления различных онкогенных мутаций, а образование опухоли становится лишь вопросом времени [1, 32].

Принадлежность к онкогенам или опухолевым супрессорам определяется:

- а) закономерным характером изменений структуры и/или экспрессией гена в клетках различных новообразований;
- б) возникновением в юном или молодом возрасте определенных форм опухолей у индивидов с передающимися по наследству герминальными (произошедшими в половой клетке) мутациями данного гена;
- в) резким повышением частоты появления опухолей у трансгенных животных, экспрессирующих активированную форму гена (онкогены), либо несущих мутации гена (опухолевый супрессор);
- г) способностью вызывать в культивируемых клетках морфологическую трансформацию и/или неограниченный рост (онкогены), либо подавление клеточного роста и/или выраженности признаков трансформации (опухолевые супрессоры).

В настоящее время выстраивается целостная картина, характеризующая большую часть протоонкогенов и опухолевых супрессоров как составную часть общих внутриклеточных сигнальных систем, которые у всех без исключения организмов контролируют клеточный цикл, дифференцировку, апоптоз, целостность генетического аппарата и морфогенетические реакции клеток.

Наиболее универсальным геном-супрессором опухолевого роста считается ген p53, чаще всего поражаемый при возникновении различных новообразований у человека. Более половины всех злокачественных опухолей человека (50–60%, около 50 различных типов) обнаруживают наличие мутантного p53 [2]. В отличие от других опухолевых супрессоров, в которых мутации прекращают синтез

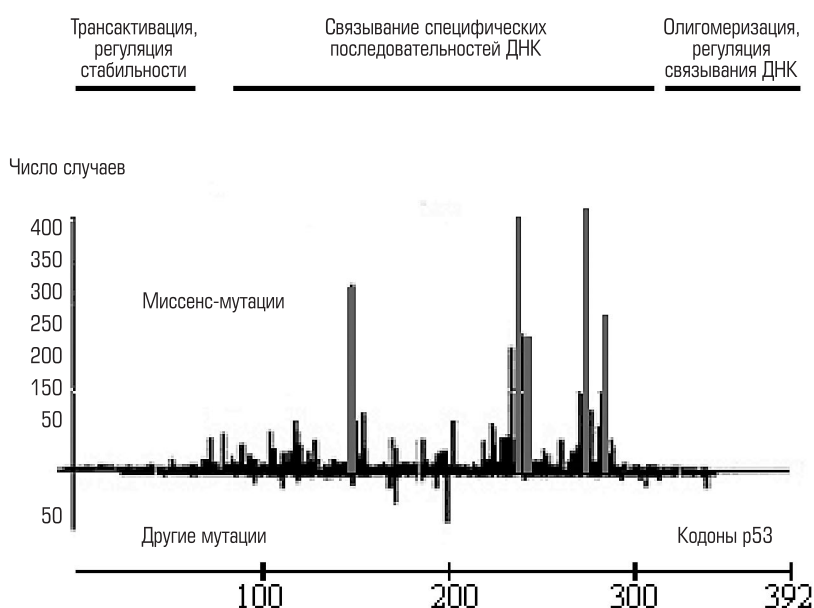


Рис. 1. Частота мутаций p53 и их локализация (по данным Копнина Б.П., 2000). По оси X — число случаев выявления мутаций p53 при различных онкологических заболеваниях у человека; по оси Y — кодоны гена p53

белка (делеции, образование стоп-кодона, сдвиг кодирующей рамки, нарушения сплайсинга мРНК), более 90% мутаций p53 представляет собой миссенс-мутации, приводящие к замене только одной аминокислоты белка p53. Мутации p53, в отличие от мутаций других опухолевых супрессоров, часто являются гетерозиготными, т.е. поражают только один из двух аллелей гена [10, 11, 14].

В связи с тем, что p53 образует тетрамерные комплексы, мутации в одном аллеле гена p53 вызывают инактивацию продукта второго, неповрежденного аллеля. Тем самым мутантный белок ингибирует функции нормального белка p53 по доминантно-негативному механизму. По-видимому, именно эта особенность мутантных p53 в значительной мере ответственна за их онкогенный потенциал [27]. Мутации обнаруживаются в разных участках молекулы p53, но чаще – в его эволюционно консервативном ДНК-связывающем домене – в кодонах 175, 248, и 273 или «горячих точках» (рис. 1).

Продукт гена p53 с молекулярной массой 53 кДа состоит из 392 аминокислотных остатков и образует тетрамерный комплекс, способный регулировать транскрипцию генов, имеющих в своем составе p53-респонсивные элементы. Помимо повышения транскрипции генов, белок p53 обладает способностью подавлять транскрипцию многих генов, например протоонкогенов BCL2, JUN и FOS, гена фибронектина и т.д. В основе такой трансрепрессии лежит связывание и секвестрация активированным p53 ряда базовых факторов транскрипции, способность связывать и рекрутировать гистоновые деацетилазы, ремоделирующие хроматин и т.д. [21, 22]

Помимо утраты нормальных функций p53, мутантные p53 с аминокислотными заменами в горячих точках (кодона 175, 248 и 273) приобретают новые свойства, не свойственные белку p53 дикого типа. В обычных условиях p53 находится в латентной форме, проявляющейся слабой транскрипционной активностью. Такой p53 проявляет активность 3'-5'-экзонуклеазы и стимулирует рекомбинацию и репарацию ДНК [17]. При различных стрессах и внутриклеточных повреждениях происходят посттрансляционные модификации, в частности фосфорилирование и ацетилирование определенных аминокислот молекулы p53, определяющие ее переход в так называемую стрессовую конформацию. Такой p53 не только более стабилен (его количество в клетке резко увеличивается), но и более эффективно транс-активирует и/или транс-репрессирует специфические гены-мишени. Следствием этого является остановка клеточного цикла в аномальных клетках или их апоптоз [26, 33].

p53 дикого типа способен приобретать мутантную конформацию, сходную с той, в которую молекула p53 необратимо переходит при онкогенных

мутациях. Транзиторный обратимый переход p53 в мутантную форму происходит при воздействии определенных цитокинов и/или морфогенов (тромбоцитарный фактор роста, тромбопоэтин, ретиновая кислота, колониестимулирующие факторы и др.). Биологический смысл такого перехода заключается в полной инактивации рост-ингибирующих активностей p53.

Таким образом, p53 играет важную охранную роль, являясь по выражению D.Lane, «стражем генома». Его функция, по-видимому, заключается в распознавании и исправлении ошибок, неизменно возникающих в ходе репликации ДНК. При массивных повреждениях ДНК происходит переключение функций p53, что приводит к необратимому изменению конформации белка и сохранению мутантных клеток, образующих опухолевый клон.

Генетическая стабильность также обеспечивается неизменностью ключевых внутриклеточных компонентов сигнальной трансдукции, в частности серин-треониновых киназ. Последние кодируются семейством Raf-генов, относящихся к протоонкогенам [20]. Представителем данного генного семейства является ген B-raf. Мутации в этом гене, приводящие к опухолевой трансформации, также происходят в специфических точках – наиболее часто в 15 экзоне. При этом синтезируется протеин с заменой аминокислоты в 599 положении. Аминокислотная замена приводит к развитию неконтролируемой протеинкиназной активности, которая сопровождается постоянной стимуляцией деления трансформированных клеток.

Третьей наиболее распространенной группой генов, мутации в которых способны инициировать развитие опухоли, является семейство генов Ras [8]. Нарушения функционирования генов данного семейства встречаются приблизительно в 25–30% случаев злокачественных новообразований. Из генов Ras главной мишенью при злокачественной трансформации является ген K-ras, кодирующий фермент фарнезилтрансферазу, посредством которой осуществляется перенос фарнезильных групп на карбоксильный конец полипептидной молекулы. Обычно фермент, кодируемый K-ras, способен связываться гуанидиндифосфатом с переходом в неактивное состояние. Мутантная форма белка к такому взаимодействию не способна, что проявляется аномально высокой активностью белкового продукта [19, 34]. Типичными локализациями мутаций, влекущими опухолевую трансформацию в гене K-ras, считаются 12-й, 13-й и реже – 61-й кодон.

Изменения в системах генов-супрессоров опухолевого роста и протоонкогенов приводят к развитию генетической нестабильности, характеризующейся увеличением вероятности возникновения и закрепления в ряду клеточных поколений разнооб-

разных изменений генома. Именно генетическая нестабильность, вместе с постоянно идущим клеточным отбором, обеспечивает накопление в клетке сразу нескольких мутаций в онкогенах, опухолевых супрессорах и других генах, необходимых для образования опухолевого клона [13, 28].

Совокупность перечисленных нарушений обеспечивает повышенную частоту возникновения различных генетических изменений, закрепление их в ряду клеточных поколений, и обуславливает неопластическую трансформацию клеток *in vitro*.

Целью выполненной работы являлась разработка технологии мониторинга генетической нестабильности клеточных культур путем определения генетических маркеров онкологической трансформации в клетках.

Материалы и методы

Дизайн проведенного исследования представлен на рис. 2.

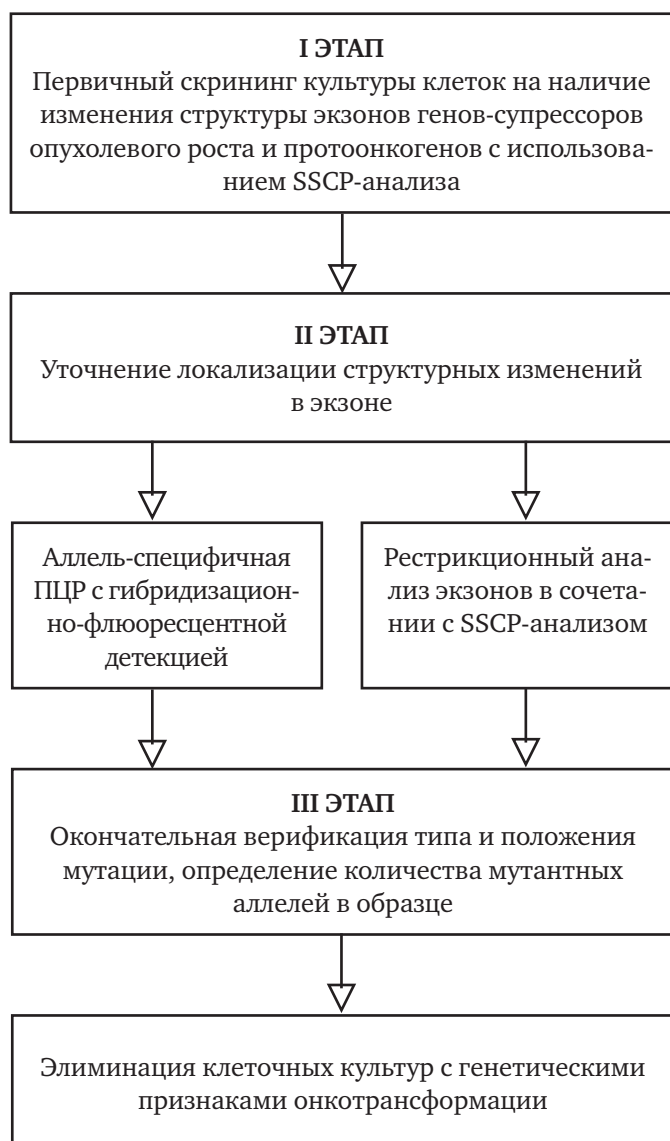


Рис. 2. Дизайн проведенного исследования

Для контроля мутаций, способных увеличить риск неоплазии после трансплантации клеток, исследовали мутации в генах p53 кодон 175 (1 мутация), кодон 248 (3 мутации), кодон 273 (4 мутации), B-raf (2 мутации), K-ras (2 мутации) [3, 35]. Для анализа мутаций использовали ДНК, выделенную из культивируемых клеток, культуральной жидкости и крови доноров.

Кровь отбирали в одноразовые вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА (Vacutest, Италия), в количестве 9 мл. Кровь центрифугировали в мягких условиях при 350g, для сохранения ядросодержащих клеток в течение 10 мин при 4°C. На этом этапе использовали рефрижераторную центрифугу MLW K23D (Германия). Последующее осаждение проводили на центрифуге «MicroSpine» (Eppendorf) при 8000 g 5 мин.

Выделение ДНК проводили по методике фенольной депротеинизации. После добавления к культуральной жидкости 10% раствора SDS и 1M NaCl проводили последовательную экстракцию фенолом, смесью хлороформ-изоамиловый спирт (24/1). Содержимое пробирки с водной фазой тщательно перемешивали и добавляли два объема 96% этилового спирта. В качестве соосадителя использовали раствор гликогена. Смесь выдерживали в морозильной камере при -25°C в течение 1,5 часа, ДНК осаждали при 13 000 g в течение 10 мин. Осадок растворяли в деионизованной воде и сохраняли при -30°C до проведения исследования. Для выделения ДНК из клеток, суспензию предварительно обрабатывали протеиназой К в течение 5 часов, с последующей фенольной депротеинизацией по вышеописанной методике.

Анализ ДНК на наличие мутаций проводили в три этапа в соответствии с приведенной схемой.

На первом этапе выделенную ДНК подвергали амплификации со специфическими праймерами (табл. 1), подбор которых осуществлялся на основании сиквенсов генов Gene-Bank, RefSeq, UniGene и программ Vector NTI 7.0 (Infor Max Inc.), OligoAnalyzer 3.0, PrimerQuest (IDT SciTools).

Амплификацию производили на термоамплификаторе «Терцик МС-2» (НПО «ДНК-Технология», Россия) с использованием программного обеспечения TherCyc 2.2 (firmware). Объем реакционной смеси – 25 мкл. Температурный режим 93°C – 1 мин, денатурация цепей 93°C – 15 сек, отжиг праймеров 59–62°C – 30 сек, в зависимости от нуклеотидного состава, элонгация цепи 72°C – 30 сек, количество циклов – 35.

Гель-электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (соотношение акриламид-бисакриламид: 49/1) с 1xTBE-буфером (pH-8,3) при напряжении 130 В. В качестве маркеров длины использовали готовые фрагменты по 100 bp («СибЭнзим», Россия). В гель вносили продукты ПЦР. Гель окрашивали

бромидом этидия (0,1мг/100 мл, 15 мин). После окрашивания гель помещали на трансиллюминатор и при помощи видеосистемы для документирования гелей «Gel Imager» («Helicon») фиксировали изображение.

При проведении SSCP-электрофореза продукты ПЦР вместе с денатурирующим буфером (на 1 мл: 980 мкл диоинизованного формамида, 20 мкл ЭДТА, рН-8,0, 0,25 мг ксиленианола, 0,25 мг бромфенолового синего) в соотношении 1/1 инкубировали при 99°C в течение 5 мин. После прогревания пробы быстро охлаждали и вносили в гель. Электрофорез выполняли в 12% полиакриламидном геле (соотношение акриламид-бисакриламид: 29/1). Для приготовления геля использовали 40% раствор акриламид-бисакриламид (5 мл), 2,5 мл 10xTBE буфера, 30 мкл TEMED; деионизованная вода до 25 мл.

Электрофорез проводили в вертикальной камере в 1xTBE-буфере при постоянном напряжении 380 В в течение 5 часов. Результаты SSCP-электрофореза визуализировали при помощи окрашивания геля 0,1% раствором нитрата серебра. Фиксацию ДНК в геле проводили фиксирующим раствором (10% технический этанол, 0,5% ледяная уксусная кислота, 1/1) в течение 5 мин, затем трехкратно отмывали гелевые пластины бидистиллированной водой. Гель инкубировали в 0,1% растворе нитрата серебра, однократно промывали бидистиллированной водой и помещали в проявляющий раствор (1,5% NaOH, 0,15% формальдегид), приготовленный непосредственно перед применением. После двукратной промывки, перемещали гель в 0,75% раствор Na₂CO₃ на 15 мин. Все операции проводили при постоянном перемешивании растворов. Для получения изображения гель после просушки сканировали в проходящем свете на сканере Epson Perfection 3200 Photo.

На втором этапе работ проводили аллель-специфичную ПЦР с флуоресцентными зондами типа «molecular beacon» собственного дизайна (табл. 3), меченными 5'-FAM и 3'-Dabsyl (синтез – НПФ «Литех»). Объем реакционной смеси – 25 мкл. Суммарный объем праймеров и зонда – 5 мкл (по 2мкл/5пкмоль каждого праймера, 1мкл/5пкмоль зонда), 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера (набор для проведения ПЦР с Taq-ДНК-полимеразой), 2,5 мкл смеси dNTP по 2,5 мМ каждого, 2,5 мкл опытной ДНК, 0,5 мкл (0,5U) глициринового раствора Taq-ДНК-полимеразы; деионизованная вода до 25 мкл.

Температурный режим 93°C – 1 мин, денатурация цепей 93°C – 5 сек, отжиг праймеров 59–62°C – 5 сек, в зависимости от нуклеотидного состава, элонгация цепи 67°C – 10 сек, количество циклов – 35.

Для детекции и документирования результатов использовали флуоресцентный детектор «Джин» (НПО «ДНК-Технология», Россия) и программное обеспечение Gene 3.3i (firmware). Детекцию про-

Таблица 1

Первичный скрининг культуры клеток на наличие изменения структуры в экзонах генов-супрессоров опухолей и протоонкогенов с использованием SSCP-анализа

№	Ген	Последовательность фрагмента мутантного гена
1	p53 - ex 5 – Fw	5'-TCATATGCTTGCTGATAGGA-3'
2	p53 - ex 5 – Rt	5'-AGGGACTAATTTAATGCACACCGG-3'
3	p53 - ex 6 – Fw	5'-GCTGCCGTGTCATCCAGTTGCGTATC-3'
4	p53 - ex 6 – Rt	5'-AGGGGCCCGACCTATGAAGCATCAG-3'
5	p53 - ex 7 – Fw	5'-TTGCCAGGTCCAGGCACTCTGATTC-3'
6	p53 - ex 7 – Rt	5'-ACTGCTCACCAGAGCCACCTGACAAC-3'
7	p53 - ex 8 – Fw	5'-GCCTCATTCGTGGACCTGTGTATC-3'
8	p53 - ex 8 – Rt	5'-ATGTGATGAGACGTGGATGTAGTAG-3'
9	B-raf – Rev N3	5'-GCCTCTGCTTCTTTCAGTACCTGAG-3'
10	B-raf – Fw N3	5'-TCTGAGGCATAACTCGACTGCCTTGGTC-3'
11	K-ras – Rev N12	5'-TCCGGTCAGCAGTCTGACTCGCC-3'
12	K-ras – Fw N12	5'-TCTTCGAGAATGGTCCGGACGC-3'

Таблица 2

Рестрикторный анализ выявленных изменений в экзонах в сочетании с SSCP-анализом

№	Ген	Последовательность фрагмента мутантного гена
1	K-ras – wt 3	5'-ACTGAAGTCTGCGATGTTGGACCT-3'
2	K-ras – Fad	5'-CCACGTCCACGTGCAAGAAACT-3'
3	K-ras – Fc	5'-CCAGGTCTGGTAAGCGCTCACT-3'
4	p53 - ex 8 – HpI	5'-GCCTCATCTACATAGCCTGTGTATC-3'
5	p53 - ex 8 – HpJ	5'-AAATGTGATGAGATGGATGTTTCATAG-3'

Таблица 3

Аллель-специфичная ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в системе резонансного тушения флуоресценции

№	Ген	Последовательность фрагмента мутантного гена
1	p53 - ex 5 – FR 15	5'-/FAM-/TGAGTACCCAGCTGCACAGACTCA-/Dab/-3'
2	p53 - ex 6 – FR 16	5'-/FAM-/AGGAGAGTTAGTGGATGGCTCCT-/Dab/-3'
3	p53 - ex 7 – FR 48	5'-/FAM-/ATTCGAAGAAGTAAGGACGAAT-/Dab/-3'
4	p53 - ex 5 – Fw 2	5'-TTTGACTCTAACTGTGGC-3'
5	p53 - ex 5 – Rt 45	5'-CTCATGTTGGGACGATAG-3'
6	p53 - ex 6 – Fw 12	5'-GCTCCTGAGGTGTAGACCAA-3'
7	p53 - ex 6 – Rt 41	5'-AGTTACCGGCACTACACTCT-3'
8	p53 - ex 7 – Fw 9	5'-TGAGTTCACGCCGATCTGCACTC-3'
9	p53 - ex 7 – Rt 42	5'-CCACTGCAGGCATGAAACACG-3'

водили непосредственно после окончания ПЦР, пробирки с реакционной смесью охлаждали до 5°C, затем переносили в барабан флюоресцентного детектора.

Следующим элементом второго этапа стал SSCP-электрофорез в сочетании с рестрикционным анализом исследуемого фрагмента гена (табл. 2). Первоначально выполняли предварительную амплификацию с обогащением реакционной смеси после проведения реакции. Обогащение проводили путем обработки амплификата рестриктазами, расщепляющими продукты генов «дикого» типа, в то время как мутантные формы не содержали сайтов рестрикции и не были затронуты. Для выполнения задачи для каждого гена был использован дополнительный праймер, вводящий точечную мутацию в синтезируемый продукт. Дизайн дополнительных праймеров предусматривает отсутствие в них сайта рестрикции.

Реакции проводили в объеме 25 мкл. Суммарный объем растворов праймеров – 5 мкл (по 2,5 мкл/5 пкмоль каждого праймера), 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера (набор для проведения ПЦР с Таq-ДНК-полимеразой), 2,5 мкл смеси dNTP по 2,5 mM каждого, 2,5 мкл опытной ДНК, 0,5 мкл (0,5U) глициринового раствора Таq-ДНК-полимеразы, деионизованная вода до 25 мкл.

Температурный режим 93°C – 5 мин, денатурация цепей 93°C – 1 мин, отжиг праймеров 59–62°C – 45 сек, элонгация цепи 72°C – 1 мин, количество циклов – 25 для первого этапа, 35 – для второго этапа амплификации. На первом этапе в реакцию вводили праймеры 5'-стандартный и 3'-вводящий сайт рестрикции. При этом амплификации подвергались как нормальные, так и мутантные формы исследуемых генов.

После проведения ПЦР 5 мкл продукта подвергали воздействию эндонуклеазами рестрикции. Инкубацию проводили при 60°C в течение одного часа. При этом ДНК-последовательности, соответствующие генам «дикого» типа, гидролизуются и в дальнейшей амплификации участия не принимают.

На втором этапе в реакцию вводили стандартные праймеры. В качестве матрицы использовали продукты ПЦР первого этапа после обработки рестриктазой. В ходе реакции амплифицировали мутантные формы исследуемых генов. После завершения реакции, амплификат вторично обрабатывали эндонуклеазами рестрикции.

Электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (49/1) в однократном TBE-буфере при постоянном напряжении 160 В. В качестве маркеров длины использовались готовые фрагменты по 100 bp («СибЭнзим», Россия). В гель вносили продукты второго этапа ПЦР до и после рестрикции. Гель окрашивали бромидом этидия (0,1 мг/100 мл, 15 мин). После окрашивания гель помещали на тран-

Таблица 4

Окончательная верификация типа и положения мутации, определение количества мутантных аллелей в исследуемом образце

№	Ген	Последовательность фрагмента мутантного гена
1	p53 -ex5 - Fw 12	5'-GCTCCTGAGGTGTAGACGCCAA-3'
2	p53 - ex 5 - Rt 31	5'-TGAGATCACGCCACTGCACTC-3'
3	p53 -ex6 - Fw 13	5'-TTTGGGACCTCTTAACCTGTGGC-3'
4	p53 - ex 6 - Rt 32	5'-CTCATGGTGGGGCAGCG-3'
5	p53 - ex 7 - Fw 14	5'-GCTCATGGTGGGGCAGT-3'
6	p53 - ex 7 - Rt 33	5'-AGATCACGCCACTGCACTCCG-3'
7	p53 - ex 8 - Fw 15	5'-AGATCACGCCACTGCACTCCA-3'
8	p53 - ex 8 - Rt 34	5'-AGATCACGCCACTGCACTCT-3'
9	B-raf -RevV2	5'-AGATCACGCCACTGCACTCA-3'
10	B-raf - Fw V2	5'-CCAGGACAGGCACAAAACAG-3'
11	K-ras - Rev 12	5'-CCAGGACAGGCACAAAACACA-3'
12	K-ras -Fw 12	5'-CCCAGGACAGGCACAAAACA-3'
13	K-ras - Rev 61	5'-CCCAGGACAGGCACAAAACAG-3'
14	K-ras - Fw 61	5'-CCCAGGACAGGCACAAAAT-3'

силлюминатор и фиксировали изображение в ультрафиолетовом свете. В случае присутствия в пробе мутантных форм исследуемых генов на электрофореграмме продуктов ПЦР заметны полосы, обусловленные мутантным аллелем в сопровождении минорных полос (по-видимому, остаточные рестрикционные фрагменты генов «дикого» типа). При отрицательном результате – продукт ПЦР на втором этапе не визуализировался. В качестве положительного контроля использовали образцы ДНК, содержащие мутантные формы генов, полученные из разных источников.

На заключительном этапе для количественного определения мутантного аллеля применяется метод ПЦР в реальном времени [12]. Амплификация проводится на детектирующем амплификаторе АНК-32 (ЗАО «Синтол», Россия) с использованием программного обеспечения qPCR 2.1 (firmware) и флюоресцентно меченых 5'-FAM и 3'-Dabsyl зондов собственного дизайна (синтез – НПФ «Литех»).

Реакционный объем – 25 мкл. Состав реакционной смеси – 2,5 мкл смеси dNTPs по 2,5 mM каждого в растворе, 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера, содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green I и пассивный референсный краситель ROX, раствор хлорида магния 25 mM – 1 мкл (все – ЗАО «Синтол», Россия), образец ДНК – 2,5 мкл, растворы праймеров – 5 мкл (по 2,5 мкл/5 пкмоль каждого праймера), деионизованная вода – до 25 мкл.

Температурный режим 93°C – 30 сек, денатурация цепей 92°C – 5 сек, отжиг праймеров 58–63°C – 5 сек,

в зависимости от нуклеотидного состава, элонгация цепи 67°C – 10 сек, количество циклов – 30.

Результаты исследования и их обсуждение

В предварительных слепых исследованиях 33 образцов крови больных с морфологически идентифицированной онкологической патологией I–II стадии различной локализации и восемь контрольных образцов была подтверждена высокая достоверность метода – 94% (от 1 до 2 исследуемых мутаций было выявлено в 31 образце крови, в двух образцах крови больных и в восьми контрольных образцах мутаций не обнаружено; вероятность ложноотрицательного результата – 6%).

В выполненных исследованиях по применению аутогенных фибробластов для коррекции изменений кожи неогенез мутаций *in vitro* был подтвержден. Так, в клетках одной из культур, полученной из кожи испытуемой Н., была выявлена мутация в 248 кодоне гена p53 (G248C), получившая подтверждение в процессе выполнения этапов определения мутантных генов.

Мутация была выявлена в единичной культуре испытуемой Н. после 3-го пассажа клеток и не подтвердилась в других параллельных культурах испытуемой, а также в образцах ее периферической крови. Это позволило не прерывать дальнейшего участия испытуемой в клиническом исследовании и послужило основанием только для выбраковки единичной культуры, содержащей мутантные клетки.

Полученные результаты хорошо согласуются с проведенными за рубежом исследованиями, подтверждающими наличие элементов генетической нестабильности при длительном культивировании клеточных линий. Единичный положительный результат при исследовании клеточных культур может свидетельствовать о том, что при сроках культивирования до 30 суток зарегистрированное генетическое событие является сравнительно редким.

Проведенные исследования свидетельствуют о необходимости одновременного исследования ДНК не только культивируемых клеток донора, но и ДНК его крови в связи с возможностью проявления возникшей мутации в клетках организма. Отсутствие изменений в периферической крови будет свидетельствовать о возникновении мутации *de novo*.

Выводы

1. Разработанная трехэтапная технология мониторинга генетической нестабильности культивируемых клеток позволяет проводить выбраковку клеточного материала, являющегося потенциальным источником опухолевой трансформации в организме реципиента.

2. Исследование культур следует сочетать с ис-

следованием ДНК крови, что позволяет исключить возможность проявления уже имеющихся в геноме пациентов мутаций генов-супрессоров опухолевого роста и протоонкогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия, 2000, 65, 5–33.

2. Чумаков П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью. Биохимия, 2000, 65, 34–47.

3. Arguello J.R., A.M. Little, A.L. Pay, D. Gallardo, I. Rojas, S.G.E. Marsh, J.M. Gold-man, and J.A. Madrigal. 1998. Mutation detection and typing of polymorphic loci through double strand conformation analysis. Nat. Genet. 18:192–194.

4. Asano T., Ageyama N., Takeuchi K., Momoeda M., Kitano Y., Sasaki K., Ueda Y., Su-zuki Y., Kondo Y., Torii R., Hasegawa M., Ookawara S., Harii K., Terao K., Ozawa K., Hanazono Y. Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. // Transplantation. 2003 Oct 15; 76(7); P. 1061–1067.

5. Bradley J., Bolton E., Pedersen R. Stem cell medicine encounters the immune system. Nat. Rev. Immunol. 2002; 2: 859–71.

6. Brimble S.N., Zeng X., Weiler D.A. et al. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. Stem Cells Dev. 2004; 13: 585–97.

7. Buzzard J.J., Gough N.M., Crook J.M., Colman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. Nat. Biotechnol. 2004; 22: 381–2.

8. Dietrich, C., Wallenfang, K., Oesch, F., and Wieser, R (1997) Oncogene, 15, 2743–2747.

9. Erdo F., Buhrle C., Blunk J., Hoehn M., Xia Y., Fleischmann B., Focking M., Kuster-mann E., Kolossov E., Hescheler J., Hossmann K.A., Trapp T. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2003 Jul; 23(7); P. 780–785.

10. Evan G.I, Vousden K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature, 2001, 411, 342–348.

11. Gray, J. W. & Collins, C. Genome changes and gene expression in human solid tumors. Carcinogenesis, 2000, 21, 443–452.

12. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6(10): 986–94.

13. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Nature, 1998, 396, 643–649.

14. Levine A. J. The tumour suppressor genes. Annu. Rev. Biochem., 1993, 62, 623–651.

15. Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997, 88, p.323–331.
16. Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N. et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 2005; 37: 1099–103.
17. Manfredi, J. J. (2003) p53 and apoptosis: it's not just in the nucleus anymore. *Mol. Cell* 11, 552–554.
18. Matsuzaki H., Dong S., Loi H. et al. Genotyping over 100,000 SNPs on pair of oligonucleotide arrays. *Nat. Methods* 2004; 1: 109–11.
19. Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., and Weinert, T. A. (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36, 617–56.
20. N.C. Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000, 12, 697–704.
21. Ponder B.A.J. Cancer genetics. *Nature*, 2001, 411, 336–341.
22. Prives, C. and Hall, P.A. The p53 pathway. *J. Pathol.*, 1999, 187, 112–126.
23. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. // *Nat Biotechnol.* 2000 Apr; 18(4); P. 399–404.
24. Roesler E.S., Fisk G.J., Ares X. et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* 2004; 229: 259–74.
25. Rubio D., Garsia-Castro J., Martin M.C. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005; 65: 3035–9.
26. Sherr C.J. Cancer cell cycles. *Science*, 1996, 274, 1672–1677.
27. Stambolic, V., Mak, T. W. & Woodgett, J. R. Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis. *Oncogene*, 1999, 18, 6094–6103.
28. The Genetic Basis of Human Cancer. Eds Vogelstein B., Kinzler, K.W. McGraw Hill, New York, 1998.
29. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. // *Science*. 1998 Nov 6; 282(5391); P. 1145–1147.
30. Thomson J.A., Marshall V.S. Primate embryonic stem cells. // *Curr Top Dev Biol.* 1998; 38; P. 133–165.
31. Wakitani S., Takaoka K., Hattori T., Miyazawa N., Iwanaga T., Takeda S., Watanabe T.K., Tanigami A. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. // *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Jan; 42(1); P. 162–165.
32. Weinberg R.A. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1995, 758, 331–338.
33. Woods, D. B. & Vousden, K. H. Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.*, 2001, 264, 56–66.
34. Zhou B.-B.S., Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, 408, 433–439.
35. Zhu K.Y., Clark J.M. // *Biotechniques*. 1996. V.21. N.4. P. 586.

*O.G. Makeev, V.A. Buhantsev, E.S. Kulikov,
I.H. Izmailov, S.V. Kostyukova, A.I. Ulybin,*

P.S. Zubanov, A.A. Tarasevitch

MONITORING OF MUTATIONS OF GENE-SUPPRESSORS AND PROTOONCOGENES FOR GUARANTEE OF SAFETY OF CELL TECHNOLOGY

The Ural state medical academy, Medical molecular
technology laboratory of Middle Ural scientific center of
RAMS and Sverdlovsk Regional Government

The technology of monitoring of genetic instability is developed and it allows to reject cell cultures, which appears to be a potential source of oncogenic transformation. It is necessary to combine the monitoring of cell culture with blood DNA research for excluding the opportunity of finding mutations, which already exist in patient's genome.

*О.Г. Макеев, А.И. Улыбин, П.С. Зубанов, И.Х. Измайлов, С.Ю. Медведева,
С.В. Костюкова, В.А. Буханцев, Е.С. Куликов, А.П. Ястребов*
**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК КОЖИ
В ТЕРАПИИ ДЕСТРУКТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА**

Уральская государственная медицинская академия, Лаборатория молекулярных медицинских технологий
Средне-Уральского научного центра Российской академии медицинских наук и Правительства Свердловской
области, г. Екатеринбург

На современном этапе развития клеточные технологии прямо не могут ничего обещать ни пациенту, ни медицине. Оптимизм в отношении возможностей клеточной терапии в решении той или иной проблемы должен уравниваться глубоким анализом ее потенциальной разрешимости в обозримом будущем. Это, в рамках действующего законодательства, обуславливает необходимость планирования сравнительно «коротких» проектов, осуществляемых в развитии собственных разработок и основанных на результатах ранее выполненных исследований. Только после учета всех предпосылок во внимание может приниматься частота встречаемости патологии, ключевое звено патогенеза которой составляет убыль ткани, не поддающаяся эффективной терапии общепринятыми методами.

Одной из таких патологий являются воспалительные заболевания пародонта. По данным Всемирной организации здравоохранения, распространенность заболеваний пародонта достигает 90–95% у взрослого населения и 80–83% у подростков. Для населения России характерна тенденция к снижению возрастного барьера пациентов с генерализованными формами заболеваний и преобладание форм с деструкцией зубной ткани.

Главным этиологическим фактором пародонтита считается микробный, а основное значение в возникновении агрессивных форм принадлежит *Actinobacillus actinomycetem-comitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, обладающих повышенной способностью к проникновению в ткани пародонта [25, 29, 30]. Этим микроорганизмам свойственно интенсивное разрушение коллагеновых волокон периодонта, характерное для агрессивных форм пародонтита.

Примечательно, что возникновение и течение агрессивных форм пародонтита мало зависит от уровня гигиены полости рта, но во многом определяется иммунным статусом пациента [15].

К наиболее сложной проблеме пародонтологии относится убыль костной ткани. Если убыль незначительна, оперативное вмешательство может дать результат и без применения остеостимулирующих препаратов. Однако при значительной потере костной опоры десны коррекция ретракции костной ткани считается

практически неразрешимой задачей. С этой целью применяются различные методики, особенно при локализации дефекта в области передней группы зубов, что позволяет либо восстановить линию десны, либо скорректировать ее [34].

Подходы к восстановлению убыли костной ткани по механизму костеобразования разделяют на две основные группы:

– подходы с применением остеокондукторов: аутогенной и ксеногенной кости [26], аллопластических [31] и искусственных материалов [18]. При этих методах анатомический дефект заполняется плотным материалом в надежде на заселение его клетками соединительной ткани с формированием необходимой костной опоры;

– подходы с применением остеоиндукторов, например обогащенной тромбоцитами плазмы, оказывающей противовоспалительный и регенераторный эффекты. Последние связаны с воздействием тромбоцитарных факторов свертывания на фагоцитоз и выработку интерлейкинов, а также тромбоцитарного фактора роста (PDGF) – на активность фибробластов и остеобластов [24, 13].

Однако эффективность применения данных подходов в отношении убыли костной ткани невелика и в лучшем случае приводит к замедлению развития патологического процесса.

В последние годы появились исследования по использованию культур клеток в заместительной терапии деструктивных заболеваний зубочелюстной области [12, 20], свидетельствующих о перспективности данного подхода. Показано, что наиболее эффективным остеоиндуктором являются клетки соединительной ткани, в частности фибробласты, секретирующие в окологлеточную среду спектр трофических регуляторных цитокинов: FGF 1-14 (факторы роста фибробластов, стимулирующие рост различных типов клеток и продукцию компонентов внеклеточного матрикса), KGF или FGF-7 (фактор роста кератиноцитов), EGF (эпидермальный фактор роста с сильным митогенетическим действием на клетки эндо-, экзо- и мезодермального происхождения), семейство TGF-альфа и TGF-бета (трансформирующие факторы роста, стимулирующие фибробласты к синтезу коллагена, элас-

тина, белков экстрацеллюлярного матрикса и новообразование кровеносных сосудов), PDGF (являющийся для фибробластов фактором прогрессии и компетентности), NGF (фактор роста нервных клеток), SCF (фактор стволовых клеток).

Активно пролиферирующие фибробласты обеспечивают синтез предшественников волокон (проколлаген и тропоэластин) и компонентов протеогликанов, а также структурных гликопротеидов: гиалуроновой кислоты, сульфатированных форм хондроитина, дерматана, гепарана, кератана и фибронектина (образующего на поверхности фибробластов ячеистую сеть), тенасцина, ламинина, аггрикана, энтактина и др. Эти вещества способны обеспечить новообразование тканей пародонта.

Фибробласты осуществляют синтез 18 зимогенов (проферментов) цинковых металлопротеиназ (ММП) [4, 33], среди которых наибольшее значение имеют интерстициальная коллагеназа (ММП-1), желатиназа А (ММП-2), матрилизин (ММП-7) и металлоэластаза (ММП-12). Активированные цитокинами металлопротеиназы гидролизуют волокна (ММП-1 – коллагены I, II, III, VII и X типов; ММП-2 и 7 – коллагены XIV и V типов; ММП-12 и 7 – эластин) и белковые части основных структурных компонентов матрикса (ММП-1, 2, 7) [11, 23, 32]. При этом ММП-1 обуславливает первичную деградацию волокон и белков соединительной ткани с последующей активацией всего каскада зимогенов ММП [14]. Образование металлопротеиназ может способствовать деградации поврежденных и утративших функцию компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани пародонта.

Таким образом, фибробласты путем секреции факторов роста, компонентов внеклеточного матрикса и проферментов способны к продукции и катаболизму составляющих соединительной ткани пародонта. В тканях они образуют полуавтономную саморегулирующую систему, обеспечивающую ауторегуляцию роста собственной популяции и замещение тканевого дефекта.

Исходя из этого следует, что если фибробласты «посадить» на один из остеокондукторов (а фибробласты относятся к адгезивным клеткам и хорошо закрепляются на подложке), то получится технология, сочетающая в себе компоненты остеокондуктивного и остеоиндуктивного методов.

Подобные исследования проводились в Екатеринбурге с использованием линии эмбриональных клеток человека – ЛЭЧ-4(81) под торговым названием «Культуры клеток диплоидные человека для заместительной терапии». Линия клеток получена в Свердловском НИИ вирусных инфекций из тканей человеческого эмбриона, погибшего в 1972 году. Особенностью клеток ЛЭЧ-4(81) является их низкая жизнеспособность, составляющая по данным академика РАМН В.Н. Смирнова 2% (по данным НИИ трансплантологии и ИО и нашим данным – немногим выше), а также аллогенность.

Принято считать, что культивируемые фибробласты характеризуются низкой экспрессией антигенов главного комплекса гистосовместимости [2]. Однако даже у ранних предшественников клеток фибробластического дифферона человека выявляется высокая степень экспрессии антигенов ГКГ первого класса и отсутствие экспрессии антигенов второго класса, обнаруживаемых, впрочем, внутриклеточно [17]. Между тем уже через 48 часов после цитокинового рост-индуцирующего воздействия более 90% клеток культуры начинают экспрессировать антигены ГКГ не только первого, но и второго класса. Поэтому генетически чужеродные фибробласты обычно вызывают такую же типовую реакцию отторжения, как и клетки других типов.

Анализ результатов применения аллогенных клеток в стоматологии дает основание считать, что для достижения наибольшего эффекта следует применять исключительно аутологичный клеточный материал.

В тоже время клетки фибробластического дифферона различной степени зрелости способны к образованию волокон и межклеточного вещества, но не костной ткани. Последняя требует присутствия в культуре полипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ПМСК), дифференцирующихся в том числе в остеобласты.

В отличие от большинства тканей, происходящих от одного типа стволовых клеток-предшественников (мезо-; экто-; энто-), формирование зуба (первичный дентогенез) требует прямого взаимодействия мезодермальных и эктодермальных прогениторных клеток [21, 22]. Примечательно, что и вторичный дентиогенез также поддерживается одонтобластами, возникающими при взаимодействии ПМСК и эпителиальных клеток ротовой полости эктодермального происхождения [9, 27].

Механизмы межклеточного взаимодействия остаются малоизученными, а попытки их моделирования комбинациями цитокинов – безуспешными. Последнее, по-видимому, обуславливает актуальность разработки методики совместного культивирования постнатальных клеток фибробластического и эктодермального дифферонов. Смешанная культура такого состава, содержащая прогениторные клетки и обладающая комплексным действием в отношении костной, соединительной и эпителиальной тканей, может быть востребована для терапии пародонтита.

Основная цель (всего исследования): разработка технологии применения культивируемых клеток кожи в терапии деструктивных заболеваний пародонта.

Цель доклинической фазы исследования: разработка и совершенствование метода культивирования постнатальных клеток кожи, определение критериев безопасности и эффективности их применения.

Поставленной цели экспериментального исследования наилучшим образом соответствует моноцентровое открытое рандомизированное плацебо-контролируемое параллельное исследование.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с протоколом, утвержденным в установленном порядке, международным кодексом правил для лабораторных исследований (GLP) и действующим законодательством.

Цель исследования предусматривала выбор ткани пациента для получения клеток фибробластического и эктодермального дифференции, что обусловлено необходимостью разработки технологии комплексного восполнения утраты костной, соединительной и эпителиальной тканей. Анализ состава тканей и доступности их для эксплантации позволил остановить выбор на коже как на источнике клеток для культивирования. Выбор был также основан на результатах ранее выполненных исследований.

Использовали образцы (эксплантаты) кожи кроликов (породы шиншилла, вес 2–2,5 кг) и эксплантаты человеческой кожи, получаемые от пациентов хирургических клиник во время плановых оперативных вмешательств, предусматривающих иссечение кожного лоскута, а также у испытуемых в условиях лаборатории. Всего в процессе отработки методики исследовали около 80 эксплантатов из области спины 16 кроликов и 62 эксплантата кожи из различных областей тела 42 пациентов различного пола и возраста.

Образцы кожи для всех исследований отбирали при отсутствии противопоказаний и местном обезболивании (общее обезбоживание использовалось при проведении плановых оперативных вмешательств в хирургических клиниках). Эксплантаты помещали в солевой буферный раствор PBS (MP Biomedicals, США), содержащий двухкратные культуральные концентрации пенициллина, стрептомицина, тилозина (все Sigma, Германия) и амфотерицина В (MP Biomedicals, США) и сохраняли при 4°C не более 24 часов. Перед взятием эксплантата получали от 4 до 9 мл венозной крови с целью извлечения плазмы для диагностических исследований и использования при криоконсервации.

Материалы и методы культивирования клеток. Культивирование постнатальных клеток мезо- и эктодермального происхождения предъявляет особые требования, обеспечивающие сбалансированное поддержание классов клеток.

Культуральные среды готовили из концентратов на стерильной воде с высокой степенью очистки класса MQ (удельное сопротивление не менее 20 МОм). Среда для культивирования включала: среды D-MEM (Sigma) – 60%, Ham's F-10 (MP Biomedicals) – 30% и фетальную бычью сыворотку степени очистки defined (HyClone, США) – 10%. Полученную смесь титровали до pH 7,3 при 5% CO₂ и фильтровали через стерилизующий ацетатцеллюлозный фильтр (диаметр пор – 0,2 мкм; Sarstedt, Германия). На начальном этапе культивирования в среду добавляли

антибиотики в «культуральных» концентрациях: пенициллин – 100 ЕД/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл, тилозин – 10 мкг/мл, амфотерицин-В – 2,5 мкг/мл (Sigma, MP Biomedicals, все антибиотики относятся к категории «для исследований in vitro»).

Выделение клеток из кожного эксплантата проводили по стандартной методике. Ткань нарезали на мелкие фрагменты, промывали PBS и инкубировали в 0,25% растворе трипсина (37°C, 10 мин). Трипсин инактивировали добавлением фетальной бычьей сыворотки. После вортексирования взвесь фильтровали через нейлоновую сетку (диаметр пор 100 мкм, BD Falcon, США) и центрифугировали при 150 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в готовой культуральной среде. Полученную взвесь помещали на полистироловые чашки Петри диаметром 40 мм (Orange Scientific, Бельгия) и далее – в CO₂-инкубатор.

Культивирование клеток проводили в инкубаторе Sanyo (Япония) при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Культуральную среду меняли один раз в три дня. Ежедневно производили микроскопический контроль за состоянием культуры с использованием темнопольной и фазово-контрастной микроскопии.

Культуру выращивали до получения требуемой клеточной массы. Перед заключительным пассажем клетки культивировали на целлофане. По завершении культивирования под микроскопическим контролем часть эпидермоцитов с признаками кератинизации удаляли вместе с частью целлофана, сохраняя зону перехода клеточных рядов. При этом соотношение эпидермальных и фибробластических клеток в конечной культуре составляло 5:95. Клетки на целлофане трипсинизировали, нейтрализовали трипсин ингибитором (MP Biomedicals) при соотношении трипсин-ингибитор 1:1 (по массе), отмывали и использовали для исследования, введения экспериментальным животным или криоконсервации.

Клеточные культуры консервировали по Hay R.J. [10]; Farrant J. [7]; Mazur P. [19] в аутологичной плазме крови, содержащей 10% (по объему) стерильного диметилсульфоксида – ДМСО (MP Biomedicals). Хранение гомогенной взвеси клеток в консервирующем растворе осуществляли в стерильных криопробирках (Greiner, Германия) в морозильной камере (Sanyo, Япония) при температуре -70°C (в первые 24 часа) с последующим перемещением в жидкий азот. Методика обеспечивает длительную сохранность свойств клеток.

Для разморозки извлеченную из жидкого азота пробирку помещали на водяную баню при 37°C. После исчезновения кристаллов льда клетки многократно отмывали от консерванта центрифугированием.

Методы оценки функциональных и морфологических параметров культивируемых клеток. Подсчет клеток производили на гематологическом анали-

заторе Cobas Micros OT. Жизнеспособность определяли по проценту окрашенных (0,4% раствором трипанового синего) клеток в камере Горяева. Принимая во внимание высокую погрешность данного метода (при соблюдении всех тонкостей протокола составляет не менее 10%), одновременно оценивали пролиферативную активность клеток (40-минутная инкубация клеточной взвеси с 214С-тимидином с последующей отмывкой на фильтрах и радиометрией). Подсчет радиоактивности производили в спирто-толуоловом сцинтилляторе на жидкостном сцинтилляционном счетчике Бета-2 (эффективность счета по углероду – 98%). Результаты выражали в беккерелях на 10^6 клеток. Полученный результат сравнивали с эталонным уровнем радиоактивности клеток пациента после первого пассажа и выражали в процентах.

Колониеобразующую активность клеток исследовали после фиксации, окраски и подсчета и определяли как отношение числа колоний, состоящих не менее чем из 20 клеток, к числу посеянных. Эффективность адгезии рассчитывали как отношение числа клеток, прикрепившихся к культуральной поверхности через 24 часа после посева, к числу посеянных.

Для морфологического исследования в чистые матрасы вносили покровные стекла, которые извлекали по завершении культивирования. Извлеченные стекла использовали для приготовления отдельных препаратов (обычно на 15–30 сутки после начала культивирования). Клетки фиксировали 100% метанолом и окрашивали азур-эозином.

С целью выявления в клеточных культурах из экплантатов кожи ранних предшественников фибробластов, была использована иммуногистохимическая окраска, позволяющая выявить специфический для ПМСК маркер STRO-1. Препараты готовили из 4-недельных дермальных культур человека, пятикратно обогащенных центрифугированием (460 g 15 мин) в 70% градиенте перколла (Sigma), и исследовали на люминесцентном микроскопе Люмам ИЗ.

Методы оценки безопасности применения культивируемых клеток. Образцы крови и культуры клеток испытуемых тестировали на отсутствие контаминации инфекционными агентами: Anti-HIV-1 и -2, HIV1-Ag, Anti-HTLV-I и -II, Anti-HBcor-Ag, HBs-Ag, Anti-HCV, Anti-CMV, Anti-Toxoplasma gondii, RW, Neisseria gonorrhoeae, Chlamidia, Mycoplasma с использованием ПЦР и иммуноферментных методов.

С целью контроля культур на предмет выявления ранних признаков опухолевой трансформации применяли метод обнаружения точковых мутаций.

Для злокачественной трансформации значимы мутации в генах-супрессорах опухолевого роста и онкогенах. Последние, при возникновении в них мутаций, обуславливают бесконтрольное деление клеток. Поэтому применение клеточных техно-

логий требует отслеживания ранних генетических признаков опухолевой трансформации во время культивирования клеток, что является обязательным условием обеспечения безопасности клеточной терапии.

Доклинические исследования предусматривали двухэтапный контроль онкотрансформации в культуре клеток.

Исследованию на наличие мутаций подвергали взвесь культивируемых клеток после 4–5 пассажей. Для оценки мутаций использовался стандартный комплект оборудования и реагентов для ПЦР, флуоресцентный ПЦР-детектор и синтезированные праймеры (Sigma, НПО «ДНК-технология», «Литех»).

Для исследования деструктивных потенциалов культивируемых клеток использовали наборы реагентов для количественного определения металлопротеиназы-1 (Amersham PB) в культуральной среде, специфичных как для общей ММП-1 и про-ММП-1, так и для активной формы ММП-1. При этом уровень ММП-1 в образце пропорционален интенсивности окраски хромогенного пептида, расщепляемого детекционным ферментом. Концентрацию металлопротеиназы оценивали по светопоглощению при длине волны 405 нм по калибровочной кривой. Исследованию подвергали культуральные среды после 1–2 пассажей.

С целью уточнения режима отмывки клеток перед трансплантацией и для исключения возможного эффекта оставшихся на(в) культивированных клетках компонентов среды и криоконсерванта был применен тест Дрейза в стандартном исполнении. Кролики были распределены на четыре группы (всего 16 животных, по четыре в каждой группе). Исследовали эффект клеток кролика после культивирования в течение 30 суток без заморозки и после 30-суточной криоконсервации. Первой группе наносили на роговицу одного глаза взвесь культивированных клеток после 90-минутной отмывки (три стандартных цикла центрифугирования с удалением супернатанта; 150 g; 10 мин; 4°C); второй группе – культивированные клетки после шестичасовой отмывки (восемь циклов центрифугирования); третьей группе наносили взвесь размороженных клеток после 90-минутной отмывки от криоконсерванта (три цикла центрифугирования); четвертой группе – ту же взвесь, но после шестичасовой отмывки от криоконсерванта (восемь циклов центрифугирования). Второй глаз каждого животного во всех случаях был контрольным. В качестве отмывочного и раствора для нанесения на роговицу глаз животных в опыте и контроле был использован стерильный 0,9% раствор NaCl.

10^6 клеток кролика в 100 мкл раствора наносили на роговицу иммобилизованных кроликов с фиксированными (клипсами) веками. Через 6, 12, 24 и 48 часов отмечали изменения роговицы и сравнивали с контролем.

Методы оценки эффектов культивируемых клеток. Исследование выполняли на пяти кроликах. Миграционные способности клеток непосредственно в тканях исследовали методом радиоавтографии. Для этого в 20-суточную культуру добавляли 2^{14}C -тимидин (37 кБк/мл среды) за трое суток до трансплантации. По завершении культивирования клетки отмывали от компонентов среды и свободного тимидина и по 10^6 клеток в 100 мкл физиологического раствора вводили в кожу в четыре зоны в области спины. Через 2, 4, 6 и 8 суток участки кожи с введенными клетками (15x15 мм) иссекали, фиксировали формалином и помещали между фотопленками Kodak со светочувствительностью 800 ед. Кожные лоскуты экспонировали в плотном контакте со светочувствительным слоем в течение 30 суток, после чего фотопленки проявляли, сканировали и учитывали размеры и светопропускание пятен по каждому лоскуту.

Для определения эффекта трансплантации участки кожи кроликов в месте введения 10^6 клеток иссекали на 180-е сутки и на гистологических препаратах исследовали толщину дермы. Результаты сравнивали с препаратами участков кожи спины тех же кроликов, в которые вводили физиологический раствор.

Вычисляли основные статистические показатели: $M \pm m$ (где M – средняя величина, а m – стандартная ошибка средней величины). Достоверность полученных результатов определяли по парному критерию Стьюдента.

Результаты исследования

Постановка и совершенствование метода культивирования постнатальных клеток кожи. Характеристики культивируемых клеток находятся в прямой зависимости от всех составляющих технологии, включая качество реагентов, оборудования и квалификацию персонала. Отражением соблюдения технологии в выполненном исследовании явились показатели жизнеспособности клеток, их адгезивности, колониеобразования, пролиферативной активности и морфологических особенностей культивируемых клеток.

В наших исследованиях жизнеспособность клеток во все сроки культивирования, а также хранения при 4°C в течение 24 часов после завершения культивирования составляла не ниже 95%. К 36 часу хранения показатели снижались до 80%, а при изменениях температурного режима – до 40% и менее.

Эффективность адгезии клеток в процессе пассажей культур составляла от 40 до 80%, а колониеобразующая активность колебалась от 12 до 63%, что согласуется с данными других авторов (Cristofalo V.J. et al., [5]) для постнатальных линий.

Важным показателем соблюдения оптимальных условий культивирования клеток служит их пролиферативная активность, определяемая по включению импульсной метки. Результаты представлены в таблице 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что включение 2^{14}C -тимидина характеризуется увеличением во время второго (19–23 сутки культивирования) – третьего (27–32 сутки) пассажей клеток доли ДНК-синтезирующих клеточных форм до 170–180% по сравнению с клетками после первого пассажа, что может свидетельствовать об отборе в условиях культуры синтетически активных клеток. В последующие сроки (35–39 и 42–45 сутки культивирования) пролиферативная активность клеток сохраняется на уровне контрольных величин. В процессе суточного хранения при 4°C клетки сохраняют пролиферативную активность. В то же время к 36 часу хранения синтетическая активность клеток снижается на 40%.

Морфологически культуры клеток определяли на 20–30 сутки культивирования. Микрофотографии культуры клеток пациентки С. представлены на рисунке 1 (А, Б, В).

Иммуногистохимическая окраска клеток человеческих дермальных культур, разделенных в градиенте 70% перколла, позволила выявить STRO-1 – позитивную фракцию (клетки низкой плотности 1,03 г/мл), содержащую ПМСК. Наряду с этим клетки средней и высокой плотности (1,1 г/мл и более), оставшиеся в осадке, отнесены к STRO-1 негативной фракции. Последнее свидетельствует не только об удовлетворительном фракционировании клеток, но и о присутствии в культурах стволовых клеточных элементов (рис. 2).

Таблица 1

Пролиферативная активность клеток по включению в ДНК 2^{14}C -тимидина в динамике культивирования и хранения

Пассажи	1	2	3	4	5	Посткультивационное хранение клеток после пятого пассажа в изотоническом солевом растворе в течение	
						24 часов	36 часов
В Бк/ 10^6 клеток	8.8 ± 2.2	$15.1 \pm 2.0^*$	$15.9 \pm 3.9^*$	11.6 ± 0.5	9.3 ± 2.1	10.8 ± 3.2	$5.2 \pm 1.2^*$
В % к первому пассажию клеток	100.0	171.6	180.7	131.8	105.7	122.7	59.1

* статистически достоверные отличия ($p < 0.05$) от показателя клеток первого пассажа.

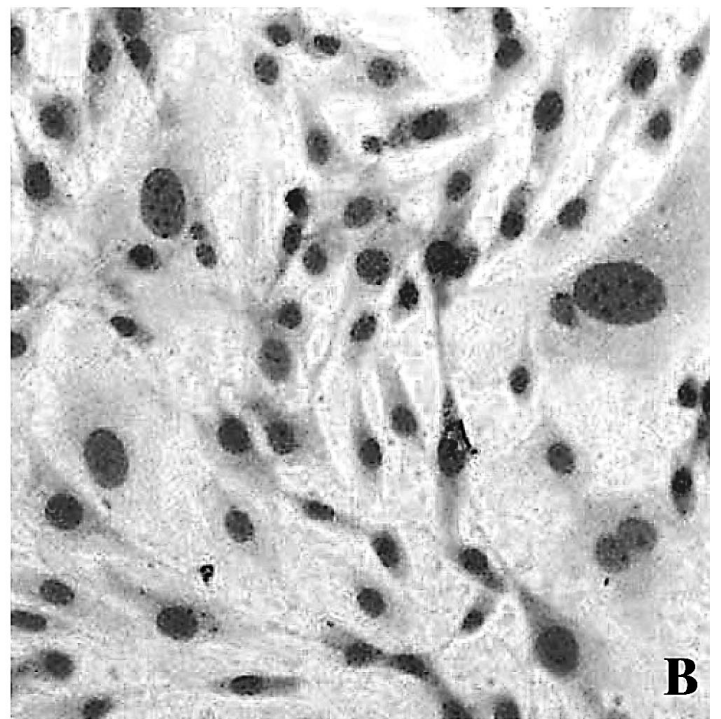
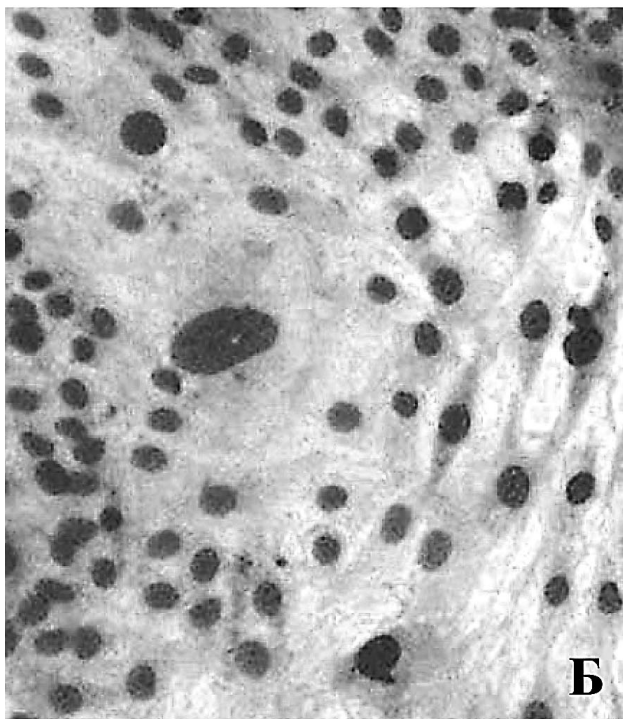
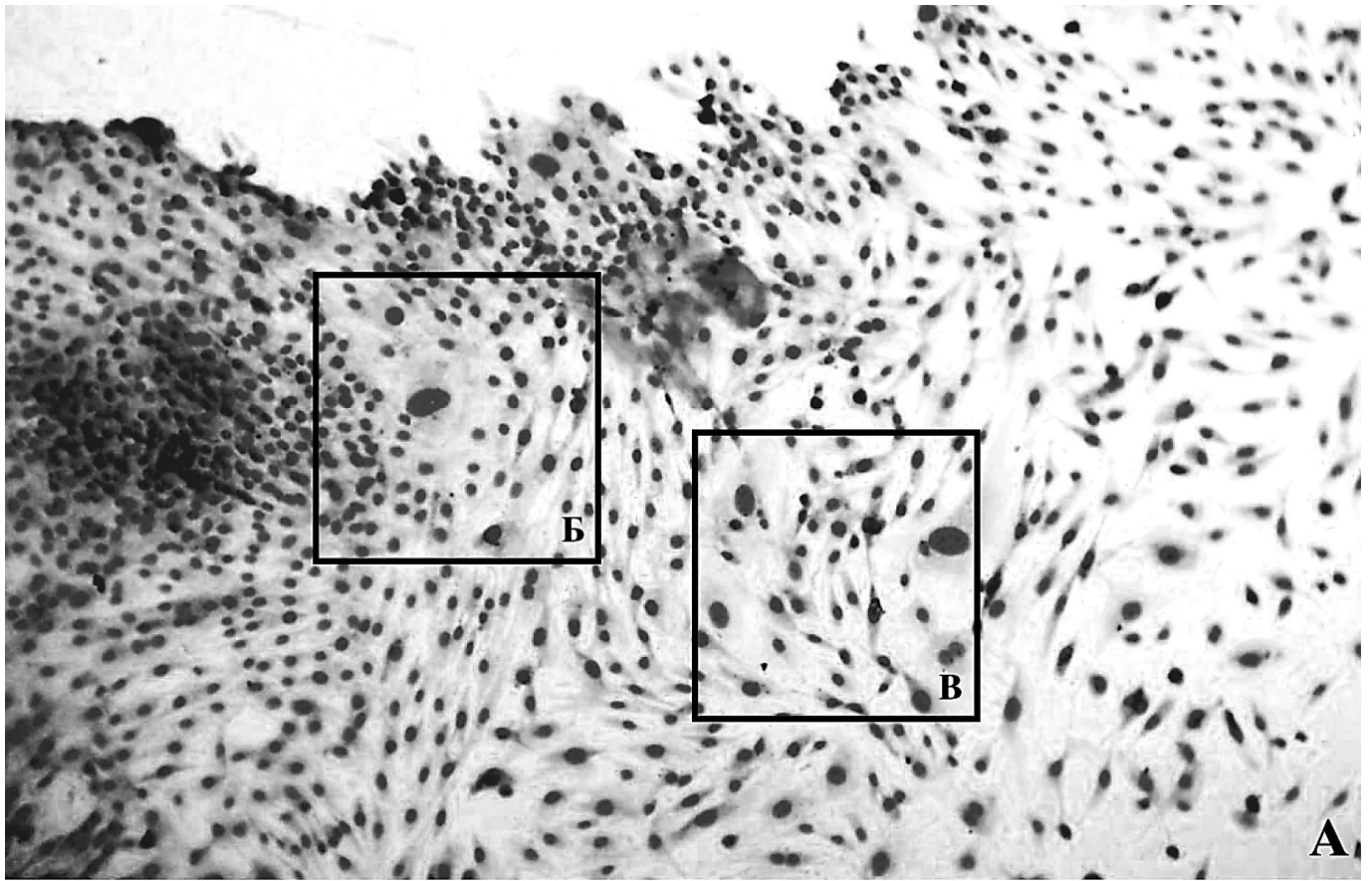


Рис. 1А. Область контакта фибробластического (справа и внизу) и эпидермального (слева и вверху) рядов клеток, напоминающая структуру кожи. В этой области формируется подобие базальной мембраны, вблизи которой преобладают базальные и эпидермальные стволовые клетки. Ув. x 100

Рис. 1Б. Стволовая клетка – предшественник эпидермальных клеток. Для нее характерны крупные размеры, большое количество ядрышек и выраженная зернистость цитоплазмы. Ув. x 400

Рис. 1В. Унипотентные стволовые клетки – предшественники фибробластов в окружении малодифференцированных и юных фибробластов, имеющих ярко окрашенное ядро с ядрышками, базофильную зернистость цитоплазмы. Ув. x 400

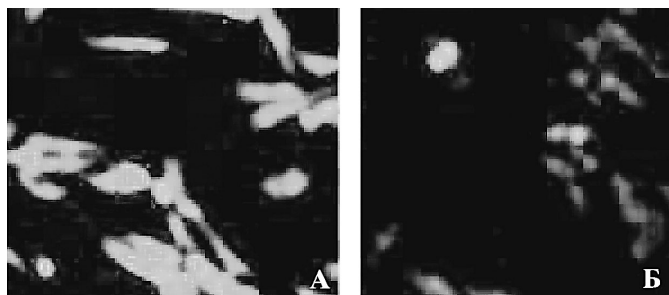


Рис. 2. Культивируемые клетки дермы человека

А. STRO-1 позитивная фракция

Б. STRO-1 негативная фракция (осадок)

Клетки, несущие маркер STRO-1, обладают основными свойствами полипотентных мезенхимальных стромальных клеток: полипотентностью и высокой пролиферативной активностью [6, 8, 28].

Выявление в культуре дермальных клеток стволовых клеток-предшественников может обеспечить генерацию зрелых клеточных форм и, за счет самоподдержания, длительность функционирования трансплантированных клеток в тканях реципиента.

Таким образом, применяемая технология позволяет поддерживать высокую функциональную активность культивируемых клеток, по-видимому, за счет сегрегации активно пролиферирующих клеток-предшественников. Последнее подтверждается морфологической картиной, визуализирующей как малодифференцированные и юные клетки, так и стволовые клетки, способные обеспечить продолжительное пополнение зрелого пула и долговременный клинический эффект их трансплантации.

Определение критериев безопасности применения культивируемых клеток кожи. Критерии безопасности применения культивируемых клеток включают предварительный анализ анамнеза пациентов – доноров эксплантатов кожи, врачебный осмотр, определение контаминации инфекционными агентами, оценку мутаций генов-супрессоров опухолей и протоонкогенов в культуре и уровня протеиназной активности культивируемых клеток. Важным элементом обеспечения безопасности является определение параметров отмывки клеток от следов реагентов, используемых для культивирования и криоконсервации (все реагенты относятся к категории «для исследований *in vitro*»).

В процессе исследования образцов крови доноров и эксплантатов кожи выявлен высокий уровень их контаминированности микоплазмой (*pneumoniae, genitalium* или *hominis*). Поиск средств элиминации микоплазмы и профилактики обсемененности клеточных культур микоплазмой позволил остановить выбор на увеличении концентрации тилозина в культуральной среде до 200 мкг/мл. Последняя не оказывала токсического эффекта на клетки, однако в течение двух недель культивирования обеспечивала элиминацию фрагментов ДНК микоплазмы во всех случаях ее выявления.

Для контроля мутаций, способных увеличить риск

неоплазии после трансплантации клеток, исследовали мутации в генах p53 кодон 175 (1 мутация), кодон 248 (3 мутации), кодон 273 (4 мутации); V-raf (2 мутации); K-ras (2 мутации) [3, 16, 35].

В предварительных слепых исследованиях 33 образцов крови больных с морфологически идентифицированной онкологической патологией I-II стадии различной локализации и восьми контрольных образцов была подтверждена высокая достоверность метода – 94% (от 1 до 2 исследуемых мутаций было выявлено в 31 образце крови, в двух образцах крови больных и в восьми контрольных образцах мутаций не обнаружено; вероятность ложноотрицательного результата 6%).

Выборка культур при выявлении мутаций исследуемых генов позволяет с известной степенью достоверности исключить возможность возникновения опухолевого клона из трансплантируемых клеток.

Безопасность внутридермального введения культивируемых клеток зависит от степени фибробласт-опосредованной деградации ее компонентов. При высокой протеиназной активности культивируемых клеток возможным результатом их трансплантации может стать усугубление процессов распада компонентов и развитие воспалительной реакции в месте введения. В свою очередь, повышение уровня металлопротеиназы-1 (интерстициальной коллагеназы – ММП-1) в культуральной среде уже после первого пассажа клеток свидетельствует о начальном этапе деградации соединительной ткани, предшествующем активации всего ферментативного каскада зимогенов ММП.

Концентрация ММП-1 в культуральной среде человеческих культур после первого пассажа отличалась значительным разбросом показателей – от 3,25 до 35 нг/мл при чувствительности метода 1,7 нг/мл. Расчет ММП-1 на количество клеток в культуре не позволил выявить зависимость концентрации ММП-1 от возраста пациентов, пролиферативной активности клеток, площади культуральной поверхности. Была зафиксирована лишь несколько более высокая активность металлопротеиназы (в среднем на 15%) при культивировании клеток на стекле.

Однако анализ первичной реакции на введение аутофибробластов при клинических испытаниях для коррекции изменений кожи [1] позволяет предполагать, что повышенный уровень ММП-1 в среде может обусловить признаки воспаления в месте введения клеток. Так, у пациентки с концентрацией ММП-1 35 нг/мл наблюдалось покраснение, продолжавшееся до 2 суток, в то время как у пациентов с уровнем ММП-1 до 20 нг/мл признаки воспаления исчезали в первые 24 часа. Важно отметить, что концентрация ММП в среде отдельно культивируемых клеток, полученных от одного пациента, у трети испытуемых отличалась на 10–20%, что не только дает основание для выбраковки части культур с наибольшим уровнем ММП-1, но и позволяет минимизировать вероятность возникновения осложнений клеточной терапии.

Таблица 2

Результаты теста Дрейза (n – количество исследуемых роговиц) через 6, 12, 24 и 48 часов после нанесения взвеси фибробластов (опыт) или 0,9% раствора NaCl (контроль)

Группы исследуемых		Количество исследуемых объектов с признаками воспаления в различные сроки наблюдения			
		6 часов	12 часов	24 часа	48 часов
I группа	опыт (n=4)	1	1	–	1
	контроль (n=4)	–	–	–	–
II группа	опыт (n=4)	–	–	–	–
	контроль (n=4)	–	–	–	1
III группа	опыт (n=4)	4	4	2	3
	контроль (n=4)	–	–	–	1
IV группа	опыт (n=4)	–	–	–	–
	контроль (n=4)	–	–	–	1

Результаты теста Дрейза (табл. 2) продемонстрировали зависимость появления признаков воспаления роговицы от продолжительности и интенсивности отмывки культивированных клеток. Так, на(в) клетках, снятых с культуральной поверхности, после полуторачасовой отмывки сохраняются агенты, вызвавшие альтерацию роговицы (I группа). Несмотря на относительную непродолжительность сохранения признаков раздражения роговицы (первые 6 и 12 часов – в 25% случаев), параметры отмывки были признаны недостаточными. После интенсивной отмывки клеток признаки повреждения роговицы в данном тесте отсутствовали (II группа). В свою очередь, наиболее выраженные изменения оказывают следы криоконсерванта (ДМСО). В III группе – после 90-минутной отмывки наблюдаются признаки альтерации на 6 и 12 часов (в 100% случаев), а спустя 24 и 48 часов – в 50 и 75% (III группа). Более продолжительная отмывка (IV группа) оставляет роговицу неповрежденной. В то же время результаты теста Дрейза на исследуемых животных, по-видимому, достоверны в первые 24 часа, но не в более поздние сроки, когда появляются признаки спонтанного повреждения роговицы (вероятно, в результате высыхания слизистой вследствие наложения клипс), наблюдаемые у животных в контрольных группах.

Таким образом, выполненные исследования позволяют уточнить критерии исключения (испытуемых и/или клеточных культур) для клинического испытания технологии посредством введения дополнительных показателей контроля качества на этапе культивирования клеток, а также опытным путем установить режим отмывки клеток для удаления следов культуральной среды и криоконсерванта.

Оценка эффектов внутридермального введения аутогенных культивируемых клеток кожи. Ожидаемый эффект трансплантации культивированных клеток связывается с их активным функционированием в области введения. Это должно сопровождаться новообразова-

нием волокон и межклеточного вещества. В наших экспериментах было выявлено, что толщина дермального слоя в области спины кроликов в обычных условиях не превышает 1 мм и колеблется в среднем от 0,7 до 0,9 мм.

Эффект от внутридермального введения аутогенных клеток в кожу спины кроликов спустя шесть месяцев проявлялся утолщением кожи (оцениваемой при захвате) и увеличением толщины собственно дермы до 2,0–2,5 мм. Гистологически было выявлено, что на 180-е сутки после трансплантации клеток в зоне введения утолщение достигается за счет большей выраженности сетчатого слоя. Была отмечена относительная гомогенность структуры в области утолщения, а гистологических признаков воспалительного инфильтрата ни у одного из пяти экспериментальных животных зарегистрировано не было. Утолщение наблюдалось в радиусе 3–5 мм от точки введения, что свидетельствует о миграции трансплантированных клеток. Последние, как известно, в процессе направленного движения выполняют генерирующую функцию, а скорость их миграции по культуральной поверхности может достигать 9 мм в сутки. Однако в тканях, ввиду контактного торможения, темпы локомоции, по-видимому, существенно ниже.

При исследовании размеров засвеченных радиоактивным углеродом пятен на светочувствительном слое фотопленки, оставленных иссеченными участками кожи с введенными мечеными культивируемыми клетками, выявлено, что через 2 суток после введения меченых клеток зона просветления в диаметре составляла 0,7-1,0 мм, а к 4, 6 и 8 суткам расширялась до 5 мм с падением светопропускания фотопленки на 10, 18 и 55% соответственно, особенно в краевых зонах. Последнее может свидетельствовать о миграции клеток с их рассредоточением по большей площади. Вероятно введенные клетки в первые сутки располагаются компактно, а в последующем инфильтрируют окружающие участки дермы.

Таким образом, эффект введения клеток связан с их миграцией из области инъекции, динамичной инфильтрацией прилегающих участков дермы и утолщения последней за счет разрастания сетчатого слоя, основные компоненты которого синтезируются фибробластами.

Анализ результатов и разработка рекомендаций для проведения дальнейших исследований. Ранее было показано [1], что оптимальной зоной для взятия эксплантата кожи с целью последующего культивирования является ягодичная область. Выбор последней обусловлен сохранностью клеток с высокой функциональной активностью и выраженностью ее слоев, что дает возможность ограничить площадь эксплантируемого образца 10 мм² и тем самым не только минимизировать травматичность процедуры эксплантации, но и уменьшить сроки восстановления повреждения.

Также в процессе исследований нами не была установлена зависимость функциональных параметров клеток от возраста донора. Это свидетельствует о сохранении в «закрытых» участках кожи клеток-предшественников с высоким пролиферативным потенциалом, способных

обеспечить эффективное клонирование клеток. Последнее согласуется с результатами других исследователей, в частности Cristofalo V.J. [5], не выявившего корреляционной взаимосвязи между возрастом донора и продолжительностью жизни клеток в культуре. Полученные результаты подтверждают возможность применения аутогенных культур клеток кожи пожилых пациентов для терапевтических целей.

По нашим данным, в культуре происходит отбор и стимуляция ранних клеток-предшественников, сохранивших высокие потенции не только к делению, но и самоподдержанию, и вытеснение из культуры маложизнеспособных клеток, имеющих ограниченную способность к пролиферации.

При пересадке культура клеток локально заселяет ткань и синтезирует компоненты внеклеточного матрикса и факторы роста, необходимые для восстановления дефектов ткани.

Результаты исследования не только продемонстрировали возможность наращивания *in vitro* функционально активной клеточной массы, достаточной для применения, но и позволили сформировать методические рекомендации для проведения клинических испытаний:

1. Культивирование клеток в течение 4–5 недель (до пяти пассажей) позволяет вне зависимости от возраста пациента получать достаточное для проведения клинического испытания количество клеток (не менее 30×10^6), характеризующихся высокой пролиферативной активностью и способностью к синтезу волокон и высокомолекулярных гликозаминогликанов.

2. Продолжительность отмывки клеток от компонентов культуральной среды и/или криоконсерванта в изотоническом солевом растворе не может составлять менее 6 часов (восемь циклов центрифугирования). Это дает возможность исключить контакт испытуемого с реагентами, относящимися к категории «для исследований *in vitro*», и снизить вероятность осложнений после трансплантации клеток.

3. Общая продолжительность хранения клеточной культуры перед использованием (в изотоническом солевом растворе при 4°C) не должна превышать 24 часов. Это обеспечивает гарантированную сохранность жизнеспособности и функциональной активности клеток.

Проведенные исследования позволили дополнить критерии исключения из испытания. Наряду с известными критериями исключения в число исключаящих критериев на этапе культивирования клеток введены случаи выявления мутаций генов-супрессоров опухолей и протоонкогенов в клеточных культурах и высокого уровня металлопротеиназы-1 в культуральной среде (более 20 нг/мл).

Обнаружение в культурах микоплазмы (*pneumoniae*, *genitalium* или *hominis*) отнесено к относительным противопоказаниям, так как увеличение концентрации тилозина в культуральной среде в течение первых недель культивирования во всех случаях оказалось достаточным для элиминации микоплазмы из клеточной культуры.

Выводы

Доклинические исследования позволили разработать и усовершенствовать метод культивирования постнатальных клеток кожи. Показана возможность совместного культивирования клеток фибробластического и эпидермального дифференциров с сохранением высокой функциональной активности клеток и эффект их применения.

Проведенные исследования дают основание для проведения заключительного этапа доклинических испытаний, предусматривающего создание модели парадонтита у животных и отработку технологии введения аутогенных клеток в область повреждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макеев О.Г. с соавт. Применение аутогенных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи. // Вестник Уральской Медицинской Академической Науки, 2005; № 4; P. 59–65.

2. Методические указания РД 42-28-10-89. // Минздрав СССР, Москва, 1989.

3. Arguello J.R., A.-M. Little, A.L. Pay, D. Gallardo, I. Rojas, S.G.E. Marsh, J.M. Goldman, and J.A. Madrigal. 1998. Mutation detection and typing of polymorphic loci through double strand conformation analysis. *Nat. Genet.* 18, p. 192–194.

4. Barille S., Akhouni C., Collette M. et al. Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of pro MMP-2 and induction of MMP-1 by myeloma cells. // *Blood*, 1999; 90(4); P. 1649–1655.

5. Cristofalo V.J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95(18); P. 10614–10619.

6. Dennis J. E., Carbillet J.-P., Caplan A., Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multi-potential. // *Cells Tissues Organs*, 2002; 170; P. 73–82.

7. Farrant J. General observations on cell preservation. // In: M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Eds. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, Pitman Medical Limited, Kent, England, 1980; P. 1–18.

8. Gronthos S., Graves S. E., Ohta S., Simmons P. J. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. // *Blood*, 1994; 84; P. 4164–4173.

9. Gronthos S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. // *J. Dent Res.* 2002; 81; 8; P. 531–535.

10. Hay R.J. Preservation of Cell Culture Stocks in Liquid Nitrogen. // *TCA Manual* 4, 1978; P. 787–790.

11. Hiraoka N., Allen E., Apel I. et al. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. // *Cell.*, 1998; 95; P. 365–377.

12. Hou L.T., Tsai A.Y., Liu C.M., Feng F. Autologous transplantation of gingival fibroblast-like cells and a hydroxylapatite complex graft in the treatment of periodontal osseous defects: cell cultivation and long-term report of cases. // *Cell Transplant.*, 2003; 12(7); P. 787–797.

13. Jeng J.H., Lan W.H., Wang J.S., Chan C.P., Ho Y.S., Lee P.H., Wang Y.J., Wang T.M., Chen Y.J., Chang M.C. Signaling mechanism of thrombin-induced gingival fibrob-

last-populated collagen gel contraction. // *Br J Pharmacol.*, 2006;147(2); P. 188–198.

14. Johansson N., Ahonen M., Kahari V. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. // *Cell Mol. Life Sci.*, 2000; 57; P. 5–15.

15. Johnson T.C., Reinhardt R.A., Payne J.B., Dyer J.K., Patil K.D. Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. // *J Clin Periodontol.*, 1997;24(9 Pt 1); P. 618–625.

16. Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J.J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. // *Nucleic Acids Res.*, 1990; 18(4) P. 999–1005.

17. Le Blanc K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. // *Exp. Hematol.*, 2003; 31; P. 890–896.

18. Markowska J., Radwan-Oczko M., Zietek M. Clinical and radiographic evaluation of Bio-Oss for the treatment of periodontal intra-bony defects—6 months study. // *Polim Med.*, 2005;35(3); P. 67–74.

19. Mazur P. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. // *Am. J. Physiol.*, 1984; 247 (Cell Physiol. 16), – P. 125–142.

20. McGuire M.K., Nunn M.E. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast-derived dermal substitute. Comparison to the gingival autograft: a randomized controlled pilot study. // *J Periodontol.*, 2005;76(6); P. 867–880.

21. Murray P., Garcia-Godoy F. Stem cell responses in tooth regeneration. // *Stem Cells and Development*. 2004; 13; P. 255–262.

22. Ohazama A et al. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. // *J. Dent Res.* 2004; 83; 7; P. 518–522.

23. Pepper M. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. // *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*, 2001; 21; P. 1104–1117.

24. Plachokova A.S., van den Dolder J., Stoelinga P.J., Jansen J.A. The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. // *Clin. Oral Implants Res.*, 2006; 17(3); P. 305–311.

25. Renvert S., Dahlen G., Wikstrom M. Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. Relation between microbiological and clinical parameters during 5 years. // *J Periodontol.*, 1996;67(6); P. 562–571.

26. Sakata J., Abe H., Ohazama A., Okubo K., Nagashima C., Suzuki M., Hasegawa K. Effects of combined treatment with porous bovine inorganic bone grafts and bilayer porcine collagen membrane on refractory one-wall intrabony defects. // *J Periodontics Restorative Dent.*, 2006;26(2); P. 161–169.

27. Shi S. et al. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. // *Bone*. 2001; 29; 6; P. 532–539.

28. Simmons P., Gronthos S., Zannettino A., Ohta S., Graves S. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. // *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1994; 389; P. 271–280.

29. Tanaka S., Minami M., Murakami Y., Ogiwara T., Seto K., Shoji M., Hirata A., Abe S., Watanabe S., Fujisawa S. The detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in tooth, tongue and buccal mucosa plaques in children, using immunoslot blot assay (IBA). // *J Clin. Pediatr. Dent.*, 2006; 30(3); P. 251–256.

30. Tezal M., Scannapieco F.A., Wactawski-Wende J., Grossi S.G., Genco R.J. Supragingival plaque may modify the effects of subgingival bacteria on attachment loss. // *J Periodontol.*, 2006; 77(5); P. 808–813.

31. Vastardis S., Yukna R.A. Evaluation of allogeneic bone graft substitute for treatment of periodontal osseous defects: 6-month clinical results. // *Compend Contin. Educ. Dent.*, 2006; 27(1); P. 38–44.

32. Werner E., Kheradmand F., Isberg R., Werb Z. Phagocytosis mediated by *Yersinia* invasion induces collagenase-1 expression in rabbit synovial fibroblasts through a proinflammatory cascade. // *J. Cell. Sci.*, 2001; 114(18); P. 3333–3343.

33. Wong W., Kossodo S., Kochevar I. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. // *J. Formos Med. Assoc.*, 2001; 100(6); P. 377–382.

34. Yamazaki K. Periodontitis and tissue regeneration [Article in Japanese] // *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi.*, 2005; 49(4); P. 587–592.

35. Zhu K.Y., Clark J.M. Addition of a competitive primer can dramatically improve the specificity of PCR amplification of specific alleles. // *Biotechniques*, 1996; 21(4); P. 586–590.

*O.G. Makeev, A.I. Ulybin, P.S. Zubanov,
I.H. Izmailov, S.Y. Medvedeva,
S.V. Kostyukova, V.A. Buhantsev,
E.S. Kulikov, A.P. Yastrebov*

**PROSPECTS OF APPLICATION OF
CULTIVATED SKIN-DERIVED CELLS
IN THERAPY OF DESTRUCTIVE
DISEASES OF PARODONTIUM**

The Ural state medical academy, Medical molecular
technology laboratory of Middle Ural scientific center of
RAMS and Sverdlovsk Regional Government

The results of the pre-clinical tests of application of cultivated autogenous postnatal skin-derived cells, suitable for therapy of destructive forms of periodontitis, are described in the article. The opportunity of cultivation of cells of fibroblastic and epidermal populations and high functional activity of cells and effect of their application are shown.

А.М. Попов^{1,2,3}, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, Г.А. Цаур^{1,2}, Е.В. Шориков^{1,2}, Л.Г. Фечина^{1,2}

ИЗУЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ЦЕЛЬЮ СВОЕВРЕМЕННОГО ПЛАНИРОВАНИЯ СТРАТЕГИИ ЛЕЧЕНИЯ С ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

¹Центр детской онкологии и гематологии областной детской клинической больницы № 1, г. Екатеринбург; ²ГУЗ «Центр организации специализированных видов медицинской помощи Институт медицинских клеточных технологий»; ³Уральская государственная медицинская академия

Резюме

Современные лабораторные исследования, основанные на количественной оценке ответа опухоли под воздействием лечения, позволяют оценить некоторые биологические механизмы регрессии опухоли. Ранний ответ на терапию по морфологической картине костного мозга и периферической крови является одним из самых точных методов оценки долгосрочного прогноза у пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и поэтому используется большинством кооперативных исследовательских групп для стратификации пациентов по группам риска с целью выбора оптимального режима терапии. Наиболее тонким способом определения качества ответа на противоопухолевое лечение является измерение уровня минимальной остаточной болезни (MRD) в костном мозге и периферической крови с помощью современных молекулярно-биологических и иммунологических методов [8, 9, 10, 19]. В последние годы интенсивное изучение минимальной остаточной болезни позволило включить ее мониторинг в некоторые протоколы лечения ОЛЛ. На основании результатов количественной оценки MRD пациентам своевременно планируется интенсификация программной химиотерапии и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Изучение возможностей мониторинга MRD методом проточной цитометрии при самом распространенном варианте ОЛЛ представляет большой научный и практический интерес. Это исследование позволит ответить на вопрос, каким больным и в какой промежуток времени необходимы усиление программной терапии и трансплантация костного мозга.

Введение

Скорость ответа на инициальную индукционную терапию является важным прогностическим фактором долгосрочной выживаемости. Даже очень низкий процент опухолевых blastов в пределах от 1 до 4%, определяемых методом световой микроскопии может свидетельствовать о плохом прогнозе. Чрезвычайно малый объем остаточной опухоли, состав-

ляющий не более одной лейкемической клетки на 10 000 – 100 000 нормальных клеток, может свидетельствовать о необходимости интенсификации противоопухолевой терапии. Известно, что MRD <0,01% на момент окончания индукционной терапии подразумевает вероятность развития рецидива в 6%, а при уровне MRD >0,01% в 32% случаев [13]. Пациенты с определяемым уровнем MRD в пределах от 0,1% до 1% к завершению индукционной фазы имеют крайне высокий риск прогрессии заболевания [16].

Проточная цитофлуорометрия, ПЦР-диагностика, исследования клеточных культур лейкемического клона, флуоресцентная in situ гибридизация известны как наиболее чувствительные и объективные методы оценки MRD, превосходящие возможности цитоморфологических исследований периферической крови и костного мозга [8, 9].

В 90-х годах прошлого столетия R. Wasserman внедрил количественный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для оценки остаточного объема лейкемического клона к моменту завершения индукционной терапии, исследуя комплементарность реарранжированного участка гена тяжелых цепей иммуноглобулина у 44 детей с В-линейным ОЛЛ. «Большой» остаточный объем опухоли, превышающий 0,6%, был зарегистрирован у 17 пациентов, а «малый» – у 27 больных. У пациентов с «малым» остаточным объемом опухоли, безболезненная выживаемость (DFS) к моменту завершения всей программы терапии достигала 92%, а у больных с «большим» остаточным объемом DFS была ниже 50% ($p < 0,002$). Предложенный метод помогал прогнозировать неблагоприятные исходы у больных на разных этапах лечения, но не позволял оценить вероятность развития рецидивов после отмены противоопухолевой терапии [20].

Исследования, посвященные минимальной остаточной болезни

Влияние остаточного объема опухоли, сохранившегося к моменту окончания индукционной терапии, на частоту возникновения рецидивов было

показано в работах Brisco et al. Среди 88 пациентов с инициальным лейкоцитозом менее 100 тысяч, у 38 больных методом ПЦР определялся остаточный лейкоэмический клон, характеризующийся реарранжировкой гена тяжелых цепей иммуноглобулина. Частота рецидивов у этих больных была намного выше и составила 26 случаев против шести [5].

У 35 детей из группы низкого риска, получавших лечение по протоколу ALL-BFM 86, также проводились исследования генов тяжелых цепей иммуноглобулина и Т-клеточных рецепторов (TCR). Безболезненная выживаемость составила 52% у детей, имеющих MRD к концу индукционной терапии, 64% у больных с регистрируемой MRD на 15 день индукции и 100% у больных, не имеющих минимальной остаточной болезни уже к 15 дню лечения. Авторами было предложено использовать уровень MRD в качестве нового прогностического фактора для больных низкой группы риска [17].

Вклад каждого из этих тонких количественных исследований зависел от репрезентативности изучаемых признаков. ПЦР-исследования, оценивающие критерии клональной принадлежности опухоли, такие как реарранжировка тяжелых цепей иммуноглобулина или TCR, могут использоваться для изучения эволюции опухоли под воздействием химиотерапии. К сожалению, исследования молекулярных маркеров, занимающих центральное место в патогенезе, далеко не всегда способны доказать клональную принадлежность клеток. Методом гнездовой ПЦР, например, маркерный транскрипт хронического миелоидного лейкоза mBCR/ABL определялся даже в гемопоэтических клетках здоровых людей [4].

Определение MRD с помощью ПЦР-диагностики на уровне 10^{-2} более точно определяет прогноз, чем процентное содержание лейкоэмических бластов к моменту окончания индукционной терапии [9]. В рамках крупных многоцентровых исследований пока не проводилось сравнительной оценки ПЦР-исследований и раннего ответа по морфологической картине костного мозга. Наиболее чувствительный метод ПЦР не позволяет прогнозировать развитие поздних рецидивов, которые составляют более 1/3 всех событий при стандартных вариантах ОЛЛ [11]. На сегодняшний день пока нет убедительных доказательств, что иммунологические и молекулярные критерии могут полностью заменить стандартные морфологические методы. В рамках современных клинических исследований ОЛЛ они должны проводиться в параллели со стандартными способами оценки раннего ответа на терапию [2, 3].

Специалисты из университета Миннесоты в США предложили метод проточной цитофлюорометрии (FACS/LPS) для исследования клона активированных лейкоэмических клеток. Пациенты с сохранив-

шимся после реиндукции остаточным объемом опухоли рецидивировали значительно чаще, даже после проведения трансплантации костного мозга (ТКМ) [14, 18].

В последние годы серьезный интерес представляет многоцветная проточная цитометрия как наиболее перспективный метод количественного определения содержания резидуальных опухолевых бластов [6, 7]. Его применение основано на детекции так называемого лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа (LAIP), то есть специфического для опухоли сочетания экспрессии мембранных и цитоплазматических маркеров [6].

В детском возрасте детей преобладают В-линейные ОЛЛ (>80%), среди которых выделяют иммунофенотипические варианты, характеризующиеся степенью дифференцировки бластов (BI-BIV). Преобладающим является ВII-ОЛЛ («common» ОЛЛ), при котором опухолевые клетки имеют фенотип CD19(+) CD22(+) CD79a cyt(+) CD10(+) CD20(-) cytIg(-) sIg(-) [12].

Рекомендуемые различными группами исследователей панели моноклональных антител, применимых для мониторинга MRD при ВII-ОЛЛ, включают в себя антитела к пан-В-клеточному антигену CD19, маркерам В-клеток-предшественников CD10 и CD34, а также «четвертому маркеру», различному для каждой панели (наиболее часто – CD22, CD38, CD58, CD45, TdT) [7]. Применение этого «четвертого маркера» основано на количественном различии экспрессии дифференцировочных антигенов опухолевыми клетками и нормальными лимфоцитами. Однако для детекции MRD необходимо, чтобы тот или иной маркер экспрессировался подавляющим большинством лейкозных бластов.

Цель исследования – оценить возможности применения антигенов CD10, CD34 и CD22 для мониторинга MRD при «common» варианте ОЛЛ.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в лаборатории иммунофенотипирования опухолей Центра детской онкологии и гематологии № 1. В исследуемую группу вошли 18 детей (девять мальчиков и девять девочек, в возрасте от 1,5 до 9 лет) и четверо взрослых (две женщины и двое мужчин, в возрасте от 27 лет до 51 года). Материалом для проведения иммунофенотипирования служил костный мозг, полученный путем стерильной пункции. Диагностика ВII-иммунологического варианта ОЛЛ осуществлялась согласно общепринятым критериям [12]. У десяти больных была отмечена коэкспрессия миелоидных (CD13 и/или CD33) антигенов.

После инкубации суспензии костно-мозговых клеток с первично-мечеными моноклональными антителами взвесь обрабатывалась лизирующим раствором («Becton Dickinson», США), а затем

отмывалась в приборе «FACS Lyse/Wash assistant» («Becton Dickinson», США).

Определение экспрессии дифференцировочных антигенов опухолевыми бластами производилось при помощи четырехцветной проточной цитометрии на двухлазерном проточном цитофлюориметре «FACS Canto» («Becton Dickinson», США).

Для стандартизации методики применялся изотипический контроль («Becton Dickinson», США). Использовалась четырехцветная панель моноклональных антител, включавшая: анти-CD10, меченное флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), анти-CD34, конъюгированное с R-фикоэритрином (PE), анти-CD19, меченное пердининхлорофилл-протеином (PerCP), и анти-CD22, конъюгированное с аллофикиоцианином (APC) («Becton Dickinson», США).

Результаты иммунофенотипирования оценивались при помощи программного обеспечения FACS Diva («Becton Dickinson», США) следующим образом: сначала в соответствии со значениями параметров прямого и бокового светорассеяния (точечный график FSC/SSC) выделялась область лимфобластов/лимфоцитов (рис. 2a); затем на точечном графике CD19/CD22 выделялись CD19-положительные клетки и оценивалась экспрессия CD22; и, наконец, на точечном графике CD10/CD34 оценивалась экспрессия маркеров В-линейных предшественников.

Статистическая значимость различий определялась при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$. Зависимости оценивали, используя коэффициент корреляции Пирсона. Тенденции считались достоверными при $|r| > 0,5$ и $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В соответствии со значениями прямого и бокового светорассеяния в области лимфобластов/лимфоцитов оказалось в среднем $72,97 \pm 3,59\%$ клеток (диапазон 35,10–94,50%). Из них в среднем $70,92 \pm 3,82\%$ (диапазон 32,20–97,30%) экспрессировали пан-В-клеточный антиген CD19. Сходным оказался уровень экспрессии бластами

другого раннего В-линейного маркера: CD22 – $77,38 \pm 3,35\%$ (диапазон 39,30–98,00%). Причем во всех случаях была отмечена чрезмерная экспрессия данного антигена опухолевыми клетками по сравнению с нормальными лимфоцитами. Отмечалась статистически значимая высокая корреляционная связь между количеством CD19-положительных бластов и клеток с гиперэкспрессией CD22 ($r=0,72$; $p \rightarrow 0$) (рис. 1). Крайне важно то, что $98,20 \pm 0,39\%$ (диапазон 94,40–99,90%) CD19-положительных клеток имели на мембране также чрезмерно высокое количество CD22. В большинстве случаев (20 из 22) количество клеток, экспрессирующих CD19 и CD22, совпадало (рис. 2b), однако у двух больных число CD22(++)-клеток существенно превышало содержание CD19(+), составив соответственно 87,40/34,60% и 83,50/66,90% (рис. 2c). Природа CD19(-)CD22(+)-бластов остается неясной, хотя CD22 также считается достаточно ранним пан-В-линейным маркером, к тому же более специфичным для В-линейных ОЛЛ, нежели CD19 [1]. Важно то, что практически все CD19(+)-бласты гиперэкспрессируют данный антиген, что делает CD22 весьма пригодным для мониторинга MRD в большом количестве случаев ВП-ОЛЛ.

Среднее количество CD19(+)CD10(+)-клеток составило $79,36 \pm 4,65\%$ (диапазон 26,70–98,60%). Сходным был средний уровень экспрессии антигена клеток-предшественников CD34 – $76,15 \pm 5,91\%$ (диапазон 2,60–99,80%), однако количество CD19(+) CD10(+)CD34(+)-бластов оказалось достоверно ниже, всего лишь $62,32 \pm 5,73\%$ (диапазон 2,00–95,90%). При этом количество CD19(+) CD10(+)- и CD19(+) CD34(+)-бластов (рис. 2d) совпадало только в девяти случаях из 22, в семи случаях преимущественно экспрессировался CD10, еще в шести определялось большее количество CD34-положительных клеток.

Не было отмечено статистически значимых корреляционных связей экспрессии CD10 и CD34 с полом, возрастом пациентов, бластозом костного мозга, коэкспрессией миелоидных антигенов.

Следует отметить, что кроме случаев с высоким количеством клеток, имеющих на мембране оба эти антигена (рис. 2d), было зафиксировано несколько вариантов экспрессии CD10 и CD34.

В шести случаях при наличии более 90% CD34(+)-клеток уровень экспрессии CD10 варьировал от CD10(-) до CD10(++) (рис. 2e). В одном случае было зафиксировано наличие двух абсолютно обособленных групп клеток CD10(+) CD34(+) и CD10(-) CD34(+) (рис. 2h).

Экспрессия CD34 опухолевыми клетками пациентов, в костном мозге которых было большое количество CD10-положительных бластов, также была переменна. Один случай вообще оказался CD34-отрицательным (рис. 2f). Еще у шестерых больных

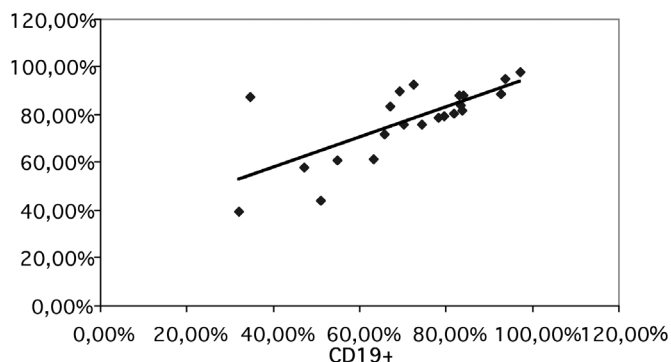


Рис. 1. Совместная экспрессия CD19 и CD22 клетками лимфобластного/лимфоцитарного региона при «common» ALL (n=22)

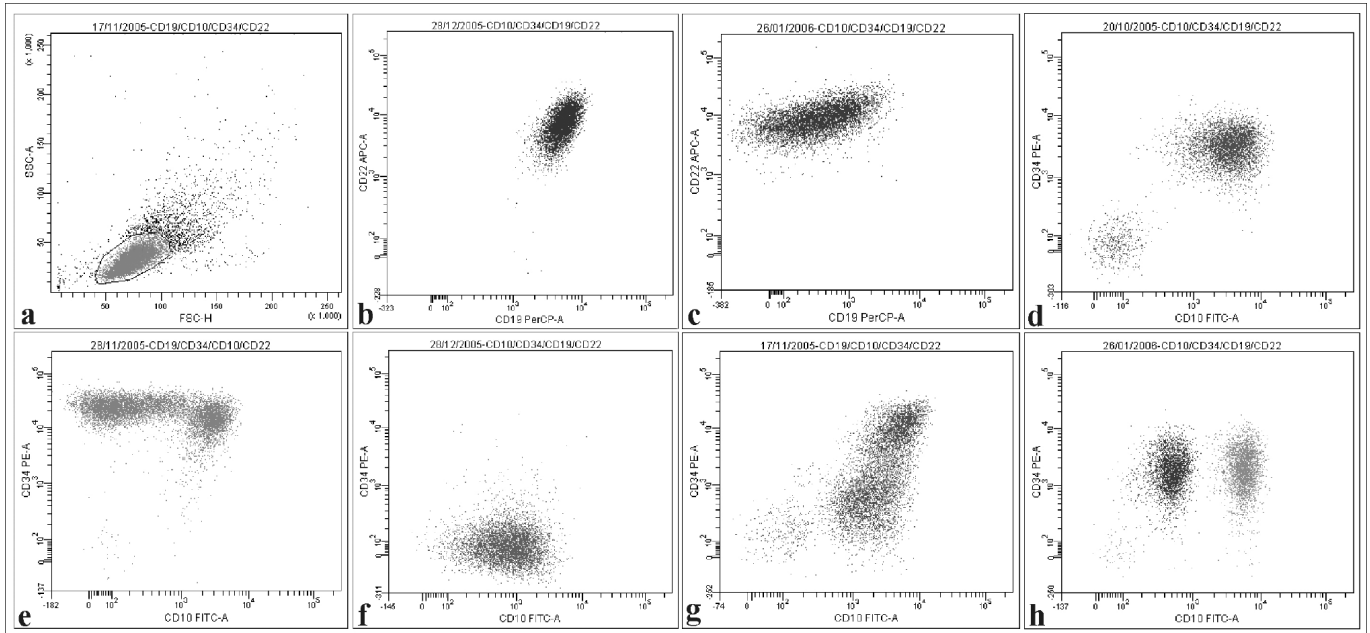


Рис. 2. а – выделение области лимфобластов/лимфоцитов в соответствии с параметрами светорассеяния; b-h – варианты экспрессии дифференцировочных антигенов CD22, CD10, CD34 CD19-положительными лимфобластами при «common» ALL; b, c – точечные графики CD19/CD22, d-h – точечные графики CD10/CD34; объяснения в тексте

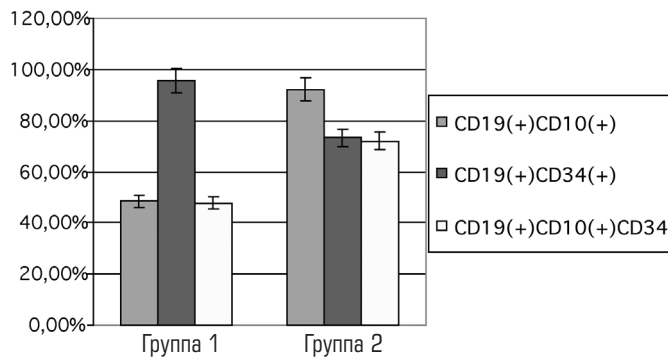


Рис. 3. Экспрессия CD34 В-лимфобластами при «common» ALL с различной экспрессией CD10 (n=21)

определялась группа CD10(+)-клеток, в которую входили как CD34(+)-, так и CD34(-)-бласты (рис. 2г).

Разный уровень экспрессии CD10 CD19-положительными клетками позволил выделить две группы пациентов. В первую вошли больные, в образцах костного мозга которых можно было выделить относительно автономные группы CD10(+)- и CD10(-)-клеток, во вторую – пациенты с «типичным» «common» ОЛЛ (практически все бласты CD10-положительны). В первой группе (n=6) достоверно (p=0,011) выше оказалась экспрессия CD34, нежели во второй (n=15) (95,67±1,45% и 73,24±6,27% соответственно), и, соответственно, ниже количество CD19(+)CD10(+)CD34(+)-бластов (p=0,022) (рис. 3).

Среди исследованных маркеров только CD22 оказался пригодным для мониторинга MRD в большинстве случаев «common» ОЛЛ, так как практически все CD19-положительные бласты показали чрезмерно

высокий уровень его экспрессии. Значительно ниже оказалось среднее количество бластов, на мембране которых определялись CD10 и CD34, входящих во все рекомендуемые различными группами исследователей панели для идентификации резидуальных лейкозных клеток. Еще меньшим оказалось среднее содержание CD19(+)CD10(+)CD34(+)-клеток. Важно отметить, что различная экспрессия CD10 и CD34 наблюдалась более чем в половине случаев. Большое количество CD34(+)-бластов, определявшееся в костном мозге пациентов, имевших низкое количество CD10-положительных клеток, говорит о том, что хотя бы один из антигенов клеток-предшественников всегда присутствует на опухолевых клетках. Это делает совершенно необходимым исследование совместной экспрессии маркеров клеток-предшественников CD19-положительными бластами на этапе первичной диагностики.

Таким образом, предлагаемые в настоящее время панели моноклональных антител для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при ВП-ОЛЛ не являются универсальными. При составлении панели в каждом конкретном случае нужно учитывать индивидуальный фенотип. Однако в такую панель кроме CD19 может входить CD22 и хотя бы один из антигенов В-линейных предшественников (CD10 или CD34), в зависимости от экспрессии этих маркеров на момент диагностики.

Выводы

1. Предлагаемые в настоящее время панели моноклональных антител для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии

при ВП-ОЛЛ не являются универсальными ввиду вариабельной экспрессии опухолевыми клетками антигенов CD10 и CD34.

2. Наиболее применимыми для идентификации резидуальных опухолевых клеток маркерами, кроме CD19, могут быть также CD22 и один из маркеров В-линейных предшественников – CD10 или CD34, в зависимости от результатов первичной диагностики.

3. При мониторинге минимальной остаточной болезни в каждом конкретном случае необходимо составлять индивидуальную панель.

4. Внедрение количественного контроля минимальной остаточной болезни у пациентов с «common» вариантом ОЛЛ позволит в будущем при необходимости модифицировать программную химиотерапию, проводить своевременный поиск доноров гемопоэтических стволовых клеток и осуществлять плановую подготовку нуждающихся пациентов к трансплантации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азовская Т.Ю. Клинико-иммунологическая характеристика острых лейкозов у детей Уральского региона [Текст]: Автореф. канд. мед. наук / Т.Ю. Азовская; ГНЦ Институт иммунологии Минздрава России. – М., 1998. – 27 с.

2. Фечина Л.Г. Ответ на терапию как прогностический фактор течения острого лимфобластного лейкоза у детей по результатам многоцентрового проспективного контролируемого исследования ALL-BFM 90 / ALL-MB 91 [Текст]: Автореф. канд. мед. наук / Л.Г. Фечина; НИИ детской гематологии Минздрава России. – М., 2003. – 39 с.

3. Шориков Е.В. Результаты программного лечения острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни. Автореферат диссертации. М, 2005.

4. Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. // Blood 1995; 86:3118–22.

5. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh S-H, Syke PJ, Seshadri R, et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. // Lancet 1994; 343:196–200.

6. Campana D. Detection of minimal residual disease in acute leukaemia by flow cytometry [Text] / D. Campana, E. Coustan-Smith // Cytometry – 1999. – Vol. 38, № 8. – P. 139–152.

7. Campana D. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia [Text] / D. Campana, E. Coustan-Smith // Best practice & clinical research haematology – 2002. – Vol. 15, № 1. – P. 1–19.

8. Campana D, Pui CH. Minimal residual disease in

acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. // Blood 1995; 85:1416–34.

9. Cave H, van der Werfften Bosch J, Suciu S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer - Childhood Leukemia Cooperative Group. // N Engl J Med. 1998; 339:591–8.

10. Hagenbeek A, Martens ACM. Minimal residual disease in acute leukemia: lessons learned from animal models. // Hamatol Bluttransfus 1990; 33:31–5.

11. Ito Y, Wasserman R, Galili N, et al. Molecular residual disease status at the end of chemotherapy fails to predict subsequent relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. // J Clin Oncol. 1993; 11:546–53.

12. Jennings C.D. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy [Text] / C.D. Jennings, K.A. Foon // Blood. – 1997. – Vol. 90, № 8. – P. 2863–2892.

13. Lewis B. et al. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. Current opinion in Hematology, 2003, 10 p. 290–296.

14. Marsh GM, Haber M, Kwan E, et al. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. // J Clin Oncol 2003, 21: 704–709.

15. Moppett J. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia [Text] / J. Moppett, G.A.A. Burke, C.G. Steward et al // J. Clin. Pathol. – 2003. – Vol. 56, – P. 249–253.

16. Pui C-H., Evans W.E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, 2006, 354 p. 166–178.

17. Tutor-Ureta O, Diaz MA, Algara P, et al. The presence of minimal residual disease during induction therapy is a reliable factor for the prognosis of recurrence in children with standard-risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. // Med Clin (Barc) 1999, 113: 129–31.

18. Uckun FM, Kersey JH, Haake R, et al. Pretransplantation burden of leukemic progenitor cells as a predictor of relapse after BMT for ОЛЛ. // N. England J. Med. 1993; 296–301.

19. Veerman AJ, Hahlen K, Kamps WA, et al. High cure rate with moderately intensive treatment regimen in non- high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. Results of protocol ОЛЛ VI from the Dutch Childhood Leukemia Study Group. // J Clin Oncol 1996, 14: 911–8.

20. Wasserman R, Galili N, Ito Y, Silber JH, Reichard BA, Shane S, et al. Residual disease at the end of induction therapy as a predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. // J Clin Oncol 1992; 10:1879–88.

A.M. Popov, T.J. Verzhbitskaja, G.A. Tsaur, E.V. Shorikov, L.G. Fechina
**MINIMAL RESIDUAL DISEASE INVESTIGATION BY FLOW CYTOMETRY
FOR THE PURPOSE OF TIMELY HAEMATOPOIETIC STEM CELLS
TRANSPLANTATION TREATMENT STRATEGY PLANNING**

Pediatric oncology and hematology centre, Regional children's hospital № 1, Ekaterinburg; Department of Pediatric hematology, oncology and transplantation of the Institute of medical cellular technologies, Ekaterinburg; Ural state medical academy

We investigated opportunities of application of B-lineage markers for minimal residual disease monitoring in BII ("common") variant of acute lymphoblastic leukaemia. Expression of CD10, CD34, included in all suggested panels, and CD22 by CD19-positive cells in bone marrow of 22 patients (18 children and 4 adults) was measured by 4-colour flow cytometry at the stage of primary diagnostics. In 22/22 cases hyperexpression of CD22 by all CD19(+)-cells was found. Average number of CD19(+)CD10(+)-blasts was $79,36 \pm 4,65\%$, CD19(+)CD34(+) – $76,15 \pm 5,91\%$, but CD19(+)CD10(+)CD34(+)-blast count was lower, only $62,32 \pm 5,73\%$. Number of CD19(+)CD10(+)- and CD19(+)CD34(+)-cells was equal only in 9 cases, CD10

was highly expressed in 7 patients, and at the same time in 6 cases the greater part of cells was CD34-positive. CD34 expression in patients with low CD10-positive cells' count was higher than in patients with "typical" BII-ALL ($95,67 \pm 1,45\%$ and $73,24 \pm 6,27\%$ respectively). Thereby, panels of monoclonal antibodies, suggested for minimal residual disease monitoring by flow cytometry in patients with BII-ALL, are not universal. Panel forming in each case requires consideration of individual immunophenotype. But in that panel, except CD19, also CD22 and one of B-lineage progenitors' markers (CD10 or CD34) at the minimum can be included, due to there expression, measured on the stage of primary diagnostics.

УДК 616-006:616-089.843

Л.Г. Фечина

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ЛЕЧЕНИИ ОСТРЫХ ЛЕЙКЕМИЙ У ДЕТЕЙ РАННЕГО
ВОЗРАСТА КАК АЛЬТЕРНАТИВА ИНТЕНСИВНОЙ ПРОГРАММНОЙ
ХИМИОТЕРАПИИ В СОЧЕТАНИИ С ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Центр детской онкологии и гематологии областной детской клинической больницы № 1, г. Екатеринбург, ГУЗ «Центр организации специализированных видов медицинской помощи Институт медицинских клеточных технологий»

Резюме

Острые лейкемии у детей раннего возраста встречаются относительно редко и составляют около 3–5% в структуре общей заболеваемости лейкозами среди детей и подростков. Невысокая частота встречаемости не уменьшает значения продолжающегося в мире поиска новых способов лечения этих пациентов в связи с низкими показателями долгосрочной выживаемости и отсутствием эффективных программ терапии. Использование дифференцировочных агентов, основанное на биологических особенностях опухолевых blastов, в сочетании со стандартной программной химиотерапией может оказаться эффективнее интенсивной химиотерапии с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

Введение

Интенсивная высокодозная химиотерапия с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых кле-

ток (алло-ТГСК) является терапией выбора при лечении неблагоприятных форм острых лейкозов. Алло-ТГСК в сочетании с различными режимами кондиционирования используется для лечения больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) с филадельфийской хромосомой (Ph+) в первой клинико-гематологической ремиссии; пациентов с рефрактерными формами и очень ранними изолированными костно-мозговыми рецидивами ОЛЛ во второй клинико-гематологической ремиссии; больных с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) в первой и последующих ремиссиях [6, 12]. Во всех перечисленных случаях алло-ТГСК позволяет дополнительно спасти около 60% больных, которых было бы невозможно вылечить стандартной химиотерапией.

Однако существуют варианты острых лейкозов с крайне неблагоприятным прогнозом, при которых ТГСК не только не улучшает показатели выживаемости, а, напротив, приводит к увеличению летальности,

ассоциированной с токсичностью трансплантационных режимов. К этой группе заболеваний относятся острые лейкозы, возникающие у детей на первом году жизни, которые связаны с *in utero* транслокациями и другими генетическими событиями, приводящими в совокупности к опухолевой трансформации. Долгосрочная бессобытийная выживаемость у этих больных не зависит от интенсивности терапевтических режимов и, по данным различных авторов, не превышает 30–40% [9, 11]. Для успешного лечения пациентов младше 1 года необходимы альтернативные, менее токсичные и более эффективные режимы терапии.

Клинико-биологические особенности лейкозий у младенцев. Острые лейкозы у пациентов младшей возрастной группы отличаются рядом уникальных клинических и биологических особенностей. К ним относятся: большая экстрамедуллярная масса опухоли; гиперлейкоцитоз; нередко инициальное поражение центральной нервной системы; преобладание раннего В-линейного фенотипа с отсутствием экспрессии CD10 на опухолевых клетках, коэкспрессией миелоидных маркеров CD13, CD33 и других; наличие характерных аномалий длинного плеча 11 хромосомы в регионе 11q23 и/или реарранжировок Mixed Lineage Leukemia (MLL) гена с одним из многочисленных партнерских генов, число которых в настоящее время приближается к 50. Все вышеперечисленные признаки относятся к прогностически неблагоприятным факторам риска. Эти заболевания встречаются чаще у девочек, что отличается от распределения по полу среди более старших детей [8, 17].

Течение острых лейкозий у младенцев с CD10(-) лимфобластным фенотипом крайне неблагоприятно, высока частота развития очень ранних и ранних, преимущественно изолированных костно-мозговых рецидивов, приводящих к летальному исходу. Острые лейкозии с нелимфобластным (миелоидным) фенотипом, напротив, имеют менее агрессивное течение, что также является принципиальным отличием по сравнению с пациентами более старшего возраста.

В мультивариантном анализе по оценке влияния различных факторов риска на прогноз, проведенном кооперативной группой BFM, только MLL-реарранжировки и/или цитогенетические перестройки 11q23 показали независимое прогностическое значение, остальные факторы риска нивелировались их мощностью [7].

Международные стандарты лечения. Многочисленные попытки интенсификации химиотерапевтических программ не привели к улучшению долгосрочной бессобытийной и общей выживаемости. Интенсивная программная химиотерапия не позволяет удовлетворительно контролировать минимальную остаточную болезнь (MRD), что свидетельствует о недостаточном противоопухолевом эффекте и приводит к селекции устойчивых к терапии клонов лейкоэмических клеток. Более того, при анализе результатов лечения 11 крупнейших исследовательских групп была доказана низкая эф-

фективность трансплантации гемопоэтических клеток (ТГСК), особенно у пациентов, имеющих транслокацию t(4;11)(q21;q23) и/или ее молекулярный эквивалент MLL/AF-4 из-за крайне высокой токсичности режимов ТГСК и большого количества рецидивов в послетрансплантационном периоде [15].

Создание международного протокола INTERFANT 99 базировалось на *in vitro* исследованиях, показавших высокую чувствительность лейкоэмических бластов к цитарабину. В качестве единственного критерия распределения пациентов по группам риска в этом протоколе использовалась оценка раннего ответа на стероидную профазу. Учитывая доклинические результаты, полученные на клеточных линиях, а также частую коэкспрессию миелоидных маркеров на опухолевых бластах, авторы предложили гипотезу гибридной природы ОЛЛ у младенцев, чем и обосновали использование элементов терапевтической программы для лечения ОМЛ, включающих длительное применение цитарабина (ARA-C) [20]. Предполагаемая чувствительность к высокодозному ARA-C при ОЛЛ с t(4;11) связана с повышением уровня фермента HENT-1, участвующего в транспортировке цитарабина через клеточную мембрану. Является ли HENT-1 непосредственной транскрипционной мишенью MLL до настоящего времени, неизвестно [16].

Тем не менее в одной из последних публикаций были приведены данные об отсутствии специфической чувствительности MLL-бластов к ARA-C, что, по-видимому, свидетельствует о недостаточной эффективности цитарабин-содержащих режимов химиотерапии у детей с MLL лейкозами [22]. Исследования, проведенные по изучению экспрессии ключевых цитарабин-метаболизирующих ферментов DCK и HENT-1 m-RNA, напротив, показали пониженную экспрессию у младенцев с MLL лейкозами, что также ставит под сомнение факт повышенной чувствительности опухолевых MLL-позитивных бластов к цитарабину [13].

Новая версия протокола INTERFANT 2005 не содержит принципиальных различий с предыдущим дизайном терапии, за исключением увеличения суммарной дозы L-аспарагиназы и снижения кумулятивной дозы дексаметазона и винкристина в одной из ветвей рандомизации за счет сокращения количества реиндукционных пульсов в поддерживающей терапии [14].

Альтернативные способы лечения у детей раннего возраста. Последние результаты сравнительных молекулярно-биологических исследований уровней экспрессии множества генов (*genes profile microarray*) доказали уникальную природу MLL-позитивных лейкозий, составляющих около 80% всех острых лейкозов у младенцев. Это позволило выделить их в уникальную группу заболеваний, не относящихся ни к ОЛЛ, ни к ОМЛ и, соответственно, требующих специальных терапевтических подходов для достижения приемлемых результатов лечения [5, 11].

MLL-протеин относится к ядерным белкам, обеспе-

чивающим нормальную экспрессию генов из семейства HOX, кодирующих транскрипционные факторы и опосредованно регулирующих дифференцировку эмбриональных и гемопоэтических клеток. Результатом транслокации MLL-гена является химерный протеин, образующийся путем слияния N-терминальной части MLL с C-терминальной частью одного из партнерских генов. MLL-химерный протеин изменяет нормальную экспрессию HOXA7 и HOXA9 генов, что приводит к ускоренному самообновлению и избирательной пролиферации ранних гемопоэтических предшественников с последующим развитием лейкемии [16].

Расшифрованный профиль экспрессии множества генов позволил установить, что по сравнению с ОЛЛ и ОМЛ при MLL-лейкемии наиболее выражена экспрессия рецептора Flt-3 [11, 16]. В ряде работ было показано, что повышенная экспрессия Flt-3 в MLL-блестах приводит к активации лиганд-независимого фосфорилирования, стимулируя их приоритетную пролиферацию по сравнению с нормальными клетками костного мозга. Удалось установить, что некоторые малые молекулы, такие как PKC-412, CEP-701, SU-5416, способны подавлять активацию Flt-3. Эти ингибиторы киназ исследовались в I-II фазах клинических исследований по лечению ОМЛ у взрослых пациентов, где показали свою клиническую эффективность [18, 21].

Американскими группами Dana Farber Consortium и St. Jude Children's Research Hospital, а также комитетом по изучению резистентных болезней International-BFM SG в качестве экспериментальной терапии на основании доказанной гиперэкспрессии Flt-3 предлагалось использование ингибиторов Flt-3 для лечения ОЛЛ с MLL-транслокациями. В качестве терапевтического агента был предложен ингибитор протеинкиназы C (PKC-412) [14, 18]. Начало I-II фаз клинического исследования у пациентов с рецидивами/рефрактерными формами MLL-позитивных ОЛЛ было запланировано группой I-BFM SG на вторую половину 2005 года [14]. К сожалению, было показано, что данный препарат обладает нестойкой фармакокинетикой, что подтверждается его быстрой элиминацией при многократном использовании. Кроме того, было доказано, что активные Flt-3 мутации наблюдаются только у 16% больных с MLL транслокациями, что, по-видимому, не позволит эффективно использовать PKC-412 у большинства пациентов.

В качестве другого возможного кандидата, на который могла бы воздействовать целенаправленная (таргетная) терапия при MLL-лейкемиях, рассматривается ген MCL-1, играющий ключевую роль в регуляции апоптоза и относящийся к группе Bcl-2 протеинов. Результатом его повышенной экспрессии при MLL-лейкемиях является увеличение жизнеспособности опухолевых клеток. Известно, что новые ингибиторы MCL-1 и Bcl-2, относящиеся к классу малых молекул, такие как CYC 202 и SDX 101, индуцируют апоптоз клеток множественной миеломы. Эти препараты, возможно, окажутся эффективными в преодолении лекарственной резистентности и при

MLL-лейкемиях за счет их потенциальной способности снижать экспрессию MCL-1 [21].

Снижение экспрессии FHL1 гена, ответственного за супрессию опухолевого роста, была обнаружена у пациентов с MLL-реарранжировками в 100% случаев, что достоверно отличалось от уровня экспрессии этого гена у пациентов, страдающих острыми лимфобластными лейкозами без MLL-перестроек ($p=0,004$). Нормальную экспрессию FHL1, вероятно, можно восстановить с помощью химиотерапевтических деметилирующих агентов, таких как децитабин, однако в качестве более специфического воздействия можно было бы использовать трансфекцию в MLL-блесты векторов, кодирующих диккий тип FHL1 гена, с целью повышения его супрессорной активности [23].

Обоснование создания протокола терапии с включением ATRA. Мы учли накопленный положительный опыт использования целенаправленной терапии при лечении других гемопоэтических опухолей с использованием моноклональных антител – анти-CD20 при В-линейных неходжкинских лимфомах; ингибиторов тирозинкиназы – STI 571 при хроническом миелоидном лейкозе; дифференцировочных агентов – полной транс-ретиноевой кислоты (ATRA) при PML/RAR α -позитивных острых промиелоцитарных лейкозах (ОПЛ). Также, приняв во внимание использование дифференцировочных агентов при других злокачественных новообразованиях: 13-цис ретиноевой кислоты при нейробластоме, вальпроевой кислоты при злокачественных глиомах, вальпроевой кислоты в сочетании с ATRA при миелодиспластических синдромах (МДС) и ОМЛ у взрослых, мы посчитали возможным создать оригинальный терапевтический протокол лечения острого лимфобластного лейкоза для детей раннего возраста с включением ATRA.

Противоопухолевое действие ATRA при ОПЛ обусловлено взаимодействием с рецепторами ретиноевой кислоты (RARs), относящимся к ядерным гормональным рецепторам. В экспериментах на клеточных линиях удалось установить другие биологические свойства ATRA, не присущие ее синтетическим аналогам, а именно, выраженный антипролиферативный эффект и индукцию апоптоза. Данные механизмы при ОПЛ реализуются через сигнальные пути фосфоинозитидил-3-киназы и рибосомальный протеин S6-киназного полипептида (PI3-kinase/Akt signal transduction pathway) [10].

Наша гипотеза применения ATRA основывается на возможности использования ее дифференцировочного влияния на лейкоэмический клон, происходящий из очень ранних предшественников стволовой клетки, неполностью коммитированных к лимфоидной линии и способных при определенных условиях к трансдифференцировке в клетки других линий. Мы предположили, что при снятии блока дифференцировки опухолевых бластов возможно их созревание, в том числе в клетки миелоидной линии.

Полная трансретиноевая кислота относится к

природным дериватам провитамина А. Всасываясь в желудочно-кишечном тракте, АТРА проникает в портальную систему, метаболизируется при участии цитохрома Р-450 путем окисления и дальнейшей глюкуронизации в печени. Известно, что лучшее усвоение АТРА и достижение высоких концентраций в плазме крови происходит при одновременном приеме пищи, содержащей большое количество жиров, что возможно обеспечить, назначая АТРА во время кормления материнским молоком или адаптированной смесью. Длительность назначения препарата по времени не должна превышать 1–2 недель из-за феномена «приобретенной резистентности к АТРА». При ежедневном приеме препарата концентрация в плазме через 1–2 недели снижается более чем в пять раз, что связано с временным уменьшением его абсорбции и повышением активности цитохрома Р-450 с липидными пероксидазами. После отмены АТРА механизмы нормального метаболизма препарата быстро восстанавливаются. Таким образом, назначение препарата более длительными курсами нецелесообразно.

Поскольку из опыта применения при ОПЛ известно, что использование АТРА в качестве монотерапии не позволяет добиться поддержания длительной ремиссии, необходимо было выбрать оптимальный протокол химиотерапии, в дизайн которого было бы возможно включить полную транс-ретиноевую кислоту.

Мы решили отказаться от проведения интенсивной программной химиотерапии и в качестве базового лечения был выбран отечественный протокол Москва–Берлин для детей с ОЛЛ [1, 2]. Данное решение было основано на ранее проведенном сравнительном анализе результатов лечения детей по программам ALL-BFM 90 и ОЛЛ-МБ 91, который не показал каких-либо преимуществ режимов более интенсивной химиотерапии ALL-BFM 90: установлены одинаковые показатели долгосрочной бессобытийной и общей выживаемости, сопоставимый кумулятивный риск развития рецидивов [3, 4].

Краткое содержание протокола

Программа лечения рассчитана на детей в возрасте от 0 до 11 мес. 29 дней, имеющих ранний В-линейный фенотип (CD10-); в том числе с коэкспрессией миелоидных маркеров; с наличием любых транслокаций с участием 11q23 региона и/или MLL-реаранжировок. Выделяются две группы риска: группа высокого риска – все пациенты с t(4;11) и/или MLL/AF-4 и дети, не вышедшие в ремиссию после окончания курса индукционного лечения (36–38 дни), и группа риска, к которой относятся все остальные пациенты. Из-за небольшого количества больных протокол не предполагает рандомизации. В качестве базового стероидного препарата используется дексаметазон в дозе 6 мг/м² с коррекцией дозы в соответствии с общепринятыми международными правилами в зависимости от возраста. АТРА назна-

чается в дозе 25 мг/м²; первый курс проводится сразу же после окончания индукционного этапа и в дальнейшем проводится двухнедельными курсами параллельно с циклами реиндукции дексаметазон + винкристин или между блоками высокого риска. Для группы риска основными химиотерапевтическими элементами программного лечения являются L-аспарагиназа в дозе 10 000 Ед/м² и метотрексат в дозе 30 мг/м², с коррекцией дозы в соответствии с возрастом. Группа высокого риска получает шесть блоков химиотерапии. В группе риска высокодозный метотрексат для профилактики нейтролейкемии не применяется. Краниальное облучение проводится только пациентам группы высокого риска, после достижения ими возраста свыше одного года. В каждом отдельном случае решение о проведении лучевой терапии требует дополнительного обсуждения. Химиопрофилактика нейтролейкемии осуществляется интратекальным введением триплетов: метотрексат, цитарабин, преднизолон в соответствии с общепринятыми дозами, то есть в соответствии с возрастом пациента. Обязательной частью протокола является контроль минимальной остаточной болезни в костном мозге и периферической крови с использованием качественной и количественной ПЦР-диагностики маркерных транслокаций; подробные цитологические, цитохимические исследования и иммунофенотипирование.

Предварительные результаты

В Центре детской онкологии и гематологии Екатеринбург с марта 2003 года проводится I фаза моноцентрового нерандомизированного клинического исследования эффективности и безопасности данной программы лечения. С момента начала исследования по настоящее время в нашу клинику поступило четыре пациента до года с диагнозом MLL-позитивный ОЛЛ. Трое детей имели транслокацию t(4;11), а один ребенок транслокацию t(6;11). Из четырех пациентов, получавших лечение, у всех удалось достичь молекулярной ремиссии, продолжительность которой на сегодняшний день составляет: 28 мес., 10 мес., 7 мес. и 2 мес. соответственно. Одна пациентка уже полностью закончила курс программной химиотерапии. Во всех случаях не наблюдалось каких-либо побочных эффектов, обусловленных действием АТРА, ни у одного из пациентов не был зарегистрирован АТРА-синдром.

Заключение

Предложенная стратегия лечения была одобрена кооперативной российско-белорусской группой по лечению острого лимфобластного лейкоза. Дальнейшее проведение исследования планируется в многоцентровом варианте. В рамках многоцентрового исследования мы ожидаем увеличения числа рекрутируемых пациентов, что сделает возможным провести объективную оценку эффективности терапии с включением АТРА и установить может ли наш протокол представить реальную альтернативу интенсивной химиотерапии с ТГСК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карачунский А.И., Хенце Г. Протокол многоцентрового рандомизированного контролируемого исследования Москва–Берлин 91. НИИ ДГ МЗ РФ, М, 1991.
2. Карачунский А.И., Хенце Г. Протокол многоцентрового рандомизированного контролируемого исследования Москва–Берлин 2002. НИИ ДГ МЗ РФ, М, 2002.
3. Лапотентова Е.С. и др. Результаты лечения острого лимфобластного лейкоза у детей до 1 года по протоколу ALL-BFM 90m в России и Республике Беларусь. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. М., 2005, т. 4, № 2, с. 20–25.
4. Шориков Е.В. Результаты программного лечения острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни. Автореферат диссертации. М, 2005
5. Armstrong S.A. et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genetics*, 2002, Vol. 30, p. 41–47.
6. Davies S.M.; Ramsay R.S.; Kersey J.H. Allogeneic transplantation for acute lymphoblastic leukemia in children; Hematopoietic cell transplantation, Second edition, 1998, Blackwell Science Inc., USA, Chapter 73, p. 859–871.
7. Dordelman M., Schrappe M. Early response in infant ALL determines prognosis. *Blood*, 2000, Vol. 95, № 8, p. 2730–2731.
8. Felix C.A. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia challenges and controversies in 2000. *Hematology*, 2000, American Society of Hematology, p. 285–302.
9. Ferster A. et al. Treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2000, Vol. 95, № 8, p. 2729–2730.
10. Ishida S. et al. Differential modulation of PI3-kinase/Akt pathway during all-trans retinoic acid and Am80-induced HL-60 cell differentiation revealed by DNA microarray analysis. *Biochemical Pharmacology*, 2004, № 68, p. 2177–2186.
11. Lewis B. et al. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. *Current opinion in Hematology*, 2003, 10 p. 290–296.
12. Margolis D.A., Casper J.T. Allogeneic transplantation for acute myeloid leukemia in children; Hematopoietic cell transplantation, Second edition, 1998, Blackwell Science Inc., USA, Chapter 71, p. 835–848.
13. Mata J. et al. ARA-C metabolizing enzymes are under expressed in childhood mixed lineage leukemia gene rearrangement leukemia. *Pediatric Blood and Cancer*, 2005, Vol. 45, Issue 4, p. 424–425.
14. Pieters R. 16th Annual meeting of the international BFM study group. Protocol and committee progress reports. Refractory diseases committee. 2005, Vienna, p. 193.
15. Pui C-H et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet*, 2002; 359, p. 1909–1915.
16. Pui C-H. et al. Acute lymphoblastic leukemia. Mechanisms of disease. *N Engl. J. Med.*, 2004; 350; 15, p. 1535–1548.
17. Pui C-H. et al. Clinical heterogeneity in childhood acute

lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. *Leukemia*, 2003, Vol. 17, p. 700–706.

18. Pui C-H., Evans W.E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2006, 354 p. 166–178.

19. Ritter M. et al. Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2006, Vol. 20, № 3, p. 437–443.

20. Schrappe M.; Gadner H. Internationales INTERFANT 99 – studienprotokoll; version 4. 1999.

21. Stam R. et al. Identification of drugable targets in infants with MLL-Rearranged leukemia. *Pediatric Blood and Cancer*, 2005, Vol. 45, Issue 4, p. 370–371.

22. Stam R. et al. MLL gene rearrangements have no direct impact on ARA-C sensitivity in infant acute lymphoblastic leukemia and childhood M4/M5 acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2006, Vol. 20, № 3, p. 179–182.

23. Stam R. et al. MLL rearranged infant acute lymphoblastic leukemia is characterized by silencing of the tumor suppressor gene FHIT. *Pediatric Blood and Cancer*, 2005, Vol. 45, Issue 4, p. 414.

L.G. Fechina

NEW TREATMENT MODALITIES IN INFANT ACUTE LEUKEMIA ARE AN ALTERNATIVE OPTION TO THE INTENSIVE CHEMOTHERAPY WITH THE CONSECUTIVE HEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION

Pediatric Oncology and Hematology Centre, Regional Children's Hospital № 1, Ekaterinburg, Department of Pediatric hematology, oncology and transplantation of the Institute of medical cellular technologies, Ekaterinburg

Acute leukemia in infants is the rare entity with unique clinical and biological features and extremely dismal prognosis. Low frequency of infant leukemia does not decrease the importance of searching of the new treatment approaches, because of the failure in all known chemotherapeutic regimens and hematopoietic stem cells transplantation. Distinct biological peculiarities, such as MLL gene rearrangements and/or 11q23 abnormalities play a cornerstone role in the development of the leukemia clones in infants. MLL positive leukemia takes a large proportion in total number of all leukemias in patients less than 1 year old. We introduce the all-trans retinoid acid (ATRA) in standard chemotherapy in order to achieve the better treatment results in this group of patients. In the phase I/II single institution clinical trial four of four available patients with MLL positive acute lymphoblastic leukemia: 3 with t(4;11) and 1 with t(6;11) have achieved molecular remission with ATRA based treatment regimen. We believe that in our future multicentre cooperative trial we will recruit more patients less than 1 year old.

Г.А. Цаур^{1,2}, Е.Р. Семенихина^{1,2}, Е.В. Шориков^{1,2}, Л.Г. Фечина^{1,2}

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ КАК ВАЖНЕЙШИЙ ЭТАП ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАНИЙ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ

¹ Центр детской онкологии и гематологии областной детской клинической больницы № 1, Екатеринбург,

² ГУЗ «Центр организации специализированных видов медицинской помощи Институт медицинских клеточных технологий»

Резюме

В настоящем обзоре дано описание ряда современных методов молекулярной биологии, таких как ПЦР в реальном времени, секвенирование, сравнительная геномная гибридизация, биологические чипы. На примере нейробластомы, саркомы Юинга, хронического миелолейкоза, острых лейкозов показано значение данной группы методов в стратификации пациентов по группам риска, с целью отбора тех, кто нуждается в проведении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

Введение

Используемые в настоящее время молекулярно-биологические методы диагностики помогают в расшифровке природы онкогематологических заболеваний, а также выявляют молекулярные механизмы онкологических заболеваний. Кроме этого, данные методы помогают отобрать из общей когорты пациентов высокой группы риска, для которых наиболее адекватным способом лечения будет клеточная терапия, а именно, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), к которой относятся трансплантация костного мозга (ТКМ), а также трансплантация мобилизованных стволовых клеток периферической крови. На сегодняшний день использование гемопоэтических стволовых клеток является единственным разрешенным к клиническому применению методом клеточной терапии на территории Российской Федерации.

Молекулярно-биологические методы. Современная стратегия лечения онкогематологических больных базируется на знании биологических особенностей этих заболеваний. Выбор оптимальной программы лечения учитывает, наряду с клиническими, данные иммунофенотипирования опухолевых клеток, а также цитогенетического и молекулярно-генетического исследований. Различные морфологические варианты характеризуются специфическими хромосомными аномалиями, что важно для дифференциальной диагностики и прогноза злокачественных новообразований.

Впервые прямая связь между конкретной хромо-

сомной перестройкой и определенным типом опухоли была установлена в 1960 году, когда Р. Nowell и D. Hungerford впервые описали наличие филадельфийской хромосомы как типичной хромосомной аномалии при хроническом миелолейкозе [15].

На сегодняшний день существует большое количество молекулярно-генетических методов. Их можно подразделить на несколько групп:

1. Скрининг генома
 - Дифференциальное окрашивание хромосом
 - Спектральное кариотипирование (SKY)
 - Сравнительная геномная гибридизация (CGH)
 - Биологические чипы
2. Определение точечных специфических нарушений
 - Полимеразная цепная реакция (ПЦР)
 - ПЦР с предшествующей обратной транскрипцией
 - ПЦР в реальном времени
 - Исследование нуклеотидных замен (SNP)
 - Блот-гибридизация по Саузерну
 - Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)
 - Секвенирование
3. Исследование экспрессии генов
 - Биологические чипы
4. Исследование минимальной остаточной болезни
 - Гнездная ПЦР
 - Количественная ПЦР в реальном времени

Спектральное кариотипирование основано на использовании многоцветной гибридизации in situ. При этом используются 24 хромосомных зонда, которые с помощью спектроскопии Фурье и специального программного обеспечения преобразуются в 24 различных цвета. Методика используется для поиска криптических хромосомных транслокаций. Также она очень удобна для выявления множественных хромосомных изменений.

При сравнительной геномной гибридизации сравниваются хромосомы пациента с референтными хромосомами и, таким образом, определяется утрата или удвоение определенного участка хромосомы, обычно не различимые при помощи обычных дифференциальной окраски метафазных хромосом. Другим вариантом является сравнение хромосом из опухолевой ткани с хромосомами непораженной ткани.

Биологические чипы. За счет наличия большого количества зондов биочипы позволяют проводить одновременный поиск большого числа генетических аномалий. Их, как, впрочем, и зонды для FISH и ПЦР в реальном времени, можно сделать на заказ для поиска каких-то конкретных нарушений. Например, существуют чипы для поиска маркеров онкологических заболеваний, в том числе лейкозов, наследственной патологии и др.

В зависимости от вида зондов различают белковые чипы и ДНК-чипы, разновидностью последних являются чипы, позволяющие исследовать РНК (их еще называют экспрессионные чипы). Также биочипы подразделяют исходя из технологии их производства на 1) плоскостные – зонды располагаются на плоской подложке или платформе; и 2) объемные (трехмерные) – олигонуклеотидные зонды локализованы в толще гидрофильного геля.

Плоскостной вариант биочипов реализован американской компанией Affymetrix, которая является одним из пионеров применения чиповых технологий. Для автоматизированного производства биочипов специалисты Affymetrix соединили принципы фотолитографии и комбинаторной химии. Они использовали технологии, применяемые для создания компьютерных процессоров. Исходный продукт – кварцевая пластина – покрывается специальным кремний-содержащим материалом – силаном, который прочно соединяется с кварцем и формирует строго периодичную молекулярную матрицу (с равномерной поверхностной плотностью), готовую принять нуклеотиды. Затем на слой силана накладывается специальный фотошаблон – маска, после чего нужные участки поверхности облучаются ультрафиолетом сквозь прозрачные отверстия в шаблоне. Под действием ультрафиолета облученные участки меняют свои свойства так, что становится возможным их селективно удалить с помощью определенных химических реактивов и на это место встраивается один из нуклеотидов. После этого шаблон меняют. Для создания 1 полного слоя необходимо 4 фотошаблона для каждого нуклеотида (А, Т, Г, Ц). Обычно все зонды, расположенные на таком чипе, имеют одинаковую длину. При средней длине зонда в 25 нуклеотидов, для создания 1 чипа необходимо $25 \times 4 = 100$ фотошаблонов. Плотность такого чипа также очень велика. Его размер составляет $1,28 \text{ см}^2$. А количество зондов, которое может уместиться на нем, – около 500 000. Изготовленный таким образом биочип гибридизуют с молекулами ДНК или РНК, предварительно мечеными флюоресцентными красителями.

Чаще всего подобные чипы используют для скрининга всего генома целиком. В среднем на каждый ген человека приходится от 15 до 20 различных зондов, что исключает неспецифические взаимодействия. На сегодняшний день проводится большое количество исследовательских работ, в ходе которых ученые из 30 000 генов, входящих в геном человека, пытаются

выбрать комбинации из 20–100 генов, исследование которых четко свидетельствовало бы не только о наличии у пациента какого-либо конкретного заболевания, но и указывало бы на его прогноз.

Второй вариант – объемные чипы. Их разработали в нашей стране в Институте молекулярной биологии РАН под руководством академика А.Д. Мирзабекова, который предложил их применять в качестве дешевого и высокоэффективного метода секвенирования генома человека еще в 1988 году. Как устроен такой биочип? На подложке из стекла или пластика расположено множество мельчайших капелек геля – ячеек. Благодаря гидрофобности поверхности стекла между ячейками, содержимое отдельных ячеек оказывается полностью изолированным от других. Объем каждой ячейки – 0,1 нанолитра. В каждой капельке-ячейке находится специфический зонд, то есть каждая ячейка представляет собой миниатюрную пробирку. Пин-робот наносит на стекло микрокапли, и одновременно происходит полимеризация ячеек и иммобилизация в них специфического зонда, что инициируется ультрафиолетовым облучением. Данный вид биочипов является заменой электрофоретической детекции, которая является завершающим этапом ПЦР. В тех местах, где произошло взаимодействие исследуемого фрагмента ДНК с зондом, ячейка светится, так как образец предварительно помечен люминесцентной меткой. В настоящее время готовятся к регистрации чипы для выявления актуальных генетических перестроек у больных с лейкозами.

ПЦР в реальном времени – это метод, совмещающий в себе амплификацию определенного фрагмента ДНК с одновременной флюорометрической детекцией процесса связывания зонда и исследуемого фрагмента ДНК, происходящий в одной пробирке. ПЦР в реальном времени позволяет проводить количественные исследования, и в первую очередь этот метод необходим для оценки минимальной остаточной болезни. Преимуществами данного метода являются: прямое определение наличия ДНК / РНК, высокая чувствительность и специфичность, универсальность, быстрота получения результатов, автоматизация. ПЦР в реальном времени находит свое применение для количественного мониторинга химерных генов в ходе терапии острых лейкозов, хронического миелолейкоза, саркомы Юинга, при нейроblastоме многих других онкологических заболеваниях.

Секвенирование – метод определения нуклеотидной последовательности определенных фрагментов ДНК. В онкогематологии секвенирование является референс-методом, который позволяет верифицировать полученные в ходе ПЦР ампликоны, выявить точечные мутации, однонуклеотидные замены (SNP). С его помощью возможно диагностировать наследственные синдромы, оценивать генетическую нестабильность путем исследования потери гетерозиготности. Секвенирование позволяет проводить максимально точное

HLA-типирование, оценивать посттрансплантационный микрохимеризм.

В настоящее время наиболее часто используется автоматическое секвенирование. Лидерами в этой области являются компании Applied Biosystems, Beckman Coulter и Amersham-Pharmacia-Biotech. В основе автоматического секвенирования лежит метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих дидезоксинуклеозидтрифосфатов, которые способны включаться в растущую цепь ДНК, но не способны обеспечивать дальнейшее ее копирование из-за отсутствия ОН-группы в 3'-положении [21]. Автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций и разделение продуктов этих реакций с помощью капиллярного электрофореза. Как правило, автоматизирована лишь вторая стадия, т.е. разделение меченых фрагментов ДНК, получение спектра эмиссии флюорофоров и последующий обсчет собранных данных. К настоящему времени синтезировано большое число разнообразных флюоресцентных красителей и постоянно продолжается работа над новыми, с улучшенными характеристиками. Наиболее широко применяемыми флюоресцентными красителями являются так называемые «трехкомпонентные» красители класса BigDye™ (Applied Biosystems) и DYEnamic™ ET (Amersham-Pharmacia-Biotech). Их использование характеризуется высокой интенсивностью флюоресценции, а значит, и чувствительностью.

Нозологические формы. Нейробластома. Нейробластома является самой часто встречающейся опухолью среди детей до 5 лет и составляет около 7–8% всех злокачественных опухолей у детей или 3–8 новых случаев на 100 000 детей в возрасте до 15 лет каждый год [3]. Нейробластома – это нейроэктодермальная опухоль, происходящая из клеток, формирующих в норме симпатическую нервную систему. Биологически нейробластома крайне неоднородна. Из всех известных опухолей человека она наиболее часто достоверно подвергается спонтанной регрессии [14]. И в то же время среди нейробластом встречаются очень агрессивные опухоли, которые не отвечают на мультимодальную терапию, что объясняет непропорционально большой вклад нейробластом в детскую смертность от раковых заболеваний (15%) [3]. Отличительной чертой нейробластом является комплексность генетических аномалий, приобретаемых опухолевыми клетками [20, 23]. Некоторые из этих генетических изменений являются прогностическими факторами и могут быть использованы для выбора тактики лечения, например, такой показатель, как уровень амплификации гена MYCN, который выявляется путем ПЦР и FISH. Увеличение этого показателя более чем в 5 раз от нормального уровня служит показанием для перевода пациента на ветвь высокого риска, а при отсутствии адекватного эффекта – для трансплантации.

Еще одним молекулярным маркером нейробластомы, выявляемым при помощи ПЦР в реальном времени и применяемым для мониторинга терапии нейробластомы, является экспрессия гена тирозингидроксилазы (TH). В тех случаях, когда в образцах костного мозга пациентов его экспрессия не выявляется, это является самым чувствительным методом, свидетельствующим об отсутствии поражения костного мозга и, как следствие, возможности проведения аутологичной ТГСК.

Генетическая нестабильность является довольно частым состоянием, сопровождающим большое количество онкологических заболеваний, которое заметно ухудшает прогноз. Маркерами неблагоприятного прогноза нейробластомы, которые можно выявить с помощью ПЦР, FISH, секвенирования и CGH, являются потеря гетерозиготности на коротком плече 1 хромосомы в регионе 1p34-36, увеличение ploидности на длинном плече 17 хромосомы, делеция длинного плеча 11 хромосомы. Их значение становится особенно актуальным при отсутствии амплификации гена MYCN. [20]. Вполне возможно, что таким пациентам требуются более интенсивные протоколы лечения, а при их неэффективности – проведение ТГСК.

Саркома Юинга (СЮ) / Периферическая нейроэктодермальная опухоль (PNET). Саркома Юинга представляет собой высоко злокачественную примитивную опухоль, состоящую из гомогенных мелких округлых клеток нейроэктодермального происхождения, которая преимущественно поражает костную ткань. PNET имеет схожие морфологические черты, но чаще локализуется в области грудной клетки и мягких тканей. И СЮ, и PNET имеют общий гистогенез и общую молекулярную основу в виде вовлечения гена EWS, расположенного на длинном плече 22 хромосомы в регионе 22q12. В 90–95% случаев при СЮ/PNET методом ПЦР обнаруживается химерный ген EWS-FLI1. Путем секвенирования данного химерного гена показана его молекулярно-генетическая гетерогенность, которая достоверно связана с различиями в прогнозе данного заболевания. Из более чем восьми описанных на сегодня молекулярно-генетических вариантов EWS-FLI1, с наиболее благоприятным прогнозом ассоциирован так называемый тип 1, который встречается примерно в 60% случаев СЮ/PNET. Данный тип химерного гена образуется при слиянии 7 экзона гена EWS с 6 экзоном гена FLI1 [6]. Предполагают, что благоприятный прогноз может быть связан с образованием функционально менее активного белка [2]. В остальных случаях прогноз менее благоприятен, и по показаниям следует проводить ТГСК.

Хронический миелолейкоз. Для диагностики ХМЛ молекулярно-генетические методы, такие как ПЦР в реальном времени, FISH и стандартная цитогенетика, имеют первостепенное значение. Без проведения

этих исследований диагноз ХМЛ не считается установленным. ПЦР в реальном времени при установлении диагноза ХМЛ позволяет верифицировать диагноз, а также выявляет исходный уровень экспрессии химерного гена BCR-ABL. В дальнейшем при терапии иматинибом проводится мониторинг уровня BCR-ABL методом ПЦР в реальном времени 1 раз в 3 месяца. При оптимальной эффективности терапии через 6 месяцев от начала лечения уровень экспрессии должен снизиться более чем в 10 раз от исходного, через 12 месяцев – более чем в 1000 раз, через 24 месяца – более чем в 15 000 раз [8]. Показано, что к 12 месяцу терапии иматинибом 40% пациентов с ХМЛ достигают уровня экспрессии, который более чем в 15 000 раз ниже исходного [10], а к 3 годам их число увеличивается до 70% [5]. В то же время у части пациентов показана неэффективность терапии иматинибом из-за развития серьезных побочных эффектов, появления резистентности к препарату и/или обнаружении мутаций в киназном домене ABL киназы, обнаруживаемых при секвенировании [13]. Именно эта группа является потенциальными кандидатами для проведения ТГСК.

Острые лейкозы. Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – это наиболее частая злокачественная опухоль у детей, на долю которой приходится до 30% в структуре всех онкологических заболеваний. Выживаемость пациентов с этим прежде фатальным заболеванием в настоящее время достигает 70–80% [1, 11, 17, 19]. Четко доказано существование ряда молекулярно-генетических «факторов риска» ОЛЛ, обнаруживаемых методами ПЦР, ПЦР в реальном времени и FISH, которые ухудшают прогноз ОЛЛ. К их числу относятся транслокации t(9;22) и t(4;11) [19, 22]. Но не всегда понятно, почему при одинаковых инициальных факторах риска у части пациентов развиваются рецидивы ОЛЛ, а у других – нет.

Вполне возможно, что ответ на данный вопрос сможет дать использование биологических чипов высокой плотности. Ведь комбинации различных генов с высокой и низкой экспрессией строго специфичны и позволяют не только дифференцировать различные виды лейкозов, но и определять прогноз данной группы заболеваний. На сегодня получено большое количество обнадеживающих результатов о связи профиля экспрессии генов с иммунофенотипом бластных клеток [18], наличием химерных генов TEL-AML1, BCR-ABL, E2A-PBX, перестройками гена MLL при ОЛЛ у детей [9, 16], гиперплоидией [4]. Описаны характерные профили экспрессии для острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) и ОЛЛ, а также для Т- и В-линейных ОЛЛ [4, 7]. Вполне возможно, что через некоторое время исследование генетического профиля конкретного пациента, позволит избежать массы исследований, используемых сегодня для установления диагноза, таких как цитохимическое исследование клеток костного мозга,

ПЦР-диагностика химерных генов, цитогенетика, проточная цитометрия с определением иммунофенотипа опухолевых клеток.

Еще одним крайне перспективным направлением использования биологических чипов является оценка прогноза заболевания. Получены данные о связи прогноза с определенными комбинациями экспрессии генов, что позволяет стратифицировать пациентов по группам риска как для ОЛЛ [18], так и для ОМЛ [12]. А это, в свою очередь, позволит уже с самого начала отобрать пациентов высокой группы риска, нуждающихся в проведении ТГСК.

Выводы

Использование молекулярно-биологических методов позволяет изучить биологические основы онкологических и гематологических заболеваний, выявить факторы риска, а также оценить прогноз. Все это вместе взятое позволяет более четко сформировать показания к проведению ТГСК как одного из методов клеточной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей по протоколу ОЛЛ-БФМ-90м в Российской Федерации и Республике Беларусь / Н.В. Мякова, О.А. Алейникова, Р.Хартманн и др. // Вопросы онкологии.–2002.– том 48, № 3.–С. 347–351.
2. Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma / E. de Alava, A. Panizo, C. Antonescu, A. Huvos, F. Pardo-Mindan, F. Barr, M. Ladanyi // Am. J. Pathol.–2000.–Vol. 156, № 3.–P. 849–855.
3. Castleberry R. Neuroblastoma / R.Castleberry // European journal of cancer.–1997.–Vol. 33, № 9.–P. 1431–1438.
4. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling / M. Ross, X. Zhou, G. Song, S. Shurtleff, K. Girtman, W. Williams, H. Liu, R. Mahfouz, S. Raimondi, N. Lenny, A. Patel, J. Downing // Blood.–2003.–Vol.102, № 8.–P. 2951–2959.
5. Continuing reduction in level of residual disease after 4 years in patients with CML in chronic phase responding to first-line imatinib (IM) in the IRIS Study / J. Goldman, T. Hughes, J. Radich,, S. Branford, A. Hochhaus, C. So, I. Gathmann, E. Wehrle, J.Kaeda // Blood.–2005.–Vol. 106, ASH Annual Meeting Abstracts.–Abstract 163.
6. EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. // E. de Alava, A. Kawai, J. Healey, I. Fligman, P. Meyers, A. Huvos, W. Gerald, S. Jhanwar, P. Argani, C. Antonescu, F. Pardo-Mindan, J. Ginsberg, R.Womer, E. Lawlor, J. Wunder, I. Andrulis, P. Sorensen, F. Barr, M. Ladanyi // J. Clin Oncol.–1998.–Vol.16, № 4. –P. 1248–1255.

7. Ferrando A. DNA microarrays in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia / A. Ferrando, A. Look // *International Journal of Hematology*.–2004.–Vol. 80.–P. 395–400
8. Goldman J. Therapeutic strategies for chronic myeloid leukemia in the chronic (stable) phase. J. Goldman // *Semin. Hematol.*–2003.–Vol. 40 № 1.–Suppl. 1.–P. 10–17.
9. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia / P. Moos, E. Ratz, M. Carlson, A. Szabo, F. Smith, C. Willman, Q. Wei, S. Hunger, W. Carroll // *Clinical Cancer Research*.–2002.–Vol. 8.–P. 3118–3130.
10. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. / S. Branford, Z. Rudzki Z, A. Harper, A. Grigg K. Taylor, S. Durrant, C. Arthur, P. Browett, A. Schwarzer, D. Ma, J. Seymour, K. Bradstock, D. Joske, K. Lynch, I. Gathmann, T. Hughes // *Leukemia*.–2003.–Vol.17, № 12.–P. 2401–2409.
11. Lampert F. Acute lymphoblastic leukemia. / F. Lampert U. Bertram, H. Riehm // *Paediatric Oncology: Clinical practice and controversies*. / Ed. by P.N. Plowman, C.R. Pinkerton. – London: Chapman & Hall Medical.–1992.–P. 180–197.
12. Mano H. Stratification of acute myeloid leukemia based on gene expression profiles / H. Mano // *International Journal of Hematology*.–2004.–Vol. 80.–P. 389–394.
13. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors – Review and recommendations for ‘harmonizing’ current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results / T. Hughes, M. Deininger, A. Hochhaus, S. Branford, J. Radich, J. Kaeda, M. Baccharani, J. Cortes, N. Cross, B. Druker, J. Gabert, D. Grimwade, R. Hehlmann, S. Kamel-Reid, J. Lipton, J. Longtine, G. Martinelli, G. Saglio, S. Soverini, W. Stock, J. Goldman // *Blood*.–2006.–Mar 7; [Epub ahead of print].
14. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology / M. Schwab, F. Westermann, B. Hero, F. Berthold // *Lancet Oncol.*–2003.–N 4.–P. 472–480.
15. Nowell P. Minute chromosome in human granulocytic leukemia / P. Nowell, D. Hungerford // *Science*.–1960. – Vol.132 –P. 1497–1501.
16. Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients / A. Kohlmann, C. Schoch, S. Schnittger, M. Dugas, W. Hiddemann, W. Kern, T. Haferlach // *Leukemia*.–2004.–Vol.18.–P. 63–71
17. Poplack D. Acute lymphoblastic leukemia / D. Poplack // *Principles and practice of pediatric oncology* / Ed. by P.A. Pizzo, D.G. Poplack – 2nd edition.– Philadelphia: J.B. Lippincott Company.– 1989.– P. 431–481
18. Prediction of immunophenotype, treatment response, and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia using DNA microarrays / H. Willenbrock, A. Juncker, K. Schmiegelow, S. Knudsen, L. Ryder // *Leukemia*.–2004.–Vol. 18.–P. 1270–1277.
19. Pui C. Acute lymphoblastic leukemia in children / C. Pui // *Curr. Opin. Oncol.*–2000.– № 12.– P. 3–12.
20. Risk estimation in localized unresectable single copy MYCN neuroblastoma by the status of chromosomes 1p and 11q / T. Simon, R. Spitz, B. Hero, F. Berthold, A. Faldum // *Cancer Letters*. – 2006. – Vol. 237 № 2. – P. 215–222.
21. Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Niclein, A. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.–1977.–Vol. 74.– P. 5463–5467.
22. Therapy results in five ALL-BFM studies since 1970: implications of risk factors for prognosis / H. Riehm, H. Feickert, M. Schrappe, G. Henze, G. Schellong // *Haematol Blood Transfus*. – 1987.–Vol. 30.– P. 139–146.
23. Westermann F. Genetic parameters of neuroblastomas / F. Westermann, M. Schwab // *Cancer Letters*.–2002.–Vol. 184.– P. 127–147.

G.A. Tsauro, E.R. Semenikhina, E.V. Shorikov, L.G. Fechina

**MOLECULAR BIOLOGY
TECHNIQUES ARE MAIN
METHODS IN THE DIAGNOSTIC
STRATEGY OF CELLULAR
THERAPY IN ONCOLOGICAL AND
HEMATOLOGICAL DISORDERS**

Department of Pediatric hematology, oncology
and transplantation, Institute of medical cellular
technologies, Yekaterinburg

There are several modern molecular biology techniques which can be helpful in the prescription of cellular therapy, such as for peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) for the patients suffering from different oncological diseases and hematological disorders. Authors describe polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, fluorescent in situ hybridization, microarray as simple and reliable techniques for the determination of indications of PBSCT.

УДК 612.014.462

В.И. Волков, С.С. Лескова, Е.Р. Кирколуп

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИСТЕРЕЗИСА СМАЧИВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПЛОСКОГО КАПИЛЛЯРА

Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

Статья посвящена условиям формирования краевых углов на линии трехфазного контакта. Равновесный краевой угол Θ_p находят из условия механического равновесия на линии трехфазного контакта [1]. По закону Юнга

$$\cos \Theta_p = \frac{\sigma_{тг} - \sigma_{жг}}{\sigma_{жт}}$$

где $\sigma_{тг}$, $\sigma_{жг}$, $\sigma_{жт}$ – удельные свободные энергии поверхностей контакта фаз твердое тело – газ, твердое тело – жидкость, жидкость – газ, краевой угол зависит только от термодинамических параметров $\sigma_{тг}$, $\sigma_{жг}$, $\sigma_{жт}$. Поэтому для каждой системы равновесный угол при заданных термодинамических условиях имеет единственное значение. Однако экспериментальные исследования показывают, что измеряемые краевые углы непостоянны и их величины зависят от некоторых скрытых параметров, которые приводят к гистерезису смачивания [1].

Первые исследования порядкового гистерезиса выполнил в 30-х годах академик П.А. Ребиндер [1]. Он предложил первое объяснение причин его возникновения. Суть идеи – на линии трехфазного контакта помимо адгезионного притяжения и поверхностного натяжения действует третья сила, сходная с трением. Главными источниками силы трения на линии трехфазного контакта являются шероховатость, гетерогенность и прочность сольватной оболочки [2].

В данной работе приведены результаты экспериментов по гистерезису смачивания на плоских капиллярах различной ширины. Установка, с помощью которой проводили эксперименты на плоских капиллярах, приведена на рис. 1. Она представляет собой стеклянный сосуд в виде прямоугольного параллелепипеда длиной 2 см, шириной 1,8 см, высотой 2,4 см. В сосуд помещается плоский капилляр, состоящий из двух параллельных пластин шириной 2 см и расстоянием между пластинами d . В процессе эксперимента расстояние между пластинами менялось от 0,21 мм до 2,33 мм с шагом $0,21 \pm 0,005$ мм, дополнительно был проведен эксперимент с расстоянием между пластинами $0,106 \pm 0,005$ мм. Капилляры крепились к стойке с возможностью перемещения микровинтом. Было проведено три серии экспериментов, в которых фиксировалось три положения жидкости в ка-

пилляре: 1 – равновесное поднятие жидкости в капилляре. При начальном погружении капилляра в сосуд жидкость поднимается на некоторый уровень и находится в устойчивом состоянии. Это положение жидкости в капилляре назовем равновесным состоянием (рис. 1а); 2 – затем капилляр с жидкостью в равновесном состоянии с помощью микровинта опускался в сосуд с жидкостью. На определенной глубине погружения происходил срыв жидкости в капилляре, и она возвращалась в равновесное положение. В момент срыва фиксировались краевой угол натекания и высота поднятия жидкости. Т.е. в самой нижней точке положение жидкости в плоском капилляре было неустойчивым. Интересно отметить, что в аналогичных экспериментах с опусканием цилиндрического капилляра положение жидкости в нижней точке было устойчивым. В связи с этим экспериментальные данные по углу натекания и высоте поднятия жидкости при опускании капилляра в жидкость в этой работе не приведены. Третья серия экспериментов состояла в определении краевого угла оттекания. В этой серии с помощью микровинта погруженный в жидкости капилляр поднимался из жидкости. При некоторой высоте поднятия жидкости в капилляре подъем капилляра не приводил к увеличению в нем уровня жидкости. Эта максимальная высота регистрировалась вместе с краевым углом оттекания (рис. 1б).

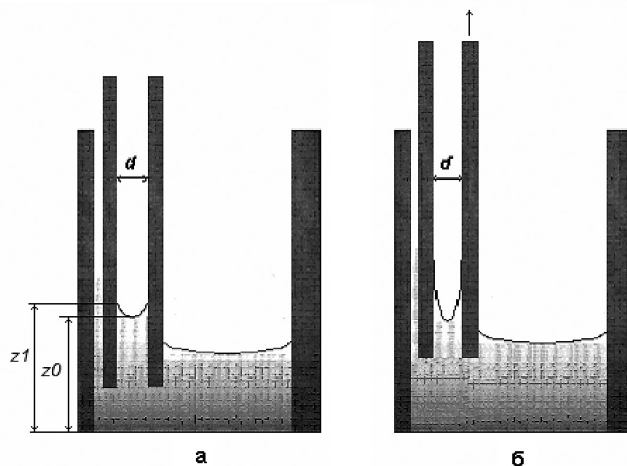


Рис. 1. Схема эксперимента, проводимого с плоскими капиллярами: а) равновесное состояние; б) максимальное поднятие капилляра

Эксперименты проводились с дистиллированной водой многократно, не менее 10 раз, для каждого расстояния между пластинами. В процессе проведения экспериментов фиксировалось значение температуры и влажности воздуха, пределы изменения температуры от 21,5°C – 23,2°C, а пределы изменения влажности от 73 – 74%. В таблице 1 приведены средние значения экспериментальных данных. В первом столбце таблицы 1 приведены значения радиуса плоского капилляра: $r = d/2$. Во втором и шестом столбце соответствующие средние значения равновесной и максимальной высоты поднятия дистиллированной воды в плоском капилляре.

Сравнивая ошибку, приведенную в таблице 1 (столбец 3 и 7), для равновесного и максимального поднятия жидкости в капилляре можно отметить, что относительная ошибка эксперимента для равновесного состояния составляла 18,2%, а для максимального поднятия – 5,5%. По краевому углу относительная ошибка также существенно отличалась (таблица 1, столбец 5 и 9), так относительная ошибка в определении краевого угла по равновесному состоянию составляла 4,1%, а для максимального поднятия – 0,8%. Из таблицы 1 видно, что косинус краевого угла оттекания весьма близок к 1. Для равновесного состояния он мог отличаться от 1 больше чем на 20%.

Проверим формулу Лапласа для высоты максимального поднятия жидкости в капилляре.

$$h = \frac{\sigma}{\rho g r} \cos \theta$$

Для этого найдем произведение $z_0 \cdot r$ и $z_0 \cdot r / \cos \theta$ для равновесного и максимального поднятия. Данные приведены в таблице 2.

Сравнивая произведение $z_0 \cdot r$ для равновесного и максимального поднятия, заметим, что для максимального поднятия это произведение остается постоянным в пределах ошибки эксперимента. Для равновесного состояния произведение $z_0 \cdot r$ может меняться на 60%. Учет косинуса краевого угла в соответствии с формулой Лапласа несущественно влияет на сравнительные характеристики равновесного и максимального поднятия (см. рис. 2 и рис. 3)

По полученным данным были построены графики зависимости высоты поднятия (z_0) от расстояния между пластинами (d), приведенные на рисунках 2 и 3. Из этих графиков видно, что высота поднятия уменьшается обратно пропорционально расстоянию между пластинами и описывается уравнением $y = 4,3 / x$ (рис. 2) и уравнением $y = 8,425 / x$ (рис. 3). Следует отметить, что для максимального поднятия все экспериментальные точки совпадают с аппроксимирующей кривой в пределах ошибки эксперимента, а для равновесного состояния большинство экспериментальных точек лежат вне аппроксимирующей кривой. Это можно объяснить тем, что равновесное поднятие является случайной величиной, зависящей от начальных условий и гистерезиса смачивания [2]. Для подтверждения вышесказанного были проведены дополнительные эксперименты, в которых плоский капилляр погружался в жидкость с раз-

Таблица 1

Равновесное состояние					Максимальное поднятие			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
r, мм	z_0 , мм	z_0 , мм	$\cos \theta$	$\cos \theta$	z_0 , мм	z_0 , мм	$\cos \theta$	$\cos \theta$
0,05	38,9	1,7	≈ 1		77,6	3,4	≈ 1	
0,1	21,28	1,8	0,997	0,001	39,29	3,0	0,999	0,001
0,2	10,67	2,4	0,801	0,167	18,70	1,4	0,968	0,029
0,3	5,11	1,2	0,821	0,033	13,49	0,34	0,965	0,016
0,4	4,60	0,84	0,976	0,006	9,88	0,26	0,992	0,003
0,5	3,01	0,45	0,897	0,027	7,48	0,22	0,981	0,008
0,6	3,71	0,46	0,922	0,023	7,18	0,21	0,984	0,007
0,7	3,55	0,95	0,901	0,019	5,95	0,34	0,982	0,004
0,8	2,94	0,60	0,885	0,035	4,88	0,34	0,981	0,005
0,9	2,45	0,59	0,917	0,036	4,52	0,50	0,983	0,007
1	2,42	0,47	0,988	0,004	4,27	0,21	0,996	0,001
1,1	1,66	0,38	0,926	0,028	3,36	0,24	0,989	0,006
$z_0 \text{cp} = 0,98$			$\cos \theta \text{cp} = 0,034$		$z_0 \text{cp} = 0,87$		$\cos \theta \text{cp} = 0,008$	

Таблица 2

	r, мм	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,1
Равновесное состояние	$z_0 \cdot r$, мм ²	1,95	2,13	2,13	1,53	1,84	1,51	2,23	2,49	2,35	2,21	2,13	1,83
	$z_0 \cdot r / \cos \theta$, мм ²	1,95	2,14	2,66	1,86	1,89	1,68	2,25	2,76	2,66	2,41	2,45	1,98
Максимальное поднятие	$z_0 \cdot r$, мм ²	3,88	3,93	3,74	4,05	3,95	3,74	4,31	4,17	3,90	4,07	4,27	3,69
	$z_0 \cdot r / \cos \theta$, мм ²	3,88	3,93	3,86	4,19	3,98	3,81	4,38	4,24	3,98	4,14	4,25	3,74

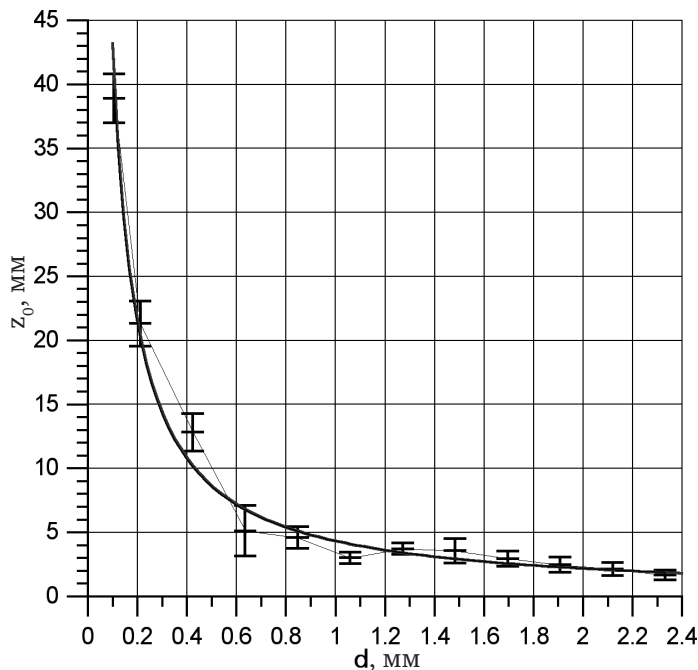


Рис. 2. График зависимости высоты поднятия жидкости от расстояния между пластинами (d). Равновесное состояние

личной скоростью: резкое опускание капилляра в сосуд с жидкостью и медленное увеличение уровня жидкости в сосуде, в который жидкость добавлялась при помощи капельницы. При резком опускании плоского капилляра высота равновесного поднятия жидкости в нем получилась на 11% больше, чем при медленном изменении уровня жидкости в сосуде. Так, при резком опускании эта высота составляла 19,9 мм, а при капании – 17,7 мм.

Заметим, что во всех проведенных сериях экспериментов нельзя было найти высоту поднятия жидкости из формулы Лапласа, приведенной выше. Экспериментальные значения, даже для максимального поднятия, почти в 2 раза отличались от теоретических значений, полученных по формуле Лапласа, несмотря на различную химическую очистку поверхности стекла и использование свежеприготовленного дистиллята. По всей видимости, это связано с наличием существенного влияния сил трения, которое проявляется в гистерезисе смачивания и должно учитываться при расчете максимальной высоты поднятия жидкости в капилляре.

Выводы

1. Как показали эксперименты зависимость максимальной высоты поднятия от размера щели определяется гиперболической зависимостью (произведение $z_0 \cdot r$ остается постоянным). Поэтому если говорить о капиллярном методе измерения поверхностного натяжения биологических жидкостей, то целесообразнее всего использовать максимальную высоту поднятия и краевого угол оттекания. Определение поверхностного натяжения жидкости по равновесному значению высоты поднятия связано с существенной случайной ошибкой эксперимента и малой повторяемостью результатов.

2. Для получения точного значения высоты поднятия

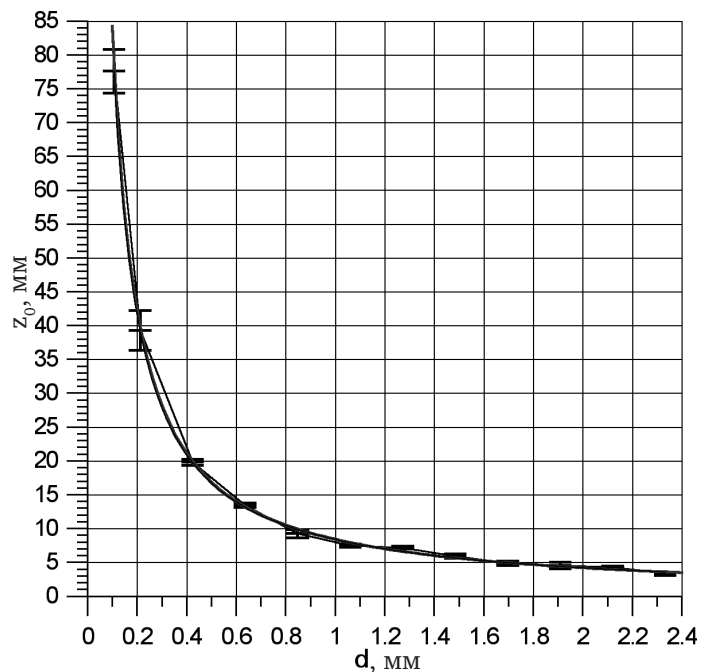


Рис. 3. График зависимости высоты поднятия жидкости от расстояния между пластинами (d). Максимальное поднятие

жидкости в капилляре необходимо учитывать вклад силы трения, которая почти в два раза уменьшает высоту поднятия жидкости в капилляре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сумм Б.Д. Гистерезис смачивания // Соросовский образовательный журнал, № 7, 1999 г., с. 92 – 102.
2. Веселовский В.С., Перцов В.Н. Прилипание пузырьков к твердым поверхностям. // Журнал физической химии, т. 8, вып. 2, 1936, с. 245 – 259.

V.I. Volkov, S.S. Leskova, E.R. Kirkolup EXPERIMENTAL RESEARCH OF A HYSTERESIS OF WETTING WITH THE HELP OF A FLAT CAPILLARY

Altay State Medical University, Barnaul

In the given work results of experiments on a hysteresis of wetting on flat capillaries of various diameter are resulted. Experiments on a hysteresis of wetting have shown, that dependence of the maximal height of a raising on the size of a crack is defined by hyperbolic dependence; for measurement of a superficial tension of biological liquids it is the most expedient to use the maximal height of a raising and a regional corner from current; for reception of exact value of height of a raising of a liquid in a capillary it is necessary to take into account the contribution of force of friction which almost in 2 times reduces height of a raising of a liquid in a capillary.

А.Н. Дмитриев¹, Н.Ю. Трельская², П.А. Саранульцев³, П.Е. Трельский²,
Е.М. Футерман¹, Л.Р. Салихова¹

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕРДЦА В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

¹ ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрава»,

² МУ Городская клиническая больница № 40, ³ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

Метаболический синдром (МС), имеющий место у 14–30% взрослого населения экономически развитых стран [7, 10] представляет собой комплекс наследуемых регуляторно-метаболических нарушений, приводящих под влиянием ряда средовых и биологических факторов к труднообратимым расстройствам обмена веществ и появлению соматических заболеваний с неблагоприятностью их течения и прогноза¹. Актуальность проблемы МС определяется как высоким уровнем смертности от ассоциированных с ним сердечно-сосудистых заболеваний [3], так и немногочисленностью исследований, посвященных выявлению особенностей патологических изменений сердца у пациентов с МС [9], особенно в динамике его формирования. Последнее обстоятельство, а также выявленные на популяционном уровне особенности МС, влияющие на развитие заболеваний сердечно-сосудистой системы (различия в ассоциации его компонентов) [2] и послужили поводом к проведению настоящего исследования.

Цель исследования

оценить особенности структурно-функциональных изменений сердца в динамике развития метаболического синдрома.

Материалы и методы

В условиях эндокринологического центра обследовано 52 пациента в возрасте $45,15 \pm 1,52$ лет с клиническими и лабораторными проявлениями МС.

В обследование входило определение:

а) ИМТ ($\text{кг}/\text{м}^2$);

б) систолического ($\text{АД}_{\text{сисст}}$), диастолического ($\text{АД}_{\text{диаст}}$) и среднего артериального давления ($\text{АД}_{\text{сред}}$) по формуле $\text{АД}_{\text{сред}} = 0,42 \times [\text{АД}_{\text{сисст}} - \text{АД}_{\text{диаст}}] + \text{АД}_{\text{диаст}}$;

с) общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и триглицеридов (ТГ) ферментативным методом на биохимическом анализаторе «Im-munochemistry Systems» фирмы Beckman Coulter (США);

д) мочевой кислоты (МК) ферментным колориметрическим методом с помощью наборов Test combination Urica-quant фирмы Boehringer Mannheim (Германия);

е) иммунореактивного инсулина (ИРИ) хемилюминесцентным методом на автоматическом анализаторе Centaur Advia фирмы Bayer;

ф) С-пептида (иммуноферментным методом на диагностических системах фирмы DSL (США) с оценкой результатов на спектрофотометре «Multiscan» фирмы Lab-systems (Финляндия);

г) гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}) методом катионообменной хроматографии низкого давления на автоматическом анализаторе «Glycomat DS5» фирмы Drew;

h) показателей, характеризующих структурное и функциональное состояние сердца, исследованных аппаратами «Aloka SSD 630» и «Kontron Sigma 1AC» в секторальном режиме по стандартной методике эхокардиографии:

- средние размеры левого предсердия (СРЛП, см),
- толщину задней стенки левого желудочка в диастолу (ТЗСЛЖд, см),
- толщину межжелудочковой перегородки (ТМЖП, см),
- ударный объем (УО, мл),
- фракцию выброса (ФВ, %),
- конечно- систолический и диастолический объемы (КСО, мл; КДО, мл)²,
- массу миокарда левого желудочка (ММЛЖ, г)³,
- индекс относительной толщины стенки левого желудочка (ОТСЛЖ),

¹ Диагностические критерии ВОЗ (1998), АТР III (2001) и ААСЕ (2002) включают: инсулинорезистентность и/или сахарный диабет 2 типа; центральное ожирение (ИМТ > 30 $\text{кг}/\text{м}^2$, ОТ муж. > 102 см, жен. > 88 см и/или отношение ОТ/ОБ = 90 для мужчин и 0,85 – для женщин); систолическое АД > 160 мм рт.ст. или диастолическое АД > 90 мм рт.ст.; дислипидемию, проявляющуюся повышением уровня триглицеридов плазмы > 1,7 ммоль/л и/или низким уровнем ХС ЛПВП < 0,9 ммоль/л для мужчин, и < 1,0 ммоль/л у женщин, и/или ИБС; дисфункцию эндотелия; гиперурикемию; гиперкоагуляцию; микроальбуминурию: скорость экскреции альбуминов с мочой > 20 мкг/мин; поликистоз яичников. При этом наличие трех и более признаков принято обозначать как «полный» МС, а лишь двух признаков – «неполный» МС.

- индекс «объем-масса» (ИОМ = КДО/ММЛЖ, мл/г),
- средние размеры правого предсердия (СРПП, см),
- толщину передней стенки правого желудочка (ТПСПЖ, см),
- передне-задний размер правого желудочка (ПЗРПЖ, см),
- состояние систолической функции левого желудочка (ЛЖ) оценивалось по таким показателям, как ударный объем (УО), фракция выброса (ФВ), индекс объем/масса (ОИМ).

Кроме того, методом стандартной доплер-эхокардиографии в секторальном режиме определялись максимальная скорость пассивного (Е) и максимальная скорость активного наполнения левого желудочка (А), их отношение (Е/А), а также время изоволюмического расслабления (IVRT LV) и время замедления раннего диастолического наполнения левого желудочка (DT), характеризующие трансмитральный поток и фазовую структуру диастолы левого желудочка соответственно.

Контрольную группу составили 36 практически здоровых добровольцев с нормальной массой тела, обследованных по аналогичной схеме.

Обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ «Statistica» (версия 6.0).

Результаты исследования

При обследовании 52 пациентов с метаболическим синдромом без наличия СД 2 типа была установлена их неоднородность по такому показателю, как гликозилированный гемоглобин (HbA_{1c}), повышение которого свидетельствует о нарушении толерантности к глюкозе. Это послужило основанием для разделения обследованных на две группы: с нормальным значением HbA_{1c} (группа А, возраст 45,16 ± 1,74 лет) и с повышенным (группа В, возраст 45,14 ± 1,51 лет) его уровнем (5,3 ± 0,09% и 7,1 ± 0,2% соответственно, $p = 0,0001$).

Основные характеристики исследованных составляющих МС каждой группы представлены в таблице 1.

Из данных таблицы следует, что снижение уровня ИРИ у пациентов группы В свидетельствует о снижении компенсаторных возможностей островкового аппарата поджелудочной железы с развитием нарушения толерантности к глюкозе, которое и проявилось повышением уровня гликозилированного гемоглобина.

Сравнение структурно-функциональных показате-

² Рассчитывались автоматически по введенной в программу компьютерной обработки данных формуле L. Teichholz (11): КСО (мл) = $[7 : (2,4 + D)] \times D^3$, где V — объем полости в миллилитрах; D — передне-задний размер полости ЛЖ в период систолы (для КДО — диастолы) в сантиметрах.

³ Рассчитывалась по формуле R.V. Devereux [8], рекомендованной американским эхокардиографическим обществом: ММЛЖ = $0,8 \times [1,04 \times (ТМЖП + КДР + ТЗСЛЖ)^3 - (КДР)^3] + 0,6$.

Таблица 1

Значения компонентов МС у пациентов с нормальным и повышенным уровнем гликозилированного гемоглобина

Показатель	Группа А (n = 28)	Группа В (n = 24)
САД, мм рт. ст.	134,1 ± 1,52	135,7 ± 1,7
ДАД, мм рт. ст.	85,0 ± 1,27	86,0 ± 0,97
ИМТ, кг/м ²	36,6 ± 1,24	34,9 ± 1,23
ОТ/ОБ	0,97 ± 0,03	0,90 ± 0,01
Общий холестерин, ммоль/л	5,36 ± 0,18	5,7 ± 0,1
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	0,96 ± 0,06	1,0 ± 0,07
Триглицериды, ммоль/л	1,75 ± 0,1	1,87 ± 0,1
Мочевая кислота, ммоль/л	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,02
С-пептид, нг/мл	2,1 ± 0,2	2,07 ± 0,1
ИРИ, мМЕ/л	29,6 ± 3,8	13,7 ± 1,65*
HbA _{1c} , %	5,3 ± 0,09	7,1 ± 0,2*
% жира в общей массе тела	42,2 ± 0,93	41,6 ± 0,98

* $p = 0,003$.

Таблица 2

Структурно-функциональные показатели сердца при МС

Показатель	Контроль (n = 36)	Группа А (n = 28)	Группа В (n = 24)
СРПП, см	3,4 ± 0,02	3,53 ± 0,01	3,36 ± 0,04
ТМЖП, см	0,9 ± 0,02	1,06 ± 0,03*	1,07 ± 0,05*
ТЗСЛЖ _д , см	0,94 ± 0,01	0,97 ± 0,03	1,02 ± 0,05*
ММЛЖ, г	155,5 ± 5,2	165 ± 14	150,7 ± 11,4
ОТСЛЖ	0,36 ± 0,005	0,42 ± 0,001	0,40 ± 0,001
СРПП, см	3,2 ± 0,02	3,3 ± 0,01	3,38 ± 0,08
ПЗРПЖ, см	1,93 ± 0,02	2,6 ± 0,01*	2,36 ± 0,07*
ТПСПЖ, см	0,37 ± 0,07	0,40 ± 0,03*	0,43 ± 0,01*
ИОМ, мл/г	0,78 ± 0,01	0,63 ± 0,02*	0,74 ± 0,03

* степень достоверности различий с группой контроля: $p = 0,01 - 0,001$.

телей сердца лиц контрольной группы и пациентов с МС (табл. 2) показало, что увеличение ТМЖП, ПЗРПЖ, ТПСЖ выявляется уже в группе А и дополняется в группе В увеличением еще и ТЗСЛЖ_д.

Для установления влияния каждого из изучавшихся составляющих МС на структурно-функциональные показатели сердца методом множественной линейной регрессии (в число анализируемых показателей как зависимых переменных включались лишь те, которые статистически значимо отличались от контрольных величин).

В результате такого анализа в обеих группах было установлено влияние С-пептида ($r < 0,99$, $p = 0,000002$), ИРИ ($r < 0,95$, $p = 0,0005$), HbA_{1c}

Таблица 3

Показатели систолической функции левого желудочка при МС и лиц контрольной группы

Показатель	Контроль (n = 36)	Группа А (n = 28)	Группа Б (n = 24)
УО, мл	74,2 ± 1,9	63,3 ± 4,1*	65,1 ± 1,4*
ФВ, %	62,0 ± 1,2	59,7 ± 1,5	63,4 ± 1,4

* степень достоверности различий с группой контроля: $p = 0,01 - 0,008$.

Таблица 4

Показатели диастолической функции левого желудочка при МС

Показатель	Контроль (n = 36)	Группа А (n = 28)	Группа Б (n = 24)
IVRT LV, с	0,07 ± 0,0002	0,08 ± 0,0005*	0,08 ± 0,0004*
DT, с	0,18 ± 0,001	0,19 ± 0,001	0,18 ± 0,002
Е, мл/с	0,72 ± 0,01	0,62 ± 0,04*	0,62 ± 0,03*
А, мл/с	0,45 ± 0,09	0,64 ± 0,02*	0,43 ± 0,04
Е/А	1,56 ± 0,01	0,96 ± 0,09*	1,3 ± 0,07*

* степень достоверности различий с группой контроля: $p = 0,01 - 0,001$.

($r < 0,99$, $p = 0,0000001$), МК ($r < 0,99$, $p = 0,00000001$) и ТГ крови ($r < 0,99$, $p = 0,002$), а в группе А – еще и ОХ ($r < 0,99$, $p = 0,0008$) на такие структурные показатели сердца, как СРЛП, ТМЖП, ТЗСЛЖ, СРПП, ПЗРПЖ, ТПСПЖ, ИОМ. При этом наибольшему влиянию метаболических факторов оказались подвержены ТМЖП, ТЗСЛЖ, СРПП, ПЗРПЖ, ТПСПЖ. Примечательно, что ММЛЖ оказалась независимой от величины изучавшихся составляющих МС как в группе А, так и в группе Б.

Последующим корреляционным анализом были детализированы взаимосвязи составляющих МС и структурных показателей сердца в обеих группах:

- в группе А выявлена обратная зависимость ОТСЛЖ, СРПП и ПЗРПЖ от уровня ОХ ($r = -0,72$, $p < 0,05$; $r = -0,61$, $p < 0,05$; $r = -0,44$, $p < 0,05$ соответственно), а также СРЛП ($r = -0,82$, $p < 0,05$), ТЗСЛЖ ($r = -0,56$, $p < 0,05$), СРПП ($r = -0,61$, $p < 0,05$) и ТПСПЖ ($r = -0,72$, $p < 0,05$) от ЛПВП. ТПСПЖ определялась более сложной взаимосвязью с показателями липидного обмена: обратной зависимостью от уровня ОХ ($r = -0,72$, $p < 0,05$), но прямой связью с ТГ ($r = 0,6$, $p < 0,05$). Отношения между структурными показателями сердца и МК характеризовались неоднозначностью: обратной зависимостью ТМЖП и ОТСЛЖ ($r = -0,43$, $p < 0,05$ и $r = -0,70$, $p < 0,05$) и прямой – с ИОМ ($r = 0,62$, $p < 0,05$). Что же касается HbA_{1c} , то его значения линейно коррелировали лишь со СРПП ($r = 0,41$, $p < 0,05$).

Таким образом, структурные изменения сердца в группе А касались преимущественно правых его

отделов (СРПП, ПЗРПЖ и ТПСПЖ), характеризуюсь большой теснотой линейной связи ПЗРПЖ и ТПСПЖ с ТГ и HbA_{1c} , в то время как изменения левых отделов были представлены меньшим числом показателей (СРЛП, ТЗСЛЖ) и обратной их зависимостью от ОХ и ЛПВП.

- в группе Б установлена обратная зависимость ПЗРПЖ от ЛПВП ($r = -0,44$, $p < 0,05$), при этом имевшая место в группе А отрицательная связь ОТСЛЖ, ТПСПЖ с ОХ ослабевала ($r = -0,48$, $p = 0,05$; $r = -0,41$, $p = 0,05$), а с такими показателями, как СРПП и ПЗРПЖ, даже исчезала (утрачивалась также связь ТПСПЖ, ТМЖП, ОТСЛЖ с ТГ и МК, равно как и СРПП с HbA_{1c}). Было, однако, отмечено появление прямой зависимости ТМЖП ($r = 0,51$, $p < 0,05$) и ТЗСЛЖ ($r = 0,45$, $p = 0,05$) от уровня ОХ, а также СРПП, ПЗРПЖ и ТПСПЖ от уровня С-пептида ($r = 0,45$, $p = 0,05$; $r = 0,49$, $p = 0,05$; и $r = 0,78$, $p = 0,05$ соответственно). Обращало также внимание, что ИОМ, линейно коррелировавший в группе А с МК, приобретал обратную зависимость от уровня С-пептида ($r = -0,46$, $p = 0,05$).

Из результатов анализа следует, что в группе В не только сохранялись, но и имели тенденцию к нарастанию изменения правых отделов сердца, характеризуюсь увеличением ТПСПЖ, СРПП, ПЗРПЖ, которые прямо зависели от уровня С-пептида, при одновременном ослаблении влияния ТГ, ОХ, ЛПВП и МК. Изменения левых отделов сердца (ТЗСЛЖ и ТМЖП) находились в прямой связи с уровнем ОХ, а ИОМ и ОТСЛЖ – в обратной зависимости от С-пептида и МК соответственно.

Сравнение показателей систолической функции левого желудочка (ЛЖ) пациентов с МС и лиц контрольной группы (табл. 3) выявило достоверное снижение лишь ударного объема.

Следующим этапом исследования было изучение диастолической функции ЛЖ в каждой из групп (табл. 4).

При анализе результатов исследования пяти основных показателей установлено, что характер их изменений указывает на формирование диастолической дисфункции ЛЖ:

- в группе А констатировано удлинение IVRT LV, прямо коррелировавшее с Ad_{cp} ($r = 0,65$, $p < 0,05$), с ИМТ ($r = 0,65$, $p < 0,05$), с HbA_{1c} ($r = 0,41$, $p < 0,05$), МК ($r = 0,72$, $p < 0,05$) и отрицательно – с ЛПВП ($r = -0,67$, $p < 0,05$), а также снижение пика Е, прямо зависевшее от ЛПВП ($r = 0,50$, $p < 0,05$), но обратно – от Ad_{cp} ($r = -0,64$, $p < 0,05$), С-пептида ($r = -0,53$, $p < 0,05$), ИМТ ($r = -0,52$, $p < 0,05$), ОХ ($r = -0,44$, $p < 0,05$) и ТГ ($r = -0,59$, $p < 0,05$), увеличение пика А с прямой корреляционной зависимостью от Ad_{cp} ($r = 0,64$, $p < 0,05$), ИМТ ($r = 0,89$, $p < 0,05$), МК ($r = 0,55$, $p < 0,05$), но отрицательной – от ЛПВП ($r = -0,50$, $p < 0,05$), а также уменьшение отношения Е/А ($0,96 \pm 0,09$ против $1,56 \pm 0,01$ в

группе контроля), отрицательно коррелировавшее с АД_{ср} ($r = -0,73, p < 0,05$), С-пептидом ($r = -0,52, p < 0,05$) и ТГ ($r = -0,46, p < 0,05$), но положительно – с МК ($r = 0,43, p < 0,05$). Выявленные изменения соответствует критериям I степени диастолической дисфункции левого желудочка («нарушение расслабления» по Ф.Т. Агееву).

• в группе В – также констатировано удлинение IVRT LV, прямо коррелировавшее с HbA_{1c} ($r = 0,57, p < 0,05$) и отрицательно – с ЛПВП ($r = -0,48, p < 0,05$); пик E оставался сниженным и отрицательно коррелировавшим не только с ОХ ($r = -0,41, p < 0,05$), ТГ ($r = -0,52, p < 0,05$), но и МК ($r = -0,53, p < 0,05$); снижение пика А прямо зависело от ИМТ ($r = 0,62, p < 0,05$), ОХ ($r = 0,46, p < 0,05$), С-пептида ($r = 0,51, p < 0,05$), но отрицательно коррелировало с уровнем ЛПВП ($r = -0,64, p < 0,05$); увеличение отношения E/A ($1,3 \pm 0,07$ против $1,56 \pm 0,01$ в группе контроля) сопровождалось обратной корреляционной зависимостью от ОХ ($r = -0,45, p < 0,05$) и HbA_{1c} ($r = -0,60, p < 0,05$). Характер изменений изучавшихся показателей отражает состояние диастолической дисфункции левого желудочка II степени – «псевдонормальная» по Ф.Т. Агееву [1].

Обсуждение результатов

Подводя итог проведенному исследованию, можно утверждать, что механизм ремоделирования миокарда обусловлен в первую очередь нарушением углеводного обмена и это подтверждается прямой корреляционной зависимостью между гликозилированным гемоглобином (даже при относительно нормальных его значениях) и СРПП в группе А, а также между уровнем С-пептида и СРПП, ПЗРПЖ и ТПСРПЖ в группе В. Однако этим фактом не исчерпываются механизмы формирования диастолической дисфункции у пациентов с МС. Особое место в формировании ремоделирования сердца у пациентов с МС принадлежит нарушениям липидного обмена, которые могут быть проявлением генетической предрасположенности, так и расстройствам углеводного обмена, что подтверждается обратной корреляционной зависимостью уровня ЛПВП и структурных показателей сердца в группе А и прямой зависимостью уровня ОХ от выраженности структурных изменений миокарда в группе В. Если связь нарушений диастолической функции миокарда с ИМТ можно объяснить уже доказанным фактом хронической перегрузки миокарда избыточной массой тела, формирующейся на фоне компенсаторной гиперсимпатикотонии [4,5], то в проведенном нами исследовании было доказано, что развитие диастолической дисфункции коррелирует с уровнем гликозилированного гемоглобина в обеих группах и уровнем С-пептида в группе А.

Особого внимания заслуживает наличие корреляции между уровнем МК и повышением IVRT LV и А в

группе А и снижение в группе В, свидетельствующее о влиянии уровня МК на выраженность диастолической дисфункции миокарда и может быть объяснено нарушением реологии и агрегации крови под влиянием МК [6].

Выводы

1. Характер структурно-функциональных нарушений сердца при полном метаболическом синдроме позволяет выделить стадийность развития последнего: 1 стадия – без нарушения толерантности к глюкозе, 2 стадия – с нарушением толерантности к глюкозе, 3 стадия – с наличием СД 2 типа.

2. Ремоделирование миокарда (преимущественно правых отделов сердца) выявляется у пациентов с МС еще на стадии компенсации углеводного обмена, обратно коррелируя с ЛПВП.

3. Присоединение к признакам МС нарушения толерантности к глюкозе усугубляет выраженность структурно-функциональных изменений сердца с вовлечением в процесс левого желудочка сердца, прямо коррелируя с ОХ и С-пептидом.

4. Проявление диастолической дисфункции сердца при МС выявляется еще до нарушения углеводного обмена (I степень диастолической дисфункции) и усиливается при его появлении (II степень диастолической дисфункции), прямо коррелируя с уровнем гликозилированного гемоглобина и мочевой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев Ф.Т. Эволюция представлений о диастолической функции сердца // www.nedug.ru.
2. Кузин А.И., Ленгин Ю.А. Метаболический синдром: клинические и популяционные аспекты. – Челябинск, 2001 г. – 96 с.
3. Bray G.A. Health hazards associated with overweight. In: Contemporary diagnosis and management of obesity. /Bray G.A. (ed.), 1998, 68–103.
4. Camps M.A., Castello P., Munoz M. et al. Effect of diabetes and fasting on GLUT 4 (muscle fat) glucose transporter expression in insulin sensitive tissues. // *Biochem. J.* – 1992. – 282: 765–772.
5. Cross H., Radda G., Clarke K. The role of Na⁺/K⁺ATPase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: a ³¹P ²³Na and ⁸⁷Rb NMR spectroscopic study. // *Magn. Reson. Med.* – 1995. – 34: 673–685.
6. Daskalopoulou S.S. et al. The impact of serum uric acid on cardiovascular outcomes in the LIFE study. // *Kidney Int.* – 2004; 66 (4): 1714–1715.
7. Despres J.-P. The impact of orlistat on the multifactorial risk profile of abdominally obese patients. / Presented at the 59th Annual Meeting of the American Diabetes Association (ADA); 19–22 June, 1999; San Diego, USA.

8. Devereux R.B. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings / R.B. Devereux, D.R. Alonso, E.M., Lutas. // Am. J. Cardiol. - 1986 - V.57. - P. 450-458.

9. Haffner S.M., D'Agostino R., Mykkonen L. et al. Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes // Diabetes Care. - 1999. - V.24. - № 4 - P. 562--568.

10. Stanley W.C., Lopaschuk G.D., Hall J.L., McCor-

mack J.G. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions Potential for pharmacological interventions. // Cardiovasc. Res. - 1997. - 33: 243 - 257.

11. Teicholtz L.E., Kruehen T., Herman M.V., Gorlin R.. Problems in echocardiographic volume determination // Am. J. Cardiol. - 1976. - Vol. 37. - P. 7-11.

*A.N. Dmitriev¹, N.U. Trelskaya², P.A. Sarapultsev³, P.E. Trelsky²,
E.M. Futerman¹, L.R. Salihova¹*

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONDITION OVERPATCHING OF THE HEART IN THE METABOLIC SYNDROME'S DYNAMICS

¹ Ural state medical academy, ² Municipal clinical hospital 40, ³Institute of Immunology and Physiology RAS

In the process of the echocardiography inspection of 52 patients in the age of $45,15 \pm 1,52$ years with clinical and laboratory displays of the incomplete and advanced incomplete metabolic syndrome (MS) the structural and functional changes of the myocardium were established, interrelated with a dislipidemia and hyperinsulinemia, started still in the compensated carbohydrate metabolism in the right heart and being progressed in a process of a intensification of metabolic infringements. Similar changes of the left ventricular are realized in mainly diastolic dysfunction and also have the distinct tendency of progressing in the dynamics of the meta-

bolic syndrome's development: from the I degree (according to F.T.Ageev) at the MS with safe carbohydrate metabolism, to the II degree - at the MS infringement of tolerance to glucose.

Utter an opinion, the early diagnostic of the atherogenic dislipidemia, hyperglycohaemoglobinemia and hyperinsulinemia at patients with MS can serve as a substantiation of measures of duly preventive maintenance of the revealed myocardial infringements.

Key words: metabolic syndrome, echocardiography, myocardium, dislipidemia, hyperglycohaemoglobinemia, hyperinsulinemia.

А.А. Курындина¹, д.м.н. П.А. Саранульцев²

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА НА ВЗАИМОСВЯЗЬ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ ПОЧЕК С ИЗМЕНЕНИЕМ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕРДЦА

¹ ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрава»,

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

Введение

В последние два десятилетия во всем мире отмечается неуклонный рост числа больных сахарным диабетом (СД), что позволяет отнести его в разряд глобальных проблем [1, 6, 7, 8, 9]. По данным ВОЗ, в мире насчитывается более 150 млн больных СД, из них 90% – СД 2 типа [1, 8]. В связи с появлением современных методов лечения продолжительность жизни этих больных возросла во много раз, что привело к появлению «поздних» сосудистых осложнений и отразилось на структуре их смертности. Известно, что сердечно-сосудистые осложнения являются ведущей причиной смертности больных СД 2 типа как в мире, так и в России [1, 8, 12]. В тоже время хроническая гипергликемия и гиперинсулинемия, характерные для СД 2 типа, повышают риск развития не только поражений сердца, но и почечной патологии, определяя прогноз заболевания [1, 5, 6, 8, 9].

Поражение почек при СД 2 типа развивается у 30–60% больных [1, 7, 9]. При этом, терминальная почечная недостаточность при СД 2 типа развивается значительно реже, чем при СД 1 типа (5–10% и 30–50% случаев соответственно). Однако эти пациенты составляют 90% от всей диабетической популяции, а ХПН, развившаяся вследствие ДН, является у них второй по частоте (после сердечно-сосудистых осложнений) причиной смерти [1, 7].

В связи с детальной расшифровкой значения ряда нейрогуморальных систем в последние два десятилетия возрос интерес к изучению кардиоренальных взаимодействий [3, 4, 13, 14, 15]. Хорошо известно, что при патологии почек выявляются разнообразные сердечно-сосудистые осложнения. И наоборот, у кардиологического больного часто наблюдаются признаки поражения почек, иногда достаточно выраженные и трудно корригируемые [2, 3, 10, 14]. В доступной литературе отсутствуют сведения о взаимосвязи между нарушением функции почек и изменениями структурно-функциональных показателей сердца и у больных СД 2 типа, особенно при различной его длительности. Это послужило поводом проведения исследования.

Цель исследования: установить влияние длительности сахарного диабета 2 типа на характер взаимосвязи нарушения функции почек с изменением структурно-функциональных показателей сердца.

Материалы и методы

Обследовано 105 больных сахарным диабетом 2 типа в возрасте $48,5 \pm 0,5$ лет с длительностью диабета $6,7 \pm 0,7$ лет, без указания на предшествующее поражение почек (хр. пиелонефрит, хр. гломерулонефрит, МКБ и др.) и сердечно-сосудистую патологию.

Для оценки состояния функции почек и структурно-функциональных показателей сердца в зависимости от длительности заболевания все больные сахарным диабетом 2 типа были разделены на три группы. В основу деления на группы был положен временной интервал – 10 лет. Выбор такого интервала обусловлен тем, что установлено влияние осложнений сахарного диабета (диабетическая микроангиопатия, диабетическая полинейропатия) при длительности заболевания 10 лет и более [И.И. Дедов с соавт., 1998]. Таким образом, все вошедшие в обследование больные сахарным диабетом 2 типа распределены на следующие три группы: группа А (n = 24) – лица с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа, группа Б (n = 57) – лица с длительностью сахарного диабета 2 типа до 10 лет, группа В (n = 24) – лица с длительностью сахарного диабета более 10 лет.

В контрольную группу вошли 36 практически здоровых лиц, не имеющих в анамнезе артериальной гипертензии и отягощенной наследственности по сахарному диабету.

Всем больным с СД 2 типа проводилось следующее обследование: биохимическое исследование крови (с определением уровня креатинина крови); проводились качественные и количественные методы исследования мочи: суточная протеинурия, проба Нечипоренко, проба Реберга (определялись скорость клубочковой фильтрации (СКФ) и канальцевая реабсорбция).

Эхокардиографическое исследование проводилось в секторальном режиме по стандартной методике на аппаратах Aloka SSD 630 и Kontron Sigma 1AC в М-режиме импульсным датчиком 3,5 МГц в положении больного на левом боку, согласно рекомендациям американского эхокардиографического общества. Изучались следующие показатели: размеры левого предсердия (ЛП), размеры правого предсердия (ПП), толщина задней стенки левого желудочка в диастолу (ТЗС), толщина межжелудочковой перегородки в диастолу (ТМП), отношение толщины межжелудочковой перегородки к

толщине задней стенки левого желудочка (ТМП/ТЗС), конечный систолический размер (КСР), конечный диастолический размер (КДР), передне-задний размер правого желудочка (ПЗРПЖ), толщина передней стенки правого желудочка (ТППЖ). Определялись следующие параметры центральной гемодинамики: конечный диастолический объем (КДО), конечный систолический объем (КСО) по формуле L. Teicholz, фракция выброса (ФВ), степень укорочения передне-заднего размера левого желудочка (ISF), скорость циркулярного укорочения волокон миокарда (VCF). Массу миокарда ЛЖ (ММЛЖ) рассчитывали по формуле R.V. Devereux [11]: $ММЛЖ = 0,8 \times [1,04 \times (ТМП + КДР + ТЗС)^3 - (КДР)^3] + 0,6$. Рассчитывались следующие индексы: относительной толщины стенки (ОТС) по формуле: $(ТМП + ТЗС)/КДР$, индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) как отношение ММЛЖ к площади поверхности тела, индекс объем – масса (ИОМ) по формуле $КДО / ММЛЖ$.

Изучались следующие показатели трансмитрального потока: максимальная скорость быстрого диастолического наполнения (Е) и максимальная скорость наполнения левого желудочка во время систолы левого предсердия (А), а также их отношение (Е/А). Кроме того, определялись показатели, характеризующие фазовую структуру диастолы левого желудочка: время изоволюметрического расслабления левого желудочка (IVRT LV), время замедления раннего диастолического наполнения (DT).

Результаты обработаны статистически с помощью пакета прикладных программ «Statistica» (версия 6.0). Использовались следующие методы статистического анализа: описательная статистика, корреляционный анализ, непараметрический критерий Краскела – Уолиса. Выборочные параметры, приводимые в таблицах, имеют следующие значения: М – среднее, m – ошибка среднего, n – объем анализируемой группы, p – достигнутый уровень значимости, r – коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты исследования

На первых этапах исследования для уточнения выраженности почечной патологии у больных СД 2 типа проведена сравнительная характеристика контрольной группы с группами больных сахарным диабетом с различной длительностью заболевания.

Результаты представлены в таблице 1.

Сравнительный анализ показателей функции почек в контрольной группе и в группах больных СД 2 типа с различной длительностью заболевания показал существенное различие в параметрах. Так, в группе А достоверное отличие от контрольной группы имелось лишь по уровню суточной протеинурии ($p = 0,00001$). В то время как достоверных отличий по уровню креатинина крови, величине канальцевой реабсорбции и СКФ не обнаружено.

Группа Б достоверно отличалась от контрольной группы по уровню суточной протеинурии ($p = 0,000058$) и СКФ ($p = 00002$). При этом достоверных отличий от группы контроля по уровню креатинина крови и величине канальцевой реабсорбции в этой группе не обнаружено.

В группе В найдены различия по всем показателям функции почек в сравнении со здоровыми лицами. Так, уровни креатинина крови ($p = 0,02$), суточной протеинурии ($p = 0,00001$) были достоверно выше, а СКФ ($p = 0,00008$) и величина канальцевой реабсорбции ($p = 0,0026$) достоверно ниже, чем в группе контроля.

Для определения различий между группами больных СД 2 типа с различной длительностью заболевания был использован непараметрический критерий Краскела – Уолиса. При проведении данного анализа отмечено, что группы больных СД 2 типа достоверно отличались между собой по уровню суточной протеинурии ($p = 0,00001$), СКФ ($p = 0,046$), канальцевой реабсорбции ($p = 0,015$) с тенденцией к ухудшению функции почек с увеличением длительности заболевания. В тоже время по уровню креатинина крови отличий между группами не было выявлено ($p = 0,62$).

Таким образом, у больных СД 2 типа изменения функции почек имеются уже на этапе манифестации диабета с тенденцией к прогрессированию с увеличением длительности заболевания.

Далее были рассмотрены особенности структурно-функциональных показателей сердца в группах больных СД 2 типа с различной длительностью заболевания в сравнении с группой здоровых лиц. Результаты представлены в таблице 2.

В группе больных с впервые выявленным СД 2 типа (группа А) по сравнению с контрольной группой выявлены следующие изменения структурно-

Таблица 1

Сравнительная характеристика показателей функции почек у больных сахарным диабетом 2 типа и контрольной группы при различной длительности заболевания

Показатель	Контрольная группа (n = 36)	Группа А (n = 24)	Группа Б (n = 57)	Группа В (n = 24)
Креатинин крови, мкмоль/л	87,2 ± 3,2	93,4 ± 3,3	95,1 ± 3,6	113,2 ± 13,9*
Суточная протеинурия, г/сут	0 ± 0	0,14 ± 0,04**	0,24 ± 0,03**	1,1 ± 0,3**
СКФ, мл/мин	102,1 ± 1,4	92,6 ± 9,7	92,2 ± 5,7**	71,4 ± 4,9**
Канальцевая реабсорбция, %	98,87 ± 0,07	98,47 ± 0,19	98,64 ± 0,08	97,96 ± 0,2**

* $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой, ** $p < 0,01$.

Таблица 2

Структурно-функциональные показатели сердца у больных сахарным диабетом 2 типа с различной длительностью заболевания и в контрольной группе

Показатель	Контроль n = 36	Группа А n = 24	Группа Б n = 57	Группа В n = 24
ЛП, см	3,4 ± 0,02	3,7 ± 0,06	3,7 ± 0,04*	3,85 ± 0,09*
ТМП, см	0,9 ± 0,01	1,03 ± 0,04	1,12 ± 0,02**	1,27 ± 0,07**
ТЗС, см	0,9 ± 0,01	0,99 ± 0,02	1,01 ± 0,06	1,04 ± 0,02
ТМП/ТЗС	0,9 ± 0,01	1,03 ± 0,02	1,09 ± 0,1	1,2 ± 0,06**
КДР, см	5,0 ± 0,05	4,8 ± 0,08	4,8 ± 0,06	4,85 ± 0,11
КСР, см	3,5 ± 0,02	2,9 ± 0,08**	3,0 ± 0,06**	3,2 ± 0,09**
КДО, мл	120,5 ± 3,0	110,8 ± 3,7	109,6 ± 3,1	114,2 ± 5,6
КСО, мл	46,2 ± 2,0	35,9 ± 2,3*	37,1 ± 1,8	42,5 ± 2,4
ММЛЖ, г	155,0 ± 5,0	171,9 ± 9,1*	182,9 ± 6,2**	203,7 ± 11,7**
ИММЛЖ, г/м ²	87,6 ± 2,9	88,4 ± 4,6	93,7 ± 4,8*	107,1 ± 5,2**
ISF, %	33,7 ± 0,9	38,5 ± 1,34*	36,2 ± 0,85	34,2 ± 1,06
ФВ, %	62,0 ± 1,2	68,3 ± 1,5*	65,4 ± 0,9	63,8 ± 1,3
VCF, с ⁻¹	1,01 ± 0,01	1,12 ± 0,1	1,12 ± 0,04	1,16 ± 0,05
ОТС, см	0,36 ± 0,005	0,420 ± 0,01	0,45 ± 0,007*	0,478 ± 0,02**
ИОМ, мл/г	0,786 ± 0,01	0,686 ± 0,03**	0,621 ± 0,01**	0,572 ± 0,01**
ПП, см	3,2 ± 0,02	3,4 ± 0,04**	3,4 ± 0,05**	3,6 ± 0,07**
ПЗРПЖ, см	1,9 ± 0,02	2,25 ± 0,09**	2,3 ± 0,04**	2,3 ± 0,07**
ТППЖ, см	0,3 ± 0,007	0,54 ± 0,02**	0,57 ± 0,009**	0,58 ± 0,02**
IVRT, у.е.	0,07 ± 0,002	0,11 ± 0,007*	0,11 ± 0,004*	0,12 ± 0,006*
DT, с	0,18 ± 0,001	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,06	0,17 ± 0,01
Пик Е, м/с	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,02*	0,6 ± 0,03*
Пик А, м/с	0,45 ± 0,09	0,7 ± 0,07*	0,5 ± 0,02*	0,6 ± 0,03*
Е/А, у.е	1,56 ± 0,01	1,06 ± 0,09*	1,17 ± 0,06*	1,0 ± 0,08*

* – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой, ** – $p < 0,01$.

функциональных показателей сердца: снижение КСР (при $p = 0,002$), КСО (при $p = 0,03$), ИОМ (при $p = 0,001$) и отношения Е/А (при $p = 0,04$), увеличение ISF (при $p = 0,03$), ФВ (при $p = 0,02$), ПП (при $p = 0,0001$), ПЗРПЖ (при $p = 0,00021$), ТППЖ (при $p = 0,00013$), пика А (при $p = 0,025$) и IVRT (при $p = 0,045$), а также тенденция к увеличению ММЛЖ, ОТС, ЛП, VCF и к снижению DT, КДР, КДО. Таким образом, в данной группе больных сахарным диабетом обнаружены признаки изменения всех показателей правых отделов сердца, повышения систолической функции, признаки диастолической дисфункции ЛЖ и тенденция к увеличению толщины стенок ЛЖ.

В группе Б, в отличие от группы А, появляется достоверное отличие от контрольной группы ЛП (при $p = 0,04$), ТМПЛЖ (при $p = 0,0001$), ММЛЖ (при $p = 0,0001$), ОТС (при $p = 0,03$), пика Е (при $p = 0,025$). Также выявляется тенденция к увеличению ТЗСЛЖ, ТМП/ЗС, ПЗРПЖ, ТППЖ, DT, отношения Е/А, КСР, КСО и к уменьшению пика А, ИОМ, ФВ, ISF по сравнению с группой А. Таким образом, в группе Б появляются достоверные признаки нарастания массы, ремоделирования левых отделов сердца и диастолической дисфункции левого желудочка.

В группе В, в отличие от группы А и Б, появляется достоверное отличие ТМП/ЗС по сравнению с контрольной группой и выявляется тенденция к увеличению ЛП, ТМПЛЖ, ММЛЖ, ОТС, ПП, ТППЖ, IVRT, пика А, VCF, КДО, КСО, КСР, ТЗСЛЖ, а также к снижению ИОМ, отношения Е/А, ФВ, ISF. Это означает, что в данной группе больных СД 2 типа продолжается нарастание массы миокарда обоих желудочков, увеличение размеров предсердий, усугубляется диастолическая дисфункция. Кроме того, появляется тенденция к увеличению объема ЛЖ и снижению систолической функции ЛЖ.

Таким образом, при рассмотрении особенностей поражения сердца при сахарном диабете 2 типа в зависимости от длительности заболевания, отмечено, что уже на этапе манифестации диабета выявляются достоверные изменения структурно-функциональных показателей сердца. Первоначально изменениям подвергаются правые отделы сердца и затем к ним присоединяются изменения со стороны левых его отделов. С увеличением же длительности сахарного диабета 2 типа изменения структурно-функциональных показателей сердца имеют прогрессирующий характер.

Для оценки возможной взаимосвязи структурно-функциональных показателей сердца и параметров функции почек был проведен корреляционный анализ этих показателей в группах больных СД 2 типа с различной длительностью заболевания.

Корреляционный анализ в группе А показал, что в прямой зависимости находятся креатинин крови и ТППЖ ($r = 0,59$), отношение Е/А ($r = 0,61$), пик Е ($r = 0,41$), ОТС ($r = 0,43$), ТМП ($r = 0,40$), суточная протеинурия и VCF ($r = 0,75$), ISF ($r = 0,40$), ТППЖ ($r = 0,40$), КДО ($r = 0,51$), КДР ($r = 0,41$), скорость клубочковой фльтрации и ИОМ ($r = 0,41$), канальцевая реабсорбция и IVRT ($r = 0,44$), ИОМ ($r = 0,43$), а в обратной – креатинин крови и пик А ($r = -0,60$), ИОМ ($r = -0,43$), скорость клубочковой фльтрации и ТППЖ ($r = -0,53$), VCF ($r = -0,41$), канальцевая реабсорбция и ТМП ($r = -0,42$), ТМП/ТЗС ($r = -0,54$), ОТС ($r = -0,53$), ПП ($r = -0,41$).

В группе Б взаимосвязь между показателями функции почек и структурно-функциональными показателями сердца несколько уменьшается. При этом креатинин крови находился в обратной зависимости от ISF ($r = -0,42$), ФВ ($r = -0,41$), скорость клубочковой фльтрации – от пика А ($r = -0,49$), канальцевая реабсорбция – от ИОМ ($r = -0,49$), а в прямой – креатинин крови и ЛП ($r = 0,40$), КСО ($r = 0,43$), КСР ($r = 0,43$), скорость клубочковой фльтрации и отношение Е/А ($r = 0,43$), VCF ($r = 0,41$), канальцевая реабсорбция и ОТС ($r = 0,40$). Корреляционных связей между суточной протеинурией и структурно-функциональными показателями сердца не обнаружено.

В группе В вновь наблюдается нарастание корреляционных связей между структурно-функциональными нарушениями сердца и показателями функции почек. Так, в этой группе больных креатинин крови находился в прямой зависимости от VCF ($r = 0,45$), ISF ($r = 0,45$), ФВ ($r = 0,40$), ПЗРПЖ ($r = 0,40$), суточная протеинурия – от ПП ($r = 0,52$), пика А ($r = 0,61$), ЛП ($r = 0,41$), ММЛЖ ($r = 0,41$), а канальцевая реабсорбция – от КСР ($r = 0,47$), КСО ($r = 0,47$), пика Е ($r = 0,40$), ТМП ($r = 0,40$). В противоположность этому суточная протеинурия находилась в обратной зависимости от отношения Е/А ($r = -0,53$), пика Е ($r = -0,45$), канальцевая реабсорбция – от ФВ ($r = -0,53$), ISF ($r = -0,50$), ОТС ($r = -0,40$), ТМП/ЗС ($r = -0,40$), ДТ ($r = -0,41$), IVRT ($r = -0,41$), скорость клубочковой фльтрации и ФВ ($r = -0,43$), ТППЖ ($r = -0,41$).

Обсуждение результатов

Результаты проведенного исследования показали, что нарушение функции почек и структурно-функциональные изменения сердца выявляются уже у больных с впервые выявленным СД 2 типа. Эти данные позволяют предположить, что патологические изменения в почках и сердце возникают еще до ма-

нифестации СД 2 типа и обусловлены общими факторами риска и прогрессирования сердечной и почечной патологии. Одним из таких факторов, вероятно, является метаболический синдром, существующий длительное время до клинического выявления сахарного диабета. С увеличением же длительности СД 2 типа структурно-функциональные изменения как сердца, так и почек прогрессируют с наибольшим проявлением при длительности заболевания более десяти лет. Поддерживание и прогрессирование почечной и кардиальной патологии с увеличением длительности заболевания, вероятно, обусловлено как влиянием тяжести самого заболевания, так и кардиоренальными взаимодействиями, через единые гормональные системы [4, 13, 15].

Подтверждением наличия взаимосвязей между показателями функции почек и структурно-функциональными показателями сердца, характерных для СД 2 типа, являются результаты корреляционного анализа. Так, корреляционные связи имеются уже на этапе манифестации сахарного диабета, что свидетельствует о наличии общих факторов риска и прогрессирования кардиоренальной патологии. Сокращение корреляционных связей между показателями функции почек и структурно-функциональными показателями сердца в группе больных СД 2 типа с длительностью заболевания до десяти лет можно объяснить относительной стабилизацией обменных процессов на фоне адекватной противодиабетической терапии, оказывающих выраженное влияние на функциональное состояние сердца и почек. В тоже время прогрессирование структурно-функциональных изменений сердца и почек на фоне снижения корреляционных связей между ними, в данной группе больных, может быть подтверждением многофакторного генеза кардиоренальной патологии. При увеличении же длительности заболевания более десяти лет характерно вновь нарастание корреляционных связей между показателями функции почек и структурно-функциональными показателями сердца, что свидетельствует о накоплении патологических изменений по мере прогрессирования СД 2 типа с формированием выраженных изменений в структуре и функции, как почек, так и сердца.

Таким образом, подводя итог проведенному исследованию, можно сделать следующие выводы:

1. У больных СД 2 типа изменения функции почек, а также структурно-функциональные изменения сердца имеются уже на этапе манифестации с тенденцией к прогрессированию с увеличением длительности заболевания.
2. Для больных СД 2 типа характерно наличие достоверных корреляционных связей между показателями функции почек и структурно-функциональными показателями сердца.
3. Наиболее выраженная взаимосвязь между патологическими изменениями функции почек и струк-

турно-функциональными изменениями миокарда типична для больных с впервые выявленным СД 2 типа и при длительности заболевания больше десяти лет, в то время как с длительностью заболевания до десяти лет корреляционные связи между показателями функции почек и структурно-функциональными изменениями миокарда сокращаются.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дедов И.И., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия. М: Универсум Паблишинг; 2000.
2. Дядык А.И., Багрий А.Э., Лебедь И.А., Яровая Н.Ф., Щукина Е.В., Черний В.В. Гипертрофия левого желудочка сердца у больных с хронической почечной недостаточностью. Кардиология. 1997; 2: 76–82.
3. Кузьмин О.Б., Пугаева М.О. Дисфункция почки при хронической сердечной недостаточности: теоретические и клинические аспекты. Нефрология. 2003; 2 (7): 31–7.
4. Мухин Н.А., Моисеев В.С., Кобалова Ж.Д., Фомин В.В. Кардиоренальные взаимодействия: клиническое значение и роль в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы и почек. Тер. архив. 2004; 6 (76): 12 – 5.
5. Хирманов В.Н. Факторы риска микроальбуминурии. Тер. архив. 2004; 9: 35 – 7.
6. Шамхалова М.Ш., Чугунова Л.А., Шестакова М.В. Особенности клинической картины, лечения диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 2 типа. Сахарный диабет. 1999; 3: 5 – 10.
7. Шестакова М.В., Дирочка Ю.А., Шамхалова М.Ш., Дедов И.И. Факторы риска быстрого развития почечной недостаточности у больных с диабетической нефропатией. Тер. архив. 1999; 6: 38 – 41.
8. Шестакова М.В., Сунцов Ю.И., Дедов И.И. Диабетическая нефропатия: состояние проблемы в мире и в России. Сахарный диабет. 2000; 2: 21 – 6.
9. Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия. Сахарный диабет. 1999; 2: 24 – 8.
10. Шугушев Х.Х., Хамизова М.М., Василенко В.М., Шугушев З.Х. Изменения сердечно-сосудистой системы у больных с хронической почечной недостаточностью. Кардиология. 2003; 3: 75 – 9.
11. Devereux R.B., Alonso D.R., Lutas E.M. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. Am. J. Cardiol. 1986; 57: 450 – 8.
12. Brenner B.M., Cooper M.E., De Zeeuw D. et al. Effect of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. N. Engl. J. Med. 2001; 345: 861 – 9.
13. Hillege H.L., Girbes A.R.J., de Kam J. et al. Renal function, neurohormonal and survival in patients with chronic heart failure. Circulation 2000; 2 (102): 203 – 10.

14. Ljungman S., Laragh J.H., Cody R.J. Role of the kidney in congestive heart failure. Relationship of cardiac index to kidney function. Drugs. 1990; 4 (39): 10 – 20.

15. Wolf G. Angiotensin II: a pivotal factor in the progression of renal disease. Nephrol. Dial. Transplant. 1999; 14 (suppl. 1): 42 – 4.

A.A. Kurindin¹, P.A. Sarapultsev²
**INFLUENCE DURATION OF TYPE
2 DIABETES ON RELATIONSHIP
BETWEEN RENAL DYSFUNCTION
AND STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
ABNORMALITIES OF HEART**

¹ Ural State Medical Academy,

² Institute of Immunology and Physiology RAS

The purpose of our study was to evaluate the type and intensity of association between renal abnormalities and structural and functional parameters of heart in various duration of Type diabetes mellitus.

We examined 105 patients with Type 2 diabetes aged $48,5 \pm 0,5$ (mean \pm SD) with diabetes duration of $6,7 \pm 0,7$ years (mean \pm SD) without any previous renal diseases (chronic pyelonephritis, chronic glomerulonephritis, urolithiasis, ect.) and cardiovascular pathology previous to a diabetes. All patients were divided into the 3 groups comparable with regard to age, compensation of diabetes with different duration of disease. All the patients with Type 2 diabetes had an estimation of: creatinine level, diurnal proteinuria, tubular reabsorption and glomerular filtration rate. Echocardiography of heart were performed.

Patient with Type 2 diabetes have the structural and functional abnormality of heart and renal dysfunction which appeared at the stage of manifestation of diabetes mellitus. In case of duration of diabetes mellitus more than a decade renal pathology and structural and functional abnormality of heart grows with maximum evidence. In the performance of the correlation analysis under long duration and stage of manifestation of Type 2 diabetes there is a clear relationship between structural and functional parameters of heart and renal function measures.

Key words: diabetes mellitus, echocardiography, cardiorenal interactions, diabetic nephropathy, cardiovascular diseases.

Г.В. Парфенова

ЭНДОКРИННО-ИММУННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У БОЛЬНЫХ С ЭКТОПИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ В СОЧЕТАНИИ С ХРОНИЧЕСКИМ ЦЕРВИЦИТОМ НА ФОНЕ ГЕПАТИТА В И С

Уральская государственная медицинская академия, г. Екатеринбург

Диагностика и лечение эктопии шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом до настоящего времени – актуальная проблема современного акушерства и гинекологии, что обусловлено высокой частотой патологии шейки матки, в том числе, злокачественных заболеваний [2, 3, 5]. Отмечено, что при отсутствии комплексного лечения эктопии шейки матки имеют рецидивирующее течение, особенно у молодых женщин, что приводит к раку шейки матки.

До настоящего времени в литературе нет единой точки зрения о роли гормонального фактора в генезе эктопии шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом. Так, одни авторы не выявили изменений со стороны эндокринной системы у таких больных, другие отметили изменения [1, 6, 7]. Со стороны иммунной системы у больных эктопией шейки матки также имеются противоречивые данные. Так, одни исследователи не нашли различий в состоянии гуморального иммунитета у здоровых и больных эктопией шейки матки, а другие отметили напряженность гуморального и снижение местного иммунитета [6, 7].

С современных позиций шейка матки является органом-мишенью, принимающим участие в регуляции полового цикла у женщин. Заболевания шейки матки, несомненно, связаны с патологией эндокринной и иммунной систем, а также состоянием функции печени у таких больных. Поэтому изучение состояния гормонального и иммунного статуса у больных эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом на фоне гепатитов В и С представляет теоретический и практический интерес.

Цель исследования

Изучение состояния гормонального и иммунного статуса у больных эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом на фоне гепатитов В и С.

Материалы и методы исследования

В соответствии с поставленными задачами комплексно обследовано 180 женщин с ЭШМ в сочетании с ХЦ в возрасте от 18 до 41 года, причем 100 из них состояли на учете в гепатитном центре на базе

городской клинической больницы № 40 г. Екатеринбурга после перенесенного гепатита В и С. Лечение гепатита было проведено в специализированном гепатологическом отделении клиники инфекционных болезней Уральской государственной медицинской академии.

Всех обследованных больных мы разделили на три группы:

I группа: больные с эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом без гепатита (ЭШМ+ХЦ БГ) – 80 женщин.

II группа: больные с эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом на фоне гепатита В (ЭШМ+ХЦ ГВ) – 55 женщин.

III группа: больные с эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом на фоне гепатита С (ЭШМ+ХЦ ГС) – 45 женщин.

Контрольную группу составили 30 здоровых женщин того же возраста без заболеваний печени и ЭШМ.

Распределение больных трех групп по возрасту представлено в таблице 1.

Из таблицы видно, что во всех трех группах эктопии шейки матки встречались у молодых женщин. Это указывает на социальную значимость проблемы ЭШМ.

Распределение больных по социальному статусу показало, что наибольшее число из обследованных с ЭШМ приходилось на неработающих, учащихся и студентов.

Средний возраст начала менархе у больных ЭШМ составил в первой группе – $12,5 \pm 0,14$, во второй – $12,75 \pm 0,13$, в третьей – $12,8 \pm 0,14$ лет. Средняя продолжительность менструального цикла составила у больных первой группы – $27,7 \pm 0,48$, второй – $27,6 \pm 0,3$, третьей – $26,7 \pm 0,3$ дней. Нарушения менструального цикла отмечены у 13 (16%) больных в первой группе, у 12 (22%) – во второй группе и у 9 (20%) – в третьей. Следует отметить, что литературные данные и наши наблюдения свидетельствуют о своевременном начале менархе у больных.

При анализе репродуктивной функции отмечено снижение количества беременностей и родов во второй и третьей группах в сравнении с первой. Также высок процент родового травматизма шейки матки в этих группах. Определенного внимания заслуживают послеродовые воспалительные

Распределение больных по возрасту

Возраст больных	1 группа, n=80		2 группа, n=55		3 группа, n=45		Контрольная группа, n=30	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Здоровые	%
До 20 лет	21	26%	19	35%	18	40%	7	23%
20–25 лет	25	31%	21	37%	15	33%	18	60%
26–31 лет	22	28%	7	13%	8	18%	3	10%
32–37 лет	9	11%	8	15%	4	9%	2	7%
Старше 37 лет	3	4%	0	0%	0	0%	0	0%

заболевания, которые встречались чаще во второй и третьей группах. Несомненно, это указывает на наличие инфекции половой системы в этих группах больных. Самопроизвольные аборты отмечены нами у каждой третьей больной во второй группе и каждой четвертой – в третьей.

Всем пациенткам проводилась прицельная биопсия шейки матки под контролем кольпоскопии с предварительным диагностическим выскабливанием цервикального канала. Для приготовления серийно-ступенчатых срезов был использован материал, полученный при биопсии. Результаты гистоморфологического исследования оценивались по классификации Яковлевой И.А., Кукутэ Б.Г. [1977], в соответствии с которой среди эндоцервикозов различают стационарный, пролиферирующий и эпидермизирующий

Из лабораторных методов исследования гипофизарно-яичниковой системы использовалось определение в сыворотке крови гонадотропных (ФСГ, ЛГ, пролактин) и периферических (эстрадиол, прогестерон, тестостерон) гормонов. Определение экскреции гормонов в крови проводилось радиоиммунологическим методом в динамике менструального цикла: в фолликулярную фазу (6–8 дни), перiovуляторный период (12–16 дни), лютеиновую фазу (19–22 дни) с помощью стандартных наборов фирм Malinkrodt Diag (Германия), Sea и других.

Для установления этиологического диагноза ХВГ, а также оценки фазы вирусного процесса (репликация, интеграция) проводилось выявление маркеров HBV и HCV методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем третьего поколения

Концентрацию сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, J устанавливали методом одномерной радиальной иммунодиффузии в агаровом геле, Т- и В-лимфоциты определялись методом спонтанного розетко-образования, результаты выражены в процентах и абсолютных числах. Для оценки состояния местного иммунитета определяли уровни секреторного JgA и лизоцима слюнной слизи 2-кратно в I и II фазы цикла.

Результаты исследования и их обсуждение

Средние показатели кариопиктоического индекса (КПИ) во всех группах больных достоверно отлича-

лись от показателей здоровых женщин и были у больных без гепатита сниженными, а с гепатитами В и С – повышенными ($p < 0,05$).

Изучение динамики экскреции гонадотропных и половых гормонов в фолликулярную, лютеиновую фазу и перiovуляторный период позволило идентифицировать гормональный профиль больных с эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом. Анализ содержания гормонов в сыворотке крови у больных 1 группы также показал различные их колебания. Так, содержание ПРЛ в сыворотке крови у больных 1 группы в динамике цикла было достоверно выше ($p < 0,05$), чем у здоровых женщин. Содержание прогестерона в сыворотке крови в фолликулиновую фазу было выше ($p < 0,05$), чем у здоровых женщин. Повышенное содержание ФСГ достоверно ($P < 0,05$) отмечено во все фазы цикла у больных 2 группы с ГВ. Достоверных различий в содержании ЛГ и ПРЛ в динамике нами не выявлено ($P > 0,05$). Хотя отмечена тенденция к повышению продукции этих гормонов в сравнении со здоровыми женщинами. Содержание эстрадиола в фолликулиновую и перiovуляторную фазу было достоверно повышенным в сравнении с группой здоровых. Содержание прогестерона в сыворотке крови было повышенным ($p < 0,001$) в фолликулиновую фазу. Экскреция тестостерона в этой группе больных имела тенденцию к снижению, хотя оно не было достоверным ($p > 0,05$). В третьей группе больных отмечено повышение содержания ФСГ в сыворотке крови в динамике цикла, хотя достоверно ($p < 0,05$) нами отмечено повышение только в фолликулиновую и лютеиновую фазы. Содержание эстрадиола в сыворотке крови в динамике цикла в этой группе больных было достоверно ($p < 0,05-0,01$) выше, чем у здоровых. Содержание в сыворотке крови ЛГ, ПРЛ, тестостерона не имело видимых различий у больных и здоровых ($p > 0,05$).

Показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных с ЭШМ во всех группах были подвержены определенным изменениям. Так, показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных были достоверно повышенными во второй и третьей группах ($p < 0,05$).

Содержание иммуноглобулинов в сыворотке

крови у больных 2 и 3 групп было выше ($p < 0,05$), чем в 1 группе.

Отмеченное нами повышение JgM у больных 2 и 3 групп в сравнении с 1 группой больных можно объяснить различной интенсивностью антигенного раздражения организма и естественной компенсаторной реакцией. Результаты наших исследований соответствуют данным литературы о том, что JgM наиболее быстро реагирует на внедрение микроорганизмов и течение воспалительного процесса.

По мере действия микробного фактора (антигенного раздражителя и стадии воспалительного процесса в нижних отделах полового тракта) нами отмечено достоверное увеличение JgG у больных 2 и 3 групп в сравнении с 1 группой ($p < 0,05$), что подтверждено нами при изучении характера микрофлоры половых путей у больных. Так, у больных 2 и 3 групп доминировала патогенная микрофлора. Смешанная инфекция отмечалась у каждой второй больной.

Для оценки состояния местного иммунитета определяли уровни секреторного JgA и лизоцима шеечной слизи. Исследования проводили у больных и здоровых в фолликулиновую и лютеиновую фазы цикла. Во всех группах больных содержание JgA и лизоцима в цервикальной слизи было достоверно ниже, чем у здоровых женщин в динамике цикла ($p < 0,05$).

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о гиперэстрогенизме у больных с гепатитами С и В и некотором снижении эстрогенов у больных без гепатитов. В содержании других гормонов не было выявлено статистически достоверных изменений. Следовательно, у больных ЭШМ+ХЦ, как при заболеваниях печени, так и без них, отмечаются нарушения в продукции гормонов на разных уровнях, что необходимо учитывать при лечении таких больных.

Исследование клеточного и гуморального иммунитета у больных эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом показало определенную напряженность его в разных группах больных. Так, у больных 2 и 3 групп отмечена повышенная продукция Т- и β -лимфоцитов в сравнении с другими группами, что указывает на активацию клеточного звена иммунитета у них. В 1 группе больных нами отмечено снижение показателей клеточного иммунитета, что свидетельствует о понижении иммунологической реактивности организма и несостоятельности защитных механизмов.

Результаты наших исследований свидетельствуют о необходимости изучения гормонально-иммунных изменений у больных эктопией шейки матки в сочетании с хроническим цервицитом на фоне гепатитов В и С и в комплекс лечения включать корригирующую терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абакарова П.Р. Патология шейки матки при урогенитальном хламидиозе. Клиника, диагностика, лечение / П.Р. Абакарова, А.В. Ледина // Патология шейки матки. Генитальные инфекции (специализированный журнал). – 2004. – №1. – С. 50–57.
2. Казачкова Э.А. Этиология, патогенетические аспекты, оптимизация диагностики и терапии хронических цервицитов / Э.А. Казачкова, Е.Л. Казачков, Б.И. Медведев // Материалы VI Российского форума «Мать и дитя»: тез. докл. – М., 2004. – С. 367–368.
3. Прилепская В.Н. Морфофункциональные особенности шейки матки у женщин, применяющих гормональную контрацепцию / В.Н. Прилепская, Н.И. Кондриков, Н.М. Назарова // Акушерство и гинекология. – 1991. – №12. – С. 6–10.
4. Прилепская В.Н. Новое в диагностике и лечении заболеваний, передающихся половым путем / В.Н. Прилепская, Л.А. Устюжанина. – М., 1997. – С. 191–192.
5. Прилепская В.Н. Эктопии и эрозии шейки матки / В.Н. Прилепская, Е.Б. Рудакова, А.В. Кононов. – М., 2002. – 175с.
6. Скурятина Н.Г. Особенности эндокринного статуса молодых нерожавших женщин с заболеваниями шейки матки / Н.Г. Скурятина, Е.П. Гнатко // Материалы VI Российского форума «Мать и дитя»: тез. докл. – М., 2004. – С. 485–486.
7. Цуцор В.В. Оптимизация диагностических и лечебных мероприятий в отношении «контингента риска» с фоновыми заболеваниями шейки матки: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.01: защищена 10.10.00: утв. 25.12.00 / Цуцор Вера Вячеславовна. – Омск, 2000. – 17с.

G.V. Parphenova

ENDOCRINE-IMMUNE CHANGES THAT HAS PATIENTS WITH CERVIX OF THE UTERUS ECTOPIA IN COMBINATION WITH CHRONIC CERVICIT AGAINST A BACKGROUND OF B AND C HEPATITIS

Object: the investigation of hormone and immune status of patients with cervix of the uterus' ectopia in combination with chronic cervicit against a background of B and C hepatitis. 180 patients with CUE + CC where completely examined, including 80 (CUE without hepatitis) in the 1st group, 55 (CUE + BH) in the 2nd group and 45 (CUE CH) in the 3rd one. In all the groups of patients examined the changes in hormone-immune status where noted. It must be taken into account when treating such kind of patients.

Key words: cervix of the uterus' ectopia, chronic cervicit, hormone and immune status.

Г.В. Парфенова, В.И. Коновалов, В.Б. Цуцор
**ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ФОНОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
 ШЕЙКИ МАТКИ У БОЛЬНЫХ ГЕПАТИТАМИ В И С**

Уральская государственная медицинская академия, г.Екатеринбург

Фоновые заболевания шейки матки до настоящего времени – актуальная проблема современного акушерства и гинекологии. По данным литературы, [Кулавский В.А., 2003, 2004; Прилепская В.Н., Костава М.Н., 2006; Рудакова Е.Б. и др., 2004] эктопия шейки матки встречается у 38,8% женского населения и у 54,2% гинекологических больных; в 54,2% случаев эктопия выявляется в группе молодых женщин до 25 лет.

В литературе и сегодня много вопросов по этиологии, патогенезу и лечению фоновых заболеваний шейки матки. Особый интерес представляет проблема сочетания фоновых заболеваний шейки матки и вирусных гепатитов В и С у молодых женщин.

Изучение характера течения фоновых заболеваний шейки матки у больных, перенесших гепатиты В и С, представляет теоретический и практический интерес.

Цель исследования

Цель нашей работы: дать анализ течения фоновых заболеваний шейки матки у больных, перенесших гепатиты В и С.

Материалы и методы исследования

В соответствии с поставленными задачами комплексно обследовано 180 женщин с ФЗШМ от 18 до 41 года, причем 100 из них состояли на учете в гепатитном центре на базе городской клинической больницы № 40 г. Екатеринбурга после перенесенного гепатита В и С. Лечение гепатита было проведено в специализированном гепатологическом отделении клиники инфекционных болезней Уральской государственной медицинской академии.

Всех обследованных больных мы разделили на три группы:

I группа: больные с фоновыми заболеваниями шейки матки без гепатита (ФЗШМ БГ) – 80 женщин.

II группа: больные с фоновыми заболеваниями шейки матки на фоне гепатита В (ФЗШМ ГВ) – 55 женщин.

III группа: больные с фоновыми заболеваниями шейки матки на фоне гепатита С (ФЗШМ ГС) – 45 женщин.

Контрольную группу составили 30 здоровых женщин того же возраста без заболеваний печени и ФЗШМ.

Указанные группы больных ФЗШМ нами были выделены с учетом анамнеза, данных объективного исследования, клинических проявлений заболевания, гинекологического осмотра, кольпоскопических исследований.

Распределение больных трех групп по возрасту представлено в таблице 1.

Из рисунка видно, что во всех трех группах фоновые заболевания шейки матки встречались у молодых женщин. Это указывает на социальную значимость проблемы ФЗШМ.

Распределение больных по социальному статусу показало, что наибольшее число из обследованных с ФЗШМ приходилось на неработающих, учащихся и студентов.

Средний возраст начала менархе у больных ФЗШМ составил в первой группе – $12,5 \pm 0,14$, во второй – $12,75 \pm 0,13$, в третьей – $12,8 \pm 0,14$ лет. Средняя продолжительность менструального цикла составила у больных первой группы – $27,7 \pm 0,48$, второй – $27,6 \pm 0,3$, третьей – $26,7 \pm 0,3$ дней. Нарушения менструального цикла отмечены у 13 (16%) больных в первой группе, у 12 (22%) – во второй группе и у 9 (20%) – в третьей. Следует отметить, что литературные данные и наши наблюдения свидетельствуют о своевременном начале менархе у больных.

Таблица 1

Распределение больных по возрасту

Возраст больных	1 группа, n=80		2 группа, n=55		3 группа, n=45		Контрольная группа, n=30	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
До 20 лет	21	26%	19	35%	18	40%	7	23%
20–25 лет	25	31%	21	37%	15	33%	18	60%
26–31 лет	22	28%	7	13%	8	18%	3	10%
32–37 лет	9	11%	8	15%	4	9%	2	7%
Старше 37 лет	3	4%	0	0%	0	0%	0	0%

Результаты кольпоскопического обследования больных ФЗШМ (по классификации ВОЗ, 1992 г.)

Группы	1 группа, n=80		2 группа, n=55		3 группа, n=45	
	N	%	N	%	N	%
Эрозия шейки матки	28	35	11	21	5	11
Эндоцервицит с эрозией	18	23	5	9	4	9
Цервицит и эндоцервицит	9	11	20	36	14	31
Эндометриоз шейки матки	6	7	4	7	5	11
Эрозия и эктропион шейки матки	16	20	3	5	4	9
Полип шейки матки	3	4	12	22	13	29

При анализе репродуктивной функции отмечено снижение количества беременностей и родов во второй и третьей группах в сравнении с первой. Также высок процент родового травматизма шейки матки в этих группах. Определенного внимания заслуживают послеродовые воспалительные заболевания, которые встречались чаще во второй и третьей группах. Несомненно, это указывает на наличие инфекции половой системы в этих группах больных. Самопроизвольные аборт отмечены нами у каждой третьей больной во второй группе и каждой четвертой – в третьей.

Таким образом, анализируя характер репродуктивной функции у больных ФЗШМ, следует отметить разный характер их нарушений в исследуемых группах, что подтверждает данные многих исследователей [1,4].

Все больные обследовались на инфекцию половой системы методом ПЦР в Уральском НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии.

Для установления этиологического диагноза ХВГ, а также оценки фазы вирусного процесса (репликация, интеграция) проводилось выявление маркеров HBV и HCV методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем третьего поколения.

Эхоэмиотические признаки поражения печени изучались методом ультразвукографии брюшной полости на аппарате «Аloka» – SSD630 (Япония).

Статистическая обработка материала проводилась на компьютере с помощью лицензированных программных систем «Stadia 4.5», «Qvuttro Pro 5.0», «Works 2.0». Вычислялись основные статистические показатели ($M \pm m$). Проводился корреляционный анализ полученных данных, вычислялись коэффициенты парной линейной корреляции.

Результаты и обсуждение

Обследование 180 больных фоновыми заболеваниями шейки матки проводилось по схеме разработанного нами диагностического алгоритма.

Результаты кольпоскопических исследований больных фоновыми заболеваниями шейки матки представлены в таблице 1. Как видно из таблицы, эрозия разных размеров и формы диагностирована у 28 (35%) женщин в первой, у 11 (21%) – во второй и у 5 (11%) – в третьей группах больных. Она характеризовалась участками ярко-красного цвета, состоящими из сосочков. Эти участки располагались преимущественно вокруг наружного зева и имели четкие контуры. Эндоцервицит с эрозией обнаружен у 18 (23%) женщин в первой, у 5 (9%) – во второй и у 4 (9%) – в третьей группах больных.

Воспалительные процессы в шейке матки, цервицит и эндоцервицит мы обнаружили у 9 (11%) в первой, у 20 (36%) – во второй и у 14 (31%) – в третьей группах.

Эрозия шейки матки и эктропион обнаружен на-

ми у 16 (20%) больных в первой группе, у 3 (5%) – во второй и у 4 (9%) – в третьей.

Эндометриоз шейки матки выявлен нами у 6 женщин (7%) в первой группе, у 4 (7%) женщин во второй и у 5 (11%) – в третьей группах. Для эндометриоза шейки матки специфическими гистологическими особенностями являются поверхностное расположение очагов эндометриоза, отсутствие тенденции к прорастанию, расширение и кровенаполнение цитогенной стромы капиллярами, проникновение их эритроцитами.

Полипы шейки матки мы обнаружили у 3 (4%) больных в первой, у 12 (22%) – во второй и у 13 (29%) – в третьей группах. Полипами называют любые разрастания в шейке матки, висющие на ножке.

Анализируя результаты кольпоскопических данных у обследованных больных с ФЗШМ, следует отметить разнообразие их вариантов и разную встречаемость в группах. Так, чаще, чем у каждой второй больной во второй и третьей группах больных, встречались цервициты, эндоцервициты и полипы шейки матки.

При изучении характера микрофлоры во 2 и 3 группах больных доминировала патогенная флора в сочетании с гонорейно-трихомонадной инфекцией и грибами рода *Candida*. Причем в этих же группах больных преобладала урогенитальная инфекция. Так, во 2 группе хламидийная и уреоплазменная инфекции обнаружены почти у каждой третьей больной. Обращает внимание частота встречаемости вирусной инфекции. Так, цитомегаловирус выявлен у 7 (13%) больных, ВПГ2 – у 5 (9%), папилломавирус – у 6 (11%) больных. В 3 группе больных хламидии выявлены у каждой третьей больной, уреоплазмоз – у каждой четвертой больной. Вирус ВПГ2 обнаружен у 4-х (9%) больных, ЦМВ – у 9 (20%), папилломавирус – у 5 (11%). В этих же группах доминировала смешанная инфекция почти у каждой второй больной. Условно-патогенная флора встречалась редко. В 1 группе больных доминировала условно-патогенная микрофлора, хотя частично отмечена и патогенная. Так, гонококк у 4-х (5%), трихомонада – у 8 (10%), хламидиоз – у 8 (10%), уреоплазма – у 6 (8%), микоплазма – у 5 (6%), ВПГ2 – у 2 (3%). Обращает

Результаты исследования основных ультразвуковых параметров печени у больных

Показатели	Здоровые женщины	I группа	II группа	III группа
Длина правой доли печени (см)	12,9±0,15	14,4±0,24*	17,5±0,44*	18,3±0,35*
Толщина правой доли печени (см)	10,4±0,17	12,5±0,26*	16,1±0,28*	16,5±0,23*
Диаметр воротной вены (мм)	1,1±0,65	1,3±0,78	1,3±0,65	1,3±0,54
Диаметр селезеночной вены (см)	4,8±0,38	5,2±0,16	6,2±0,14*	6,3±0,18*
Продольный размер селезенки (см)	9,4±0,08	10,5±0,12*	11,4±0,19*	12,4±0,24*
Поперечный размер селезенки (см)	4,2±0,07	4,5±0,09*	4,9±0,16*	5,1±0,12*

Примечание. Наличие достоверных различий с контрольной группой: * $p < 0,05$.

внимание низкий процент смешанной инфекции всего у 7 (9%) больных и отсутствие микрофлоры почти у каждой четвертой больной. Несомненно, анализируя характер инфекции во всех группах больных, можно констатировать, что имеет значение степень резистентности и вирулентности микроорганизма и состояние иммунобиологической реактивности макроорганизма. Существенным является факт смешанной инфекции у больных 2 и 3 групп. Мы выявили, что сочетание 3-х и 4-х инфекций отмечено лишь во 2 и 3 группах больных. В этих группах больных, видимо, существует высокий симбиоз микробов.

Полученные нами данные исследования функции печени у больных 1, 2 и 3 групп свидетельствуют о патологических признаках нарушения функции печени во всех группах. Отмечены нами нарушения липидного, пигментного, ферментного обмена, антитоксической функции печени, изменение осадочных реакций.

Выводы

У больных фоновыми заболеваниями шейки матки при гепатитах В и С преобладают воспалительные изменения шейки матки и полипы, а в группе без гепатита – эрозии шейки матки, эндоцервицит с эрозией и эрозия с эктропионом.

Патогенная микрофлора отмечена преимущественно у больных с гепатитами В и С.

Отмечены нарушения функции печени во всех группах обследованных больных.

Полученные нами результаты необходимо учитывать при лечении больных фоновыми заболеваниями шейки матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулавский В.А. Актуальные вопросы профилактики воспалительных заболеваний у женщин репродуктивного возраста / В.А.Кулавский // Медицинские технологии в охране репродуктивного здоровья женщины: материалы всероссийской науч.-практ. конф. – Екатеринбург, 2003. – С. 84-85.

2. Кулавский В.А. Роль ультразвуковой эхографии и доплерометрии в оценке состояния шейки матки /

В.А.Кулавский // Медицинские технологии в охране репродуктивного здоровья женщины: материалы всероссийской науч.-практ. конф. – Екатеринбург, 2003. – С. 85–86.

3. Кулавский В.А. Методы лечения фоновых и предраковых заболеваний шейки матки / В.А.Кулавский, С.Ф. Насырова, Ф.А. Хайруллина // Материалы VI Российского форума «Мать и дитя»: тез. докл. – М., 2004. – С. 392–393.

4. Прилепская В.Н. Патология шейки матки: теория, практика / В.Н. Прилепская, М.Н. Костава // Патология шейки матки. Генитальные инфекции. – 2006. – № 1(3). – С. 3–6.

5. Рудакова Е.Б. Влагилищный дисбиоз и патология шейки матки / Е.Б. Рудакова // Патология шейки матки. Генитальные инфекции. – 2006. – № 1(3). – С. 52–56.

G.V. Parphenova, V.I. Konovalov,

V.B. Tsutsor

PECULARITIES OF THE COURSE OF BACKGROUND CERVIX OF THE UTERUS' ILLNESSES OF B AND C HEPATITIS PATIENTS

The character of the course of a background cervix of the uterus' illnesses of the B and C hepatitis patients had been investigated. The role of the sexual system infection of the examined patients was presented. In all the groups liver dysfunctions of patients with the background cervix of the uterus' illnesses were marked. The investigation results received must be taken in account when treating such kind of patients.

Key words: background cervix of the uterus' illnesses, B and C hepatitis, pathogenous flora.

Д.Г. Покровский, А.А. Михайленко, Ю.В. Негодина

ПАТОХИМИЧЕСКИЕ И НЕКОТОРЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ У ДЕТЕЙ С ЭМОЦИОНАЛЬНЫМИ И ПОВЕДЕНЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ, ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тверская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Тверь

Пограничные нервно-психические расстройства занимают большую часть в структуре детской заболеваемости, в связи с чем имеют не только медицинскую, но и социальную значимость [2, 12]. Также особую важность обрела проблема частой заболеваемости детей острыми инфекционными, в частности бронхолегочными заболеваниями [10]. При этом показано, что соматические заболевания могут способствовать патоморфозу клинических проявлений психических расстройств, определяют доминирование соматизированных и вегетативных проявлений, а также обуславливают торпидность течения психических расстройств [7]. Известно, что к так называемым предпочтительным проявлениям психической патологии в детском возрасте относят эмоциональные и поведенческие нарушения, вероятность обострения которых возрастает в критические периоды психофизического развития, когда, по мнению ряда исследователей, происходит значительная перестройка реактивности и формируется новый уровень самосознания [4, 14]. В настоящее время достаточно разработаны дискриптивные подходы к изучению указанных расстройств у детей, однако не исследованы теоретические и практические аспекты клинко-биохимических и иммунологических корреляций.

Материалы и методы

Было обследовано 260 детей. На момент проведения исследования все дети находились в санатории «Прометей» департамента образования Тверской области, специализированном для реабилитации детей с бронхолегочной патологией. Популяцию для исследования составили дети в возрасте от 9 до 12 лет, средний возраст $10,5 \pm 0,9$, относящиеся к группе часто болеющих (ЧБД), т.е. переболевшие острыми респираторными заболеваниями (ОРЗ) 4 и более раз в течение года, что было зафиксировано в амбулаторной карте «История развития ребенка», форма 112 у. При этом клиническое обследование, проведенное в соответствии с критериями МКБ-10, позволило выявить у 230 детей (88,5%) эмоциональные расстройства и расстройства поведения, начинающиеся обычно в детском возрасте, а именно: нарушения активности и внимания (F 90.0), гиперкинетические расстройства поведения (F 90.1), депрессивные

расстройства поведения (F 92.0), другие смешанные расстройства поведения и эмоций (F 92.8). Эти дети составили основную группу исследования. У 30 детей психических расстройств выявлено не было, они составили группу сравнения. Группу контроля для лабораторных и патохимических исследований составили 30 соматически и психически здоровых детей, сопоставимых по возрасту.

В исследовании использован комплекс методов, включавший клинко-катамнестический метод определения показателя психического напряжения Шванцера [9], клинко-динамический метод, неврологическое обследование. Параклинические исследования включали клинический анализ крови, анализ крови на иммунограмму. Биохимические исследования включали определение содержания фосфолипидов крови методом проточной тонкослойной хроматографии. Липиды выделяли по Фолчу [15], фракционировали модифицированным методом [6]. Процентное содержание отдельных липидных фракций устанавливали денситометрически. С целью исследования характеристик конформационных и структурных изменений белков и фосфолипидов биомембран клеток крови был использован метод инфракрасной спектроскопии [5]. Спектроскопию цельной капиллярной крови проводили на аппаратно-программном комплексе «Икар» 9/1 (патент № 2137126 от 10.09.1999 г., сертификационный № 5745), по 9 оптическим каналам (длины волн от 3500 до 930 см), в течение 30 с. Прибор фиксирует процент пропускания оптической среды, являющейся величиной, обратно пропорциональной экстинкции раствора. Выходной информацией является показатель поглощения, в %, инфракрасного спектра излучения в любом из заданных интервалов спектра в течение 30 с. Исследование проводили по всем 9 оптическим каналам, однако наиболее диагностически значимыми оказались среднестатистические показатели поглощения инфракрасного спектра в диапазонах 3085 – 2832 см, 1543 – 1425 см и 1087 – 963 см. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica для Windows. Сравнение групп проводили с помощью критерия знаков и парного критерия Вилкоксона.

Результаты

Клинико-катамнестическое исследование показало у всех 260 обследованных детей наличие разнообразных патогенных пренатальных, перинатальных и постнатальных факторов и их сочетаний. Изучалась вся медицинская документация, имеющаяся в учреждениях здравоохранения и в школе. При этом всесторонне анализировались сведения, полученные как при опросе родственников, так и при выкопировке данных из медицинских документов. Изучение сомато-иммунологических аспектов состояния выявило факторы риска развития иммунной недостаточности. Так, у 85% детей наследственный и ранний личный анамнез был отягощен хроническими инфекциями и интоксикациями матери, осложненной токсикозом беременности, резус-конфликтом, родовыми травмами, асфиксией в родах, легкими черепно-мозговыми травмами, тяжелыми инфекциями и интоксикациями в грудном и раннем возрасте. В 58% случаев наблюдений отмечены паразитарные заболевания, которые зачастую являлись пусковым моментом аллергических реакций и заболеваний. Часто, у 35% обследованных, обнаруживались анемии, приводящие к супрессии клеточного звена иммунной системы.

Клинико-катамнестические данные соматического состояния показали, что у всех 260 обследованных детей встречался инфекционный синдром; у 63% детей выявлен аллергический синдром; значительно реже, в 26% случаев, встречался лимфопролиферативный синдром.

Клинико-катамнестический этап исследований включал изучение уровня психического напряжения у детей по методу Шванцера. Исследование показало, что у 230 обследованных детей показатель психического напряжения Шванцера значимо, $p < 0,01$, превышал нормальные показатели (до 10), и составил $17 \pm 2,1$ балла. Эти дети составили основную группу исследования.

Клинико-психопатологическое исследование позволило верифицировать у детей основной группы (88,5% обследованных) наличие резидуально-органической церебральной недостаточности, проявлявшейся основными признаками церебрастенического синдрома: снижением способности к концентрации внимания, затруднением запоминания, быстрой утомляемостью, инертностью интеллектуальных процессов, аффективными нарушениями.

Клинико-динамическое психопатологическое обследование показало неоднородность доминирующей симптоматики и позволило выявить два клинических варианта церебрастенического синдрома. В большинстве случаев церебрастенический симптомокомплекс обнаруживал себя преимущественно астено-гипердинамическими нарушениями (150 детей – 65% наблюдений), реже – астено-гиподинамическими (80 детей – 35% наблюдений). Деком-

пенсация резидуально-органической церебральной недостаточности способствовала формированию отклонений в школьном обучении, снижению показателя успешности обучения, определяя школьную дезадаптацию.

Психические нарушения при астено-гипердинамическом варианте церебрастенического симптомокомплекса определялись эмоционально-волевыми нарушениями в виде психической неустойчивости и повышенной аффективной возбудимости. Гиперактивность имела характер хаотичности, двигательной расторможенности, импульсивности. При данном клиническом варианте у детей обнаруживался неглубокий депрессивный аффект, сочетающий различные выраженные нарушения поведения с психопатоподобными чертами и гиперактивностью. Часто выявлялись вторичные нарушения влечений в виде уходов, курения, воровства, мастурбации, трихотилломании, маскирующие собственно аффективные нарушения. Дети часто обнаруживали раздражительность, обидчивость. Субдепрессивная симптоматика формировалась зачастую вследствие пролонгированных психических травм – гипопеки, агрессивного отношения к ребенку, эмоциональной депривации. У детей выявлялись нарушения поведения в виде аффективной возбудимости, неустойчивости, агрессивности, слабости волевого компонента поведения с включением патологических привычек, а вторичные нарушения влечений при выраженной эмоциональной депривации носили заместительный характер.

У детей со стойкой астено-гиподинамической симптоматикой доминировали вегето-сосудистые, вестибулярные и неврозоподобные расстройства различной степени выраженности. При этом психогенные причины нередко участвовали в формировании неврозоподобной симптоматики, определяя заметный полиморфизм клинических проявлений и затрудняя диагностику. У детей выявлена задержка становления моторно-статических функций. При этом у данной группы детей отмечен более глубокий депрессивный аффект в сочетании с полиморфными невротическими реакциями в виде нарушений сна, аппетита, фобий. Страхи имели сверхценный характер с тенденцией к генерализации. Как правило, фабула переживаний касалась состояния своего здоровья, здоровья близких, обнаруживалась склонность к возникновению страхов по малейшему поводу, пугливость. Субдепрессивное состояние формировалось вследствие таких субшоковых психических травм, как отделение от родителей и внезапный распад семьи. Отмечено, что преморбидные свойства личности детей длительное время оставались относительно неизменными. Клинически субдепрессивный аффект проявлялся в мимике, речевых особенностях, отгороженности. Обнаруживалась склонность к капризам и слезливость. Внешне

дети зачастую были замкнуты, пассивно подчиняемы. Поведенческая пассивность находила отражение в учебном процессе, существенно сужался круг интересов, утрачивались навыки социальной опрятности. Отмечены нарушения сна в виде затрудненного засыпания, поверхностного сна с ночными кошмарами, что вызывало спонтанные пробуждения и двигательное беспокойство. Дети обнаруживали ипохондрическую фиксацию, высказывали множество соматовегетативных жалоб.

Важно отметить, что у всех обследованных детей обнаружена негативно-дизонтогенетическая симптоматика, определяемая механизмами общей и парциальной ретардации, проявляющейся синдромами невропатии и задержкой формирования внимания, речи, школьных навыков [13]. Проявления психической ретардации облегчали также возникновение продуктивно-дизонтогенетических синдромов, связанных с этапностью индивидуального развития и механизмами фиксации незрелых реакций.

Как показали результаты клинико-динамических исследований, особое значение при декомпенсации резидуально-органической патологии у обследованных детей имели патохарактерологические реакции, в клинических проявлениях которых находили отражение патохарактерологические акценты формирующихся личностных изменений. Наиболее благоприятной оказывалась фиксация стереотипно повторяющихся реакций аффективно-возбудимого, неустойчивого и астено-невротического типов, заостряющих преморбидные личностные особенности и определяющих начальные этапы патохарактерологического развития.

Неврологическое обследование, проведенное у всех детей основной группы, позволило выявить у 180 детей (78,3%) четыре и более признаков резидуально-неврологической микросимптоматики (головные боли, головокружения, плохая переносимость жары, духоты, метеочувствительность).

Анализ данных педагогического изучения всех обследованных детей показал, что средний показатель уровня успешности обучения детей основной группы $3,6 \pm 0,5$ балла, у детей, составивших группу сравнения – $4,2 \pm 0,2$ балла. Затруднение школьной обучаемости у детей основной группы было связано с нарушением работоспособности вследствие недостаточной концентрации внимания, снижением памяти, быстрой утомляемостью и истощаемостью психических процессов, что в свою очередь и определяло отставание от школьной программы.

Все лабораторные исследования проводились в стадии ремиссии воспалительной патологии. Так, клинический анализ крови был проведен у всех обследованных детей не ранее чем через два месяца после перенесенного острого респираторного заболевания. Анализ данных лабораторных исследований показал, что у 78 из них (30% случаев) отмече-

ны отклонения показателей анализа от нормы. При этом у детей с отклонениями в клиническом анализе крови в 55,2% случаев отмечались анемии 1 – 2 степени, в 32% случаев выявлена напряженность фагоцитарного звена иммунной системы, о чем свидетельствовало наличие палочкоядерного сдвига, моноцитоза, в 78% случаев изолированно, а у 11% детей в сочетании с напряженностью клеточного звена, на что указывал выявленный лимфоцитоз. При этом значимых различий показателей клинического анализа крови у детей с астено-гипердинамическими и астено-гиподинамическими проявлениями церебрастенического симптомокомплекса выявлено не было.

Для более полного изучения параметров иммунитета исследовалась иммунограмма. В работе использовались показатели, наиболее доступные для клинической практики – лейкоформула, НСТ тест (тест с нитросиним тетразолием) спонтанный, НСТ тест стимулированный, IgA, IgG, IgM. Отклонения от нормы различной степени выраженности наблюдались у 225 детей основной группы (98%), у детей из группы сравнения отклонения показателей иммунограммы от нормы выявлены в 22 случаях (73%). При этом у 209 детей основной группы (91%) имели место отклонения в фагоцитарном звене иммунитета в виде нейтрофилеза, моноцитоза, повышения НСТ теста спонтанного, у 74 детей основной группы (32%) указанные изменения сочетались с нарушениями гуморального звена, о чем свидетельствует дисиммуноглобулинемия (табл. 1). У детей из группы сравнения значимых отличий среднестатистических показателей иммунограммы от данных у детей из контрольной группы выявлено не было. Было обнаружено значимое отличие среднестатистического показателя НСТ спонтанного от среднестатистического показателя у детей основной группы (табл. 1).

Анализ полученных данных показал, что у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения имеет место функциональное напряжение в фагоцитарном звене иммунной системы, о чем свидетельствует значимое повышение среднестатистических показателей нейтрофилеза ($p < 0,05$) и моноцитоза ($p < 0,001$). Данные показатели сочетаются с повышением активности клеточного иммунитета, на что указывает значимое повышение среднестатистических показателей содержания лимфоцитов ($p < 0,05$).

Анализ также выявил у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения повышение эндогенной антигенной нагрузки и выраженную инфекционную активность, косвенным подтверждением чего является активация кислородозависимого киллинга, на что указывает значимое повышение НСТ теста спонтанного, более чем в два раза превышающего нормальные значения

Показатели данных иммунограммы у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения

Данные иммунограммы	ЧБД с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения (основная группа), n = 230	ЧБД без психических расстройств (группа сравнения), n = 30	Здоровые дети (контрольная группа), n = 30
Лейкоциты	5,76 ± 0,8	5,71 ± 0,9	7,9 ± 1,3
Лимфоциты	42,5 ± 5,3*	34,8 ± 4,3	28 ± 4,6
Моноциты	12,1 ± 2,2** ^	6,9 ± 2,0	4,0 ± 1,1
Нейтрофилы	57,9 ± 6,5* ^	43,6 ± 5,9	36,5 ± 5,1
Эозинофилы	4,5 ± 1,63	4,6 ± 1,4	4,2 ± 1,3
Ig A г/л	2,1 ± ± 0,7	2,1 ± 0,5	0,9 ± 0,31
Ig G г/л	14,84 ± 1,6* ^	10,71 ± 1,2	8,6 ± 1,9
Ig M г/л	1,43 ± 0,28	1,53 ± 0,2	1,05 ± 0,2
НСТ спонтанный	34,7 ± 5,0** ^	14,1 ± 4,0`	10,5 ± 5,2
НСТ стимулированный	49,7 ± 5,0	51,8 ± 5,0	55 ± 4,0

Примечание: * значимые отличия показателей основной и контрольной групп ($p < 0,05$); ** значимые отличия показателей основной и контрольной групп ($p < 0,001$); ^ отклонение от нормы; ` значимые отличия показателей основной группы и группы сравнения ($p < 0,05$).

($p < 0,001$). Выявленное значимое ($p < 0,05$) повышение Ig G у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения может свидетельствовать о частых контактах с инфекционными агентами бактериальной природы у детей данной группы.

При этом значимых различий среднестатистических иммунологических показателей у детей с астено-гипердинамическими и астено-гиподинамическими проявлениями церебрального симптомокомплекса выявлено не было.

Для проведения биохимических исследований методом ИКС из группы детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения случайным образом было отобрано по 15 человек с астено-гипердинамическими и астено-гиподинамическими проявлениями церебрального симптомокомплекса. Исследование проводилось по всем оптическим каналам, однако наиболее диагности-

чески значимыми оказались среднестатистические показатели поглощения инфракрасного спектра в диапазоне 3085 – 2832 см⁻¹, 1543 – 1425 см⁻¹ и 1087 – 963 см⁻¹.

У детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения среднестатистические показатели поглощения инфракрасного спектра составляют в диапазонах 3085 – 2832 см⁻¹, 1543 – 1425 см⁻¹ и 1087 – 963 см⁻¹ 36,2 ± 1,7, 35,0 ± 2,0, 38,7 ± 2,5 соответственно, значимо отличаются от среднестатистических показателей у детей из контрольной группы, $p < 0,05$, а в диапазоне 3085 – 2832 см⁻¹ значимо отличаются от показателей у детей группы сравнения, $p < 0,05$ (табл. 2). При этом значимых различий показателей изменений инфракрасного спектра цельной крови у детей с астено-гипердинамическими и астено-гиподинамическими проявлениями церебрального симптомокомплекса выявлено не было.

Таблица 2

Изменения инфракрасного спектра цельной крови по показателю поглощения у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения (в %, M ± m)

Границы диапазонов спектральной области, см ⁻¹	Средние показатели поглощения у здоровых детей (контрольная группа), n = 30	Средние показатели у детей без психических расстройств (группа сравнения), n = 30	Средние показатели у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения (основная группа), n = 230	Компоненты, определяемые ИКС в крови
3085 – 2832	25,6 ± 0,6	30,7 ± 1,5`	36,2 ± 1,7*	фосфолипиды, эфиры холестерина, триглицериды
1543 – 1425	29,1 ± 1,1	33,8 ± 2,1	35,0 ± 2,0*	метиленовые и метиловые группы, содержащиеся во всех компонентах мембран, СФМ, ФХ
1087 – 963	25,8 ± 1,9	36,8 ± 1,7	38,7 ± 2,5*	Фосфатиды, ФЭА, ФС

Примечание: * значимые отличия показателей основной и контрольной групп ($p < 0,05$); ` значимые отличия показателей группы сравнения и показателей основной и контрольной групп ($p < 0,05$).

Исследование фосфолипидов цельной крови методом проточной тонкослойной хроматографии было проведено у детей из основной и контрольной групп. Анализ полученных данных позволил выявить у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения значимое ($p < 0,05$) повышение по сравнению с нормой содержания фосфатидолэтаноламинов (ФЭА) в 1,18 раза и сфингомиелинов (СФМ) в 1,33 раза и значимое ($p < 0,01$) снижение фосфатидилхолинов (ФХ) в 1,45 раза (табл. 3). При этом значимых различий показателей содержания фосфолипидов крови у детей с астено-гипердинамическими и астено-гиподинамическими проявлениями церебрального симптомокомплекса выявлено не было.

Корреляционный анализ выявил у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения сильную корреляцию среднестатистических показателей лимфоцитов, моноцитов и НСТ спонтанного со среднестатистическими показателями поглощения инфракрасного спектра в диапазонах $3085 - 2832 \text{ см}^{-1}$, $1543 - 1425 \text{ см}^{-1}$ и $1087 - 963 \text{ см}^{-1}$, $r = 0,8$; $p < 0,05$. Также у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения выявлена сильная корреляция среднестатистических показателей поглощения инфракрасного спектра в диапазонах $3085 - 2832 \text{ см}^{-1}$, $1543 - 1425 \text{ см}^{-1}$ и $1087 - 963 \text{ см}^{-1}$ со среднестатистическими показателями ФЭА, СФМ и ФХ, $r = 0,8$; $p < 0,05$.

Обсуждение

Известно, что именно фосфолипидам принадлежит значительное место в функциональных системах нервной ткани. Являясь неперменной составной частью клеточных мембран, фосфолипиды в качестве структурно-функциональных компонентов принимают непосредственное участие в процессах клеточной проницаемости, трансмембранного переноса всех метаболитов, обеспечивая правильное функционирование гомеостатических систем жизнедеятельности клеток, участвуют в процессах возбужденности и энергетическом обмене клетки [8]. В состоянии гипоксии нарушается утилизация глюкозы (гликогена), что приводит к блокированию образования из аминокислоты сфингозида – церамида. В указанных условиях за счет активации специфических

трансфераз образуется повышенное количество СМ (часть которого расходуется на увеличение синтеза ФЭА), что может служить гиперлипогенетическим источником энергетического депо [11]. На это указывают полученные данные о значимом ($p < 0,05$) увеличении содержания ФЭА и СФМ в цельной крови у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения. Вместе с тем, современными достижениями в области клинической иммунологии показано непосредственное участие липидных компонентов мембран в процессах клеточной активации, продукции медиаторов иммунного ответа и регуляции фагоцитоза, что определяет важное значение гомеостаза липидов в стабилизации иммунных реакций организма [3, 10]. Это объясняется тем, что мембраны, состоящие из липидов, несут на себе основную функциональную нагрузку при распознавании «своего» и «чужого» в процессах активации и кооперации клеток, обеспечивая работу ионных каналов, активацию белков – эффекторов, выделение липидных медиаторов и резистентность мембран к цитолизу [1].

Можно предположить, что выявленные нарушения соотношения фосфолипидных фракций крови у детей и связанные с ними изменения структуры клеточных мембран и нарушение мембранной проницаемости делает клетки доступными для аутоиммунного повреждения, что инициирует возможность реализации механизма формирования эмоциональных расстройств и расстройств поведения у детей.

Выводы

1. Проведенные исследования показали высокую распространенность эмоциональных и поведенческих расстройств у детей, часто болеющих ОРЗ. 2. Выявленная у ЧБД сильная корреляция показателей лимфоцитов, моноцитов и НСТ спонтанного с показателями поглощения инфракрасного спектра в диапазонах, характерных для компонентов мембран и показателями содержания ФЭА, СФМ и ФХ свидетельствует об общности патогенетических механизмов формирования состояний частой заболеваемости ОРЗ и эмоциональных и поведенческих расстройств у детей. 3. Обнаруженные у ЧБД значимые различия показателей лимфоцитов, моноцитов,

Таблица 3

Состав фосфолипидов цельной крови у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения (% от суммы, $M \pm m$)

Фракции фосфолипидов	Средние показатели у здоровых детей, (контрольная группа), $n = 30$	Средние показатели у детей с эмоциональными расстройствами и расстройствами поведения (основная группа), $n = 30$
Фосфатидилэтаноламины (ФЭА)	$25,4 \pm 1,2$	$30,1 \pm 0,9 \wedge$
Сфингомиелины (СФМ)	$17,75 \pm 1,1$	$23,7 \pm 1,1 \wedge$
Фосфатидилхолины (ФХ)	$46,87 \pm 2,2$	$32,3 \pm 1,4^*$

Примечание: различия значимы: * $p < 0,01$; $\wedge p < 0,05$.

НСТ спонтанного, показателей поглощения инфракрасного спектра в указанных диапазонах и показателей содержания ФЭА, СФМ и ФХ с показателями у здоровых детей могут рассматриваться как маркер клинического прогноза формирования эмоциональных и поведенческих расстройств. 4. Целесообразна своевременная дифференцированная реабилитация и динамическое наблюдение ЧБД психиатром, педиатром и иммунологом, при этом выявленный комплекс патохимических и иммунологических показателей целесообразен в плане оптимизации терапевтических подходов для коррекции эмоциональных и поведенческих расстройств у ЧБД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ветлищев Ю.В. Биологические активные метаболиты мембранных глицерофосфолипидов в норме и при патологии / Ю.В. Ветлищев, Э.А. Юрьева, В.С. Воздвиженская // Вопросы мед. химии. – 1987. – № 2. – С. 2 – 9
2. Дедков Е.Д. Декомпенсация резидуально-органических психопатоподобных расстройств в пубертатном периоде: автореф. дис. ... канд. мед. наук. 14.00.18. / Е.Д. Дедков. – М., 1989. – 16 с.
3. Извекова В.А. Липиды мембран и функции иммунокомпетентных клеток в норме и при патологии / В.А. Извекова // Успехи современной биологии. – 1991. – № 4. – С. 577 – 590.
4. Исаев Д.Н. Психопрофилактика в практике педиатра / Д.Н. Исаев. – Ленинград, 1984. – 192 с.
5. Использование ИК-спектроскопии в медицине, экологии и фармации: сборник науч. трудов / Твер. гос. мед. акад.; под. ред. А.В. Каргаполова. – Тверь: 2003. – С. 5 – 49.
6. Каргаполов А.В. Анализ липидного состава митохондриальных и эндоплазматических мембран с помощью метода проточной тонкослойной хроматографии / А.В. Каргаполов // Биохимия. – 1981. – № 4. – С. 691 – 698.
7. Клиническая психонейроиммунология / В.Я. Семке [и др.]. – Томск, 2002. – С. 162 – 174.
8. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Адаптационная функция липидов. / Е.М. Крепс. Ленинград, 1981. – 339 с.
9. Кузнецова Л.М. Некоторые методы психолого-педагогического контроля за здоровьем учащихся / Л.М. Кузнецова. – М.: Вита – Пресс, 1996. – С. 26 – 27.
10. Кузьмичева Л.В. Изменения фосфолипидного состава мембран лимфоцитов при бронхолегочных заболеваниях / Л.В. Кузьмичева, Р.Е. Киселева, О.С. Новожилова // Иммунология. – 2005. – № 5. – С. 304 – 308.
11. Морковкин В.М. Патохимия шизофрении / В.М. Морковкин, А.В. Картелишев. – М., 1988. – 255 с.

12. Патология влечений у детей и подростков: диагностика, терапия, нейрофизиология, профилактика и коррекция: тезисы докладов / НИЦПЗ РАМН – М., 1996. – 145 с. – С. 4 – 5.

13. Сухарева Г.Е. Клинические лекции по психиатрии детского возраста / Г.Е. Сухарева. – М.: Медгиз, 1955. – Т. 1. – 459 с.; Избранные главы. – М.: Медицина, 1974. – 320 с.

14. Ушаков Г.К. Детская психиатрия / Г.К. Ушаков. – М., Медицина, 1973. – 329 с.

15. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. Stanley // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226. – P. 497 – 509.

*D.G. Pokrovsky, A.A. Michailenko,
J.V. Negodina*

PATHOCHEMICAL AND SOME IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CHILDREN HAVING EMOTIONAL BEHAVIOURAL DISORDERS, WHO OFTEN COME DOWN WITH ACUTE RESPIRATORY DISEASES

In order to find out correlations of pathobiochemical and immunological aspects with disorders of emotions and behaviour characterizing children 230 teenagers who often come down with acute respiratory diseases have been examined. The clinical psychopathological, clinical immunological and neurological research was complemented with the data got by infrared spectrography of blood, the data of blood phospholipid spectre, of immunogramme and evaluation of leukocytic formula of clinical blood test. We have shown the significance the clinical predictors of emotional behavioural disorders of residual organic genesis have, found the changes in the contents of a number of phospholipid fractions and characteristics of immune system phagocytic part functioning that correlate with emotional behavioural disorders.

С.Ю. Родионов¹, О.А. Орлов², В.А. Черешнев¹, Л.А. Тараненко², Н.Н. Шур²,
С.В. Сибиряк¹, Т.В. Гаврилова¹, Е.Г. Орлова¹, О.В. Лебединская²

ИММУНОКОРРЕКЦИЯ ПРЕПАРАТОМ «ПРОФЕТАЛЬ» В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург,

²ГОУ ВПО «ПГМА Росздрава», г. Пермь

Несмотря на достижения в области современной онкологии эффективность лечения злокачественных новообразований, особенно при III–IV стадиях остается неудовлетворительной [1]. Для большинства существующих методов терапии (химио-, лучевая терапия) характерна высокая токсичность, а также иммуносупрессивный эффект, который в значительной мере потенцирует опухоль-индуцированный иммунодефицит. Все это определяет поиск новых лекарственных препаратов, способных в условиях противоопухолевой терапии обеспечивать иммунокорректирующее и иммуностимулирующее действие.

В настоящее время активно ведется изучение белка альфа-фетопротейна (АФП). Повышенный интерес к которому обусловлен тем, что сопряжение процессов трансформации нормальной клетки в опухолевую сопровождается экспрессией некоторых эмбриональных генов с эктопической продукцией фетальных белков (в частности АФП человека), экранирующих антигенные детерминанты раковых клеток. Этот феномен получил название «иммунологического усиления опухолевого роста». При исследовании оказалось, что введенный в организм опухоленосителя АФП снимает феномен иммунологического усиления опухолевого роста и запускает механизмы трансплантационного иммунитета с последующим некрозом опухоли [11].

Внимание к АФП было привлечено не только как к онкомаркеру. Неослабевающий интерес обусловлен также тем, что данный белок является транспортным и обладает выраженными конъюгатными свойствами [11]. Поскольку лигандами АФП являются эмбриональные рецепторы опухолевых клеток, весьма успешно были предприняты попытки целенаправленной доставки к злокачественным клеткам цитостатиков и цитотоксинов [3,7,9,13]. Помимо этого был установлен непосредственный апоптогенный эффект АФП на опухолевые клетки [2, 10, 15, 17].

Установлено, что АФП проявляет иммуномодулирующие эффекты: активизирует макрофаги и дендритные клетки, а также потенцирует цитотоксические лимфоциты и макрофаги в отношении опухолевых клеток [5, 6, 10].

В настоящее время создана лекарственная форма человеческого АФП – препарат «Профеталь» (Регистрационное удостоверение № ЛС 000941 МЗ РФ от 18.11.2005 г.). Предварительные исследования показали достоверное уменьшение опухолевых очагов в ходе комплексного лечения солидных новообразований при

использовании препарата «Профеталь» в сравнении с изолированной химиотерапией, а также возможность монотерапии препаратом [11, 12].

Целью настоящего исследования являлось изучение динамики изменения некоторых показателей клеточного и гуморального иммунитета у пациентов со злокачественными опухолями в процессе комплексной химиотерапии с использованием «Профеталья» и его изолированном применении.

Материалы и методы

Иммунологическое обследование проведено у 96 пациентов с онкологическими заболеваниями. Критериями отбора пациентов в исследование были: гистологически подтвержденный рак; солидные опухоли и гранулематозы III–IV стадии; больные раком, выявленным первично, с метастазами или рецидивами заболевания, пролеченные без эффекта традиционными методами – хирургическим, химио- и лучевой терапией, гормонотерапией, а также письменное согласие пациента на лечение. Критерии удаления из исследования: онкопатология головного мозга или метастазы в головной мозг; дыхательная недостаточность и сердечная недостаточность выше II стадии; почечная недостаточность выше I стадии; прорастание опухоли в стенку крупного сосуда; наличие у больного острого инфекционного или психического заболевания; потеря исходной массы тела более 20%; неприемлемая токсичность препарата; отказ пациента продолжить лечение; получение больным во время исследования противоопухолевой терапии другого типа.

В исследовании участвовали пациенты в возрасте с 18 до 76 лет. Были сформированы три группы по принципу специфической терапии. Первую группу составляли 12 пациентов, получавших препарат «Профеталь» в виде монотерапии. Первоначальная доза препарата «Профеталь» составляла 1 мкг/кг массы тела с последующим увеличением дозы при хорошей переносимости препарата и наблюдаемом клинико-лабораторном эффекте. Средняя продолжительность курса лечения в этой группе составляла 14 – 60 дней, курсовая доза препарата «Профеталь» от 0,95 до 14,78 мг.

Вторую группу составляли 27 человек, получавших лечение препаратом «Профеталь» в сочетании со стандартными схемами и адекватными дозами полихимиотерапии (ПХТ). Программа химиотерапии выбиралась на основании принципов комплексного воздействия – наибольшей эффективности при наименьшей токсичности

ти. Доза препарата «Профеталь» при ПХТ составляла 375 мкг на одно введение одного химиопрепарата. Средняя продолжительность курса лечения в этой группе составляла 4–23 дней, курсовая доза препарата «Профеталь» от 0,375 до 3,0 мг.

В третью группу вошло 57 человек, лечившихся только стандартными общепринятыми схемами полихимиотерапии (САРР, СОРР, ЕАР, СМФ, ВАСОР и др.), в рекомендуемых дозах в соответствии с международными протоколами. Для каждой группы показателями контроля эффективности терапии осуществляли после проведенного лечения в конкретной клинической группе. Характеристика исследуемых групп онкологических больных по нозологическим формам представлена в табл. 1.

Оценку показателей иммунного статуса проводили перед началом и после окончания курса лечения. Кровь для иммунологического обследования получали из локтевой вены, в утренние часы, строго натощак.

Субпопуляционную структуру лимфоцитов оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur), используя панель моноклональных антител НПО «Сорбент». Оценивали содержание CD3+ Т-лимфоцитов, CD3+CD4+Т-лимфоцитов-хелперов, CD3+CD8+ЦТЛ и CD8+Т-супрессорных клеток, CD3+HLA-DR+Т-лимфоцитов, экспрессирующих «поздние» активационные антигены, CD19+В-лимфоцитов, CD3-CD16+NK-лимфоцитов.

Содержание сывороточных иммуноглобулинов оценивали турбидиметрическим методом с использованием стандартных коммерческих наборов («Human», Германия).

Фагоцитарную активность лейкоцитов оценивали по тесту фагоцитоза формализированных эритроцитов барана по стандартной методике [4]. Оценивали процент фагоцитоза, фагоцитарный индекс, фагоцитарное число.

Статистическая обработка полученных данных осу-

ществлялась с использованием параметрических и непараметрических критериев (описательная статистика, парный t-критерий Стьюдента, критерий Вилкоксона). Количественные признаки предварительно исследовались на нормальность распределения. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Из данных, приведенных в табл. 2 следует, что в группе пациентов, получавших только ПХТ, отмечалось существенное снижение абсолютного числа зрелых Т-лимфоцитов, абсолютного числа Т-лимфоцитов, обладающих хелперной активностью CD3+CD4+, CD3+CD8+Т-лимфоцитов, абсолютного и относительного содержания CD3-CD16+ NK-лимфоцитов, абсолютного содержания CD19+ В-лимфоцитов. При этом, как абсолютное, так и относительное содержание активированных CD3+HLA-DR+ Т-лимфоцитов не только не снижалось, но имело тенденцию к повышению. Этот факт не удивителен, так как токсические воздействия на иммунную систему нередко сопровождаются активационным типом иммунного статуса, что, однако сопровождается функциональным истощением клеток [16]. Возможно, что с «патологической активацией» связано и значимое нарастание уровня сывороточных иммуноглобулинов всех классов; кроме того, этот факт отражает преимущественную «поляризацию» в сторону Th2-типа иммунного ответа, что является неблагоприятным, т.к. способствует «экранированию» опухоли. Фагоцитарная активность нейтрофилов этой группе пациентов имела отчетливую тенденцию к снижению, в сравнении с исходными показателями, однако достоверных различий не было.

В группе пациентов, которым проводилось комплексное лечение ПХТ в сочетании с препаратом «Профеталь», статистически значимых различий в соотношении

Таблица 1

Характеристика онкологических больных по нозологическим формам

Диагноз	«Профеталь»			«Профеталь»+ПХТ			ПХТ		
	Количество больных	Морфологическая характеристика		Количество больных	Морфологическая характеристика		Количество больных	Морфологическая характеристика	
		Умеренно и высоко дифференцированные опухоли	Низко дифференцированные опухоли		Умеренно и высоко дифференцированные опухоли	Низко дифференцированные опухоли		Умеренно и высоко дифференцированные опухоли	Низко дифференцированные опухоли
Рак молочной железы	3	2	1	8	8	-	29	26	3
Рак толстого кишечника	1	1	-	6	5	1	12	11	1
Рак желудка	1	1	-	2	1	2	5	1	4
Рак поджелудочной железы	-	-	-	1	1	-	-	-	-
Опухоль, без уточненного первичного очага	-	-	-	1	-	1	-	-	-
Рак легкого	1	1	-	1	1	-	-	-	-
Лимфопролиферативные	1	1	-	4	4	-	7	-	7
Рак яичника	1	1	-	1	1	-	4	4	-
Рак головы и шеи	-	-	-	3	3	-	-	-	-
Рак предстательной железы	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Рак почки	3	3	-	-	-	-	-	-	-
Итого:	12	11	1	27	23	4	57	42	15

Динамика некоторых показателей иммунной системы у больных со злокачественными опухолями на фоне разных схем терапии ($M \pm m$)

Показатель	Группа «Профеталь» (n=12)		Группа «Профеталь»+ПХТ (n=27)		Группа ПХТ (n=45)	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
CD3+, %	33,07±7,05	38,6±5,7	36,20±6,70	29,1±10,2	36,7±3,02	26,9±0,02
CD3+, абс. знач.	0,50±0,18	0,79±0,24*	0,71±0,41	0,56±0,49	0,77±0,06	0,53±0,03*
CD3+CD4+, %	19,68±3,92	23,09±4,25*	20,70±4,30	19,35±7,07	22,06±3,15	20,31±5,12
CD3+CD4+, абс. знач.	0,29±0,09	0,48±0,28*	0,34±0,08	0,28±0,09*	0,46±0,04	0,3±0,02*
CD3+CD8+, %	17,21±5,98	20,04±4,0	16,43±5,49	13,76±9,50	20,68±0,42	15,63±0,25
CD3+CD8+, абс. знач.	0,29±0,09	0,44±0,23	0,28±0,14	0,23±0,15	0,34±0,03	0,24±0,01*
CD4/CD8	0,97±0,42	1,09±0,37	1,22±0,22	1,52±0,29*	0,98±0,07	0,86±0,02
CD3+HLA-DR+, %	6,90±3,24	4,80±1,86	5,63±3,30	7,18±5,02	4,82±3,52	6,02±3,26
CD3+HLA-DR+, абс. знач.	0,13±0,09	0,08±0,06	0,15±0,06	0,06±0,04*	0,05±0,01	0,06±0,01
CD19+, %	5,35±2,4	7,00±2,00*	3,94±1,60	2,97±1,26*	6,28±0,38	4,86±2,17
CD19+, абс. знач.	0,09±0,06	0,12±0,05	0,06±0,02	0,03±0,02*	0,09±0,01	0,04±0,003*
CD3-CD16+, %	10,16±3,4	10,17±3,70	8,80±5,10	9,70±3,20	9,21±0,02	6,25±0,01*
CD3-CD16+, абс. знач.	0,15±0,08	0,23±0,06*	0,16±0,09	0,16±0,15	0,24±0,02	0,16±0,01*
Процент фагоцитоза, %	32,8±3,7	39,60±6,30*	38,90±6,40	44,30±11,60	42,86±0,02	36,24±0,03
Фагоцитарный индекс	1,5±0,18	1,74±0,19*	1,63±0,20	1,59±0,32	1,86±0,34	1,34±0,48
Фагоцитарное число	0,51±0,10	0,69±0,13*	0,66±0,20	0,69±0,19	0,58±0,04	0,52±0,02
IgA, г/л	2,20±0,80	2,09±0,83*	1,54±0,53	1,56±0,34	1,85±0,06	1,98±0,04*
IgG, г/л	13,54±3,50	11,19±2,50*	8,70±1,60	10,62±2,2*	12,01±0,82	13,21±0,26*
IgM, г/л	1,09±0,34	1,11±0,59*	1,05±0,22	1,03±0,54	1,40±0,18	1,61±0,06*

* достоверность различий до и после лечения в группах по парному t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

субпопуляций лимфоцитов, в сравнении с исходными значениями, не было. Как и в предшествующей группе снижалось абсолютное значение Т-лимфоцитов, обладающих хелперной активностью CD3+CD4+, зрелых В-лимфоцитов. Однако достоверного снижения содержания CD3+ Т-лимфоцитов, НК-лимфоцитов не было, содержание активированных Т-лимфоцитов снижалось, а иммунорегуляторный коэффициент нарастал. Таким образом, «Профеталь» в определенной мере препятствовал формированию иммуносупрессии у пациентов, получавших лечение ПХТ. Это подтверждается и отсутствием тенденции к снижению показателей фагоцитоза. В отличие от группы, получавшей только ПХТ, не наблюдалось значимого возрастания уровня IgM, но уровень IgG и IgA также повышался.

В группе пациентов, получавших монотерапию препаратом «Профеталь», характер изменения иммунологических показателей был иной. Имелись признаки иммунопотенцирующего действия препарата – статистически достоверно нарастало абсолютное содержание CD3+ Т-лимфоцитов, относительное и абсолютное содержание CD3+CD4+ Т-хелперов, процентное содержание В-клеток, абсолютное содержание НК-лимфоцитов. При этом содержание HLA-DR+ Т-лимфоцитов значимо не изменялось, что можно рассматривать как позитивный признак. Существенно, что в условиях монотерапии «Профеталем» возрастала фагоцитарная активность нейтрофилов, что свидетельствует об активации механизмов неспецифической резистентности. Важно и то, что в этой группе пациентов наблюдалось существенное снижение уровня сывороточного IgG. Таким образом, полученные результаты убедительно демонстрируют иммуномодулирующий эффект препарата «Про-

феталь» в условиях терапии злокачественных опухолей.

В составе комплексной терапии («Профеталь» +ПХТ) снижалась интенсивность иммуносупрессии, а при использовании препарата «Профеталь» в виде монотерапии проявлялось отчетливое иммуностимулирующее действие.

Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать вывод о наличии выраженной иммунорегуляторной активности препарата «Профеталь». В виде монотерапии он активировал механизмы клеточного иммунитета, увеличивая активность Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, при этом повышалась фагоцитарная активность лейкоцитов. Важно, что наблюдалось отчетливое снижение концентрации сывороточного IgG, что свидетельствовало об уменьшении риска развития феномена иммунологического усиления роста опухолей.

При применении препарата «Профеталь» в комплексной терапии в сочетании с полихимиотерапией отсутствовала негативная динамика в показателях фагоцитоза, что может быть расценено как благоприятный признак, но, тем не менее, наблюдалось угнетение клеточного иммунитета и повышение количества IgG.

На фоне химиотерапии (3-я группа) отмечалось значительное угнетение показателей всех звеньев иммунитета.

Таким образом, применение препарата «Профеталь» позволяет использовать дозы химиотерапевтических лекарственных средств, достаточные для достижения ремиссии и клинического эффекта, а также избежать большого количества осложнений и побочных эффектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев Н.В., Городилова В.В., Мандрик Э.В. Вопросы иммунологии опухолей. – Томск: Изд-во Томск. ун-та. 1986. – 240 с.

2. Волянский Ю.Л., Колотова Т.Ю., Васильев Н.В. Молекулярные механизмы программированной клеточной гибели // Успехи соврем. биол. – 1994. – Т. 114, вып. 6. – С. 679–692.

3. Игнатъева Г.А., Топтыгин А.Ю., Сеславина Л.С., Сидорович И.Г. Противоопухолевый эффект конъюгата альфа-фетопротеина с ристомицином // 1-я Национальная конф. Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов “Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии”. – М.: ВИНТИ, 1997. – С. 269–269.

4. Каплин В.Н. Нетрадиционная иммунология инфекций. – Пермь: Изд-во Пермск. гос. мед. академии, 1996. – 163 с.

5. Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Родионов С.Ю., Лебединская Е.А., Гаврилова Т.В., Карамзин А.М., Киселевский М.В. Получение активированных лимфоцитов из мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека под воздействием альфа-фетопротеина // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – № 1 (13). – С. 40–46.

6. Лебединская О.В., Черешнев В.А., Гаврилова Т.В., Лебединская Е.А., Родионов С.Ю., Ахматова Н.К., Шубина И.Ж., Киселевский М.В. Сравнительный анализ возможностей экстракорпоральной генерации активированных лимфоцитов периферической крови человека с применением препарата «Профеталь» интерлейкина-2 // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2005. – № 4. – С. 52–58.

7. Лужков Ю.М., Москалева Е.Ю., Накашьян Р. и др. Конъюгаты биологически активных веществ с альфа-фетопротеином, обладающие избирательным действием по отношению к раковым опухолям, способ их получения (варианты) и фармацевтическая композиция на их основе. Патент на изобретение РФ № 2071351 от 10.01.97 г.

8. Рошин Е.М., Комов Д.В., Нечипай А.В. и др. Теоретическое обоснование и первые итоги клинического применения альфа-фетопротеина человека (АФП) и комплекса доксарубицин-эстрон (ДЭ) у больных злокачественными новообразованиями печени // Новое в онкологии. – Воронеж, 1997. – Вып. 2. – С. 137–140.

9. Северин С.Е., Фельдман Н.Б., Луценко С.В. и др. Повышение противоопухолевой активности доксарубицина за счет его адресной доставки к клеткам-мишеням с помощью белковых векторов // Вопросы биологической, медицинской и фармакологической химии. – 1999. – № 1. – С. 44–48.

10. Черешнев В.А., Лебединская О.В., Родионов С.Ю., Ахматова Н.К., Шубина И.Ж., Лебединская Е.А., Гаврилова Т.В., Киселевский М.В. Влияние препарата «Профеталь» на функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов и дендритных клеток человека // Медицин-

ская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 5–6. – С. 525–534.

11. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А., Малютин Н.Н., Орлов О.А. Альфа-фетопротеин. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 376 с.

12. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Васильев Н.В., Орлов О.А., Черкасов В.А. Иммуноterapia злокачественных опухолей альфа-фетопротеином человека как этапа комбинированного и комплексного лечения онкологических больных // Аллергология и иммунология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 97–103.: табл., рис., рез англ.-Библиогр.: 36 назв.

13. Cwley D.B., Simpson D.L., Herschman H.R. Asialoglycoprotein receptor mediates the toxic effects of an asialofetuin – diphtheria toxin fragment A conjugate of cultured rat hepatocytes // Prog. Nat. I. Acad. Sci. USA. – 1981. – Vol. 78, ¹6. – P. 3383–3387.

14. Hooper D.C, Cohen B.L., Ducas D. et al. Selective inhibition of murine T-cell proliferation and lymphokine-activated natural killer cell function by AFP // Biological activities of alpha-fetoprotein. – 1987. – Vol. 1. – P. 153–167.

15. Laborda J., Naval J., Allouche M. et al. Specific uptake of alpha-fetoprotein by malignant human lymphoid cell // Int. J. Cancer. – 1987. – Vol. 40. – P. 314–318.

16. Sibiryak S., Risberg V., Yusopova R., Kurchatova N. The immune status and lymphocyte apoptosis in the opioid addicts // Rus. J. Immunol. – 2001. – Vol. 3, – P. 282–290.

17. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease // Science. – 1995. – Vol. 267, № 5203. – P. 1456–1462.

*S.Ju. Rodionov¹, O.A. Orlov²,
V.A. Chereshev¹, L.A. Taranenko²,
N.N. Shur², S.V. Sibiryak¹, T.V. Gavrilova¹,
E.G. Orlova¹, O.V. Lebedinskaya²*
**IMMUNOCORRECTION BY
“PROFETAL” IN COMPLEX
TREATMENT OF TUMORAL DISEASES**

¹Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Science, ²Perm medical academy, Faculty of hospital surgery

It is established, that “PROFETAL” possesses the expressed immunoregulation activity.

At “PROFETAL” application in monotherapy the activation of reactions of cellular immunity – the stimulation of activity of T and B-lymphocytes, natural killers, and also the rising of phagocytic activity of leucocytes is revealed. It is important to note, that the depression of IgG concentration in serum is observed, that decrease the risk of a phenomenon of immunologic enhancement of tumour development.

At application of “PROFETAL” in complex therapy in a

combination with polychemotherapy the negative changes in parameters of a phagocytic activity are absent that is the favorable factor, however the depression of cellular immunity and the increase in IgG concentration are revealed.

In group of patients with chemotherapy (3-d group) the se-

vere depression of all parameters of immunity is observed.

Thus, the application of "PROFETAL" allows to use the doses of chemotherapeutic medical products sufficient for achievement of clinical effect and remissions and to avoid a plenty of complications and side effects.

УДК 616.132.2

С.Г. Суханов, И.Н. Рямзина, А.В. Туев, И.В. Тимофеева

ВЛИЯНИЕ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ НА ДИАСТОЛИЧЕСКУЮ ДИСФУНКЦИЮ РЕСТРИКТИВНОГО ТИПА У БОЛЬНЫХ ИБС

ГУЗ ПОКБ № 2 «Институт сердца» Филиал НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН

На сегодняшний день доказано, что параметры диастолической функции тесно связаны с клинической картиной [8], толерантностью к физической нагрузке [13] и прогнозом у больных с хронической сердечной недостаточностью. У больных коронарной болезнью сердца наибольшей неблагоприятной прогностической ценностью обладает рестриктивный тип диастолических нарушений [6]. Ишемия в первую очередь нарушает активную релаксацию сердца посредством негативного влияния на кардиомиоцит, однако для возникновения рестриктивного типа диастолической дисфункции необходимо нарушение не только активной, но и пассивной релаксации левого желудочка. Нарушение пассивных свойств миокарда во многом зависит от состояния интерстиция. В основе повышения жесткости миокарда при ИБС лежит избыточное образование в нем фиброзной ткани вследствие длительной хронической ишемии, а также после перенесенного инфаркта миокарда (ИМ) [1, 2]. Для практического здравоохранения актуальным является изучение возможности реверсии диастолической дисфункции на этапе рестрикции в результате медикаментозного и хирургического лечения. Целью исследования явилась оценка динамики показателей диастолической функции после хирургической реваскуляризации в раннем и позднем послеоперационных периодах.

Материалы и методы

В исследование включено 49 больных ИБС, проходивших исследование на базе Пермского института сердца и имеющих исходно рестриктивный тип диастолической дисфункции. Всем пациентам было выполнено коронарное шунтирование. Средний возраст больных составил $57,51 \pm 8,96$ лет. Гендерная принадлежность: 89,80% (n=44) мужчины, 10,20% (n=5) женщины. ИМ в анамнезе зафиксирован у 93,88% пациентов (n=46), в 73,46% случаев – крупноочаговый. Из сопутствующей патологии у 83,67% больных (n=41) была выявлена артериальная гипертония (АГ), у 10,20% (n=5) сахарный диабет 2 типа (СД).

Состояние диастолической функции оценивали триж-

ды: до коронарного шунтирования, в раннем послеоперационном периоде ($5 \pm 2,18$ дней) и в отдаленном периоде реабилитации ($2,29 \pm 1,04$ года) по трансмитральному диастолическому потоку (ТМДП). Программа ультразвукового исследования сердца проводилась на аппарате «Acuson» «Aspen» (США) с регистрацией результатов на магнито-оптических дисках. Исследования выполнялись датчиком 3,74 МГц. Определялись следующие показатели: 1) максимальная скорость трансмитрального кровотока в период раннего диастолического наполнения ЛЖ (пик E); 2) максимальная скорость трансмитрального кровотока в период позднего диастолического наполнения (пик A); 3) их соотношение E/A; 4) время замедления кровотока раннего диастолического наполнения ЛЖ (DT, deceleration time); 5) время изоволюмического расслабления ЛЖ (IVRT). На основании данных параметров определялся тип диастолического наполнения ЛЖ.

Критериями исключения из исследования являлись [3]:

- Митральная регургитация, превышающая II степень
- Аортальная регургитация, превышающая II степень
- Тахикардия с ЧСС более 100 ударов в минуту
- Мерцательная аритмия на момент исследования

Для постановки рестриктивного типа диастолических нарушений необходимыми считали выполнение следующих условий: соотношение E/A $> 1,5$, ускорение DT менее 160 мсек, IVRT менее 70 мсек.

Диастолическая дисфункция по типу нарушенной релаксации диагностировалась при соотношении E/A < 1 ; по псевдонормальному типу при соотношении E/A от 1 до 1,5, DT 160–200 мсек, IVRT < 90 мсек в сочетании с гипертрофией ЛЖ, увеличенным размером левого предсердия.

Синхронно с изучением диастолической функции в В-, М-режимах измерялись размеры полости левого желудочка в систолу и диастолу: конечный систолический размер (КСР), конечный диастолический размер (КДР), толщина межжелудочковой перегородки (МЖП) и задней стенки (ЗС). Были рассчитаны показатели, харак-

теризующие функциональное состояние левого желудочка: конечный систолический объем (КСО), конечный диастолический объем (КДО), фракция выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ). Дополнительно определялись

Масса миокарда левого желудочка (ММЛЖ) :

• ММЛЖ (в граммах) = $0,8 * (1,04 * (\text{МЖПд} + \text{КДР} + \text{ЗСд}) - \text{КДРЗ}) + 0,6$

Индекс массы миокарда левого желудочка (в г/м²):

• ИММЛЖ = ММЛЖ / ППТ (ППТ – площадь поверхности тела)

Статистическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета Statistica 6.0. Изучаемые количественные признаки представлены в работе в виде $M \pm Sd$, где M – среднее арифметическое, Sd – стандартное отклонение. Для сравнения показателей в динамике применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Различия показателей считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У пациентов с рестриктивным типом диастолической дисфункции наблюдались увеличенные до $4,13 \pm 0,38$ см размеры левого предсердия и дилатация полостей левого желудочка (табл. 1). Доказано, что размеры левого предсердия отражают конечно – диастолическое давление в левом желудочке [9], которое как известно существенно возрастает при нарушениях расслабления миокарда. Высокий ИММЛЖ – $146,76 \pm 53,39$ г/м² подтверждает мнение многих исследователей, что гипертрофия левого желудочка является независимым предиктором развития диастолической дисфункции [5]. Сочетание у исследуемых пациентов дилатации левого предсердия с повышенным ИММЛЖ согласуется с данными Mattioli AV с соавт., продемонстрировавшими тесную взаимосвязь между размерами левого предсердия, толщиной стенок левого желудочка и диастолическими нарушениями [10]. Исходно сниженная ФВ ($45,63 \pm 6,31\%$) подтверждает концепцию о том, что прогрессирующая патология диастолы на определенных этапах вызывает расстройство контрактильности [12]. Следует отметить, что нарушение локальной сократимости в нашем исследовании было выявлено у 100% пациентов: ИНЛС составил в среднем $1,35 \pm 0,20$.

После проведения хирургической реваскуляризации отмечались позитивные изменения параметров, отражающих диастолическую функцию. Снижение исходно высокого пика Е до $0,96 \pm 0,11$, с одномоментным повышением сниженного пика А до $0,59 \pm 0,07$, нашло свое отражение в высокодостоверном ($p < 0,0000$) снижении соотношения Е/А на 11,37% от исходного. Произошло значимое ($p < 0,0000$) удлинение DT на 15,25% от исходного, достигнув $139,92 \pm 17,73$ мс. IVRT также достоверно ($p < 0,0000$) удлинилось на 7,77% от исходного, составив $66,55 \pm 5,23$ мс. Безусловно, удлинение данных временных интервалов следует считать положительной динамикой, так как исходно короткие DT – $123,14 \pm 18,82$ мс и IVRT – $66,55 \pm 5,23$ мс маркировали высокое давле-

ние в полости левого предсердия. Важно подчеркнуть, что количественное улучшение диастолической функции произошло у 41 больного (87,76%), однако только у семи (14,29%) из них изменение параметров было настолько выраженным, что позволило зарегистрировать псевдонормальный тип трансмитрального кровотока. У оставшихся 12,24% ($n=6$) наблюдалось повышение соотношения Е/А и укорочение времени DT и IVRT. У всех этих пациентов в послеоперационном периоде развились осложнения, оказывающие негативное влияние на диастолическую функцию [11, 7]. У пяти из них был зафиксирован посткардиотомный синдром, у трех – плеврит, у всех наблюдалась анемия.

Параллельно с улучшением расслабления миокарда левого желудочка произошло улучшение его сокращения. КСР значимо уменьшился с $4,38 \pm 0,72$ см до $4,07 \pm 0,75$ см ($p=0,00004$), КСО достоверно снизился с $93,33 \pm 35,71$ мл до $77,67 \pm 36,74$ мл ($p < 0,00000$). Данные изменения произошли на фоне отсутствия значимой динамики со стороны КДР и КДО. Аналогичные результаты были получены Carг JA с колл, которые описали достоверное возрастание ФВ после КШ за счет значимого уменьшения систолических размеров при неизменных диастолических [4]. Достоверное ($p < 0,0000$) увеличение ФВ до $53,14 \pm 7,31\%$, при одновременном ($p < 0,0000$) снижении ИНЛС до $1,20 \pm 0,13$ указывает, что улучшение контрактильной способности в определенной мере произошло благодаря включению в сокращение участков миокарда, ранее находящихся в гибернирующем состоянии. Подтверждением этой версии служит выявленная значимая отрицательная корреляция между процентом снижения ИНЛС и процентом прироста ФВ ($R_s = -0,46$, $p=0,0009$) (рис. 1). Достоверная отрицательная корреляция ($R_s = -0,51$, $p=0,0002$) между процентом снижения ИНЛС и удлинением времени DT демонстрирует, что переход гибернирующих участков в рабочее

Таблица 1

Динамика ЭХО-КГ параметров до и после КШ у пациентов с исходно рестриктивным типом трансмитрального потока

	До КШ	После КШ в раннем периоде	p	Δ
Е, м/с	$1,02 \pm 0,16$	$0,96 \pm 0,11$	0,006*	4,56
А, м/с	$0,55 \pm 0,08$	$0,59 \pm 0,07$	0,0002*	8,59
Е/А	$1,88 \pm 0,23$	$1,66 \pm 0,23$	<0,0000*	11,37
DT, мс	$123,14 \pm 18,82$	$139,92 \pm 17,73$	<0,0000*	15,25
IVRT, мс	$61,79 \pm 6,38$	$66,55 \pm 5,23$	<0,0000*	7,77
ЛП, см	$4,13 \pm 0,38$	$4,01 \pm 0,35$	0,006*	2,63
КСР, см	$4,38 \pm 0,72$	$4,07 \pm 0,75$	0,00004*	6,65
КСО, мл	$93,33 \pm 35,71$	$77,67 \pm 36,74$	<0,0000*	16,87
КДР, см	$5,75 \pm 0,74$	$5,71 \pm 0,78$	0,80	0,45
КДО, мл	$170,86 \pm 52,10$	$162,58 \pm 55,34$	0,24	4,25
ФВ, %	$45,63 \pm 6,31$	$53,14 \pm 7,31$	<0,0000*	17,42
ИММЛЖ, г/м ²	$146,76 \pm 53,39$	$145,77 \pm 51,58$	0,54	0,66
ИНЛС	$1,35 \pm 0,20$	$1,20 \pm 0,13$	<0,0000*	10,09

* $p < 0,05$.

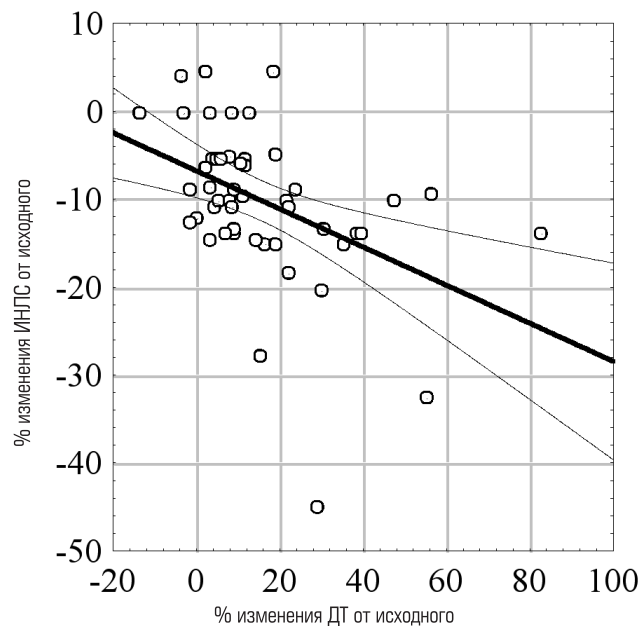
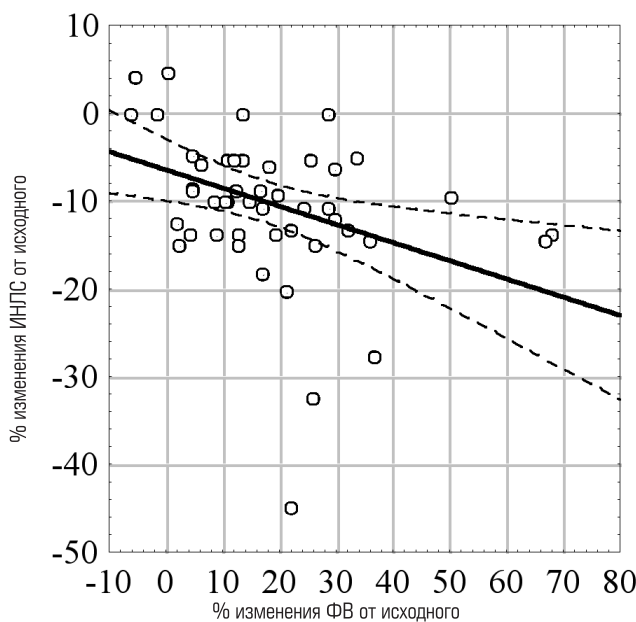


Рис. 1. Взаимосвязь процента изменения ИНПС от исходного с процентом изменения ФВ и DT от исходного

состояние оказал позитивное воздействие и на диастолическую функцию (рис. 1).

Особый интерес представляет изучение параллельных изменений систолической и диастолической функций вследствие реваскуляризации. Процент изменения ФВ от исходной значимо отрицательно взаимосвязан ($R_s = -0,37$, $p = 0,009$) с соотношением E/A и достоверно позитивно коррелирует ($R_s = 0,29$, $p = 0,04$) с IVRT.

В позднем периоде выявлена тенденция к увеличению соотношения E/A с $1,66 \pm 0,23$ до $1,76 \pm 0,52$ в сравнении с ранним периодом ($p = 0,18$) (табл. 2). Данная тенденция обуславливает отсутствие достоверных различий по соотношению E/A между исходными данными и в позднем периоде (табл. 3). Следует отметить, что, несмотря на колебания данного показателя на различных этапах наблюдения, его максимальное значение $1,88 \pm 0,23$ было зарегистрировано до операции.

На первый взгляд сложилась парадоксальная ситуация в отношении временных параметров диастолической функции ЛЖ (табл. 2). При тенденции к нарастанию соотношения E/A в позднем периоде наблюдения наблюдалось удлинение временных интервалов в сравнении с ранним периодом. Данный факт привлекает внимание в связи с тем, что увеличение E/A маркирует повышение давления в левом предсердии, что закономерно должно отразиться укорочением времени замедления пика E. Однако в данном исследовании наблюдалось незначительное удлинение DT $142,11 \pm 36,80$ мс в позднем периоде, в сравнении с $139,92 \pm 17,73$ мс в раннем периоде. Подобные феномены могут возникать при выраженных изменениях разнонаправленного характера. В пользу данной версии служит увеличение стандартного отклонения у DT практически в 2 раза, у IVRT в 3 раза в сравнении с ранним периодом. Другим аргументом является снижение достоверности различий по времени DT

($p < 0,0000$) между исходным и ранним периодом в сравнении с ($p = 0,02$) между исходным и поздним периодом, при том что его прирост вырос с $15,25\%$ от исходного в раннем периоде до $18,23\%$ от исходного в позднем периоде. Следовательно, у пациентов в позднем периоде произошли выраженные значительные изменения DT в сравнении с ранним периодом, однако они носили противоположный характер. Сохранение достоверного ($p = 0,02$) отличия DT исходного ($123,14 \pm 18,82$) от DT в позднем периоде ($142,11 \pm 36,80$) является позитивным моментом вследствие двух причин. Во-первых, данный показатель косвенно указывает на то, что в позднем периоде давление в левом предсердии осталось значительно ниже исходного, а во-вторых, в позднем периоде DT длиннее 125 мс. Последний факт является актуальным,

Таблица 2

Динамика ЭХО-КГ параметров в раннем и отдалённом периодах после КШ у пациентов с исходно рестриктивным типом трансмитрального потока

Показатель	После КШ в раннем периоде	Поздний период	P	Δ
E, м/с	$0,96 \pm 0,11$	$0,99 \pm 0,18$	0,14	4,10
A, м/с	$0,59 \pm 0,07$	$0,60 \pm 0,16$	0,72	3,49
E/A	$1,66 \pm 0,23$	$1,76 \pm 0,52$	0,18	7,77
DT, мс	$139,92 \pm 17,73$	$142,11 \pm 36,80$	0,36	0,77
IVRT, мс	$66,55 \pm 5,23$	$67,61 \pm 16,91$	0,55	2,77
ЛП, см	$4,01 \pm 0,35$	$4,15 \pm 0,35$	0,003	3,95
КСР, см	$4,07 \pm 0,75$	$4,29 \pm 0,76$	0,0006	6,05
КСО, мл	$77,67 \pm 36,74$	$86,15 \pm 39,24$	0,0009	16,35
КДР, см	$5,71 \pm 0,78$	$5,76 \pm 0,79$	0,15	1,05
КДО, мл	$162,58 \pm 55,34$	$167,85 \pm 55,26$	0,003	4,67
ФВ, %	$53,14 \pm 7,31$	$49,63 \pm 7,36$	0,002	5,62
ИММЛЖ, г/м ²	$145,77 \pm 51,58$	$151,40 \pm 50,79$	0,001	8,36
ИНПС	$1,20 \pm 0,13$	$1,21 \pm 0,11$	0,50	1,11

* $p < 0,05$

Таблица 3

Динамика ЭХО-КГ параметров до и после КШ у пациентов с исходно рестриктивным типом трансмитрального потока

Показатель	До КШ	Поздний период	p	Δ
E	1,02±0,16	0,99±0,18	0,52	1,40
A	0,55±0,08	0,60±0,16	0,10	11,18
E/A	1,88±0,23	1,76±0,52	0,11	5,57
DT	123,14±18,82	142,11±36,80	0,02*	18,23
IVRT	61,79±6,38	67,61±16,91	0,12	9,77
ЛП	41,33±3,77	41,53±3,45	0,43	1,00
КСР	4,38±0,72	4,29±0,76	0,51	1,77
КСО	93,33±35,71	86,15±39,24	0,08	6,01
КДР	5,75±0,74	5,76±0,79	0,19	0,35
КДО	170,86±52,10	167,85±55,26	0,87	1,00
ФВ	45,63±6,31	49,63±7,36	0,0006*	10,02
ИММЛЖ	146,76±53,39	151,40±50,79	0,004*	8,00
ИНЛС	1,35±0,20	1,21±0,11	<0,00000	9,24

* p < 0,05.

так как укорочение DT менее 125 мс является предиктором неблагоприятных исходов [6].

Индивидуальный анализ подтвердил гипотезу, что в позднем периоде произошли более разнонаправленные изменения в отношении диастолической функции в сравнении с ранним периодом: у 38,78% (n=19) произошло увеличение соотношения E/A, из них у 34,69% (n=17) отмечалось замедление DT. Изолированное укорочение DT без синхронного увеличения E/A было выявлено у 4,08% (n=2). Представленные данные демонстрируют, что в позднем периоде у значимо (p=0,008) большего количества больных наблюдалось увеличение E/A, сопровождающееся укорочением DT. У 57,14% (n=28) пациентов произошло снижение E/A и одновременное удлинение DT. Из них в 16,32% (n=8) зафиксирован псевдонормальный тип трансмитрального кровотока, а у 6,12% (n=3) нарушение диастолической функции по типу нарушенной релаксации (рис. 2).

Таким образом, в позднем периоде имела выраженная (p=0,07) тенденция к более частому переходу рестриктивного типа в более легкие виды нарушения диастолической функции. Особый интерес представляет изучение дальнейшей динамики диастолических показателей в группах пациентов, имеющих на раннем этапе реабилитации существенное изменение данных параметров, как в позитивном так и в негативном направлении.

У исследуемых пациентов уменьшение или увеличение E/A в раннем послеоперационном периоде не обязательно сохранялось в позднем периоде (рис. 3).

Анализ типов диастолических нарушений выявил, что из шести пациентов, имеющих в раннем периоде псевдонормальный тип диастолической дисфункции, к рестриктивному типу в позднем периоде вернулись пять пациентов и лишь один сохранил псевдонормальный

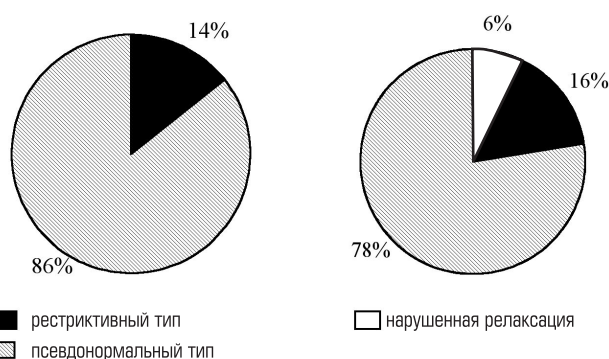


Рис. 2. Структура типов диастолических нарушений в раннем и позднем периодах наблюдения

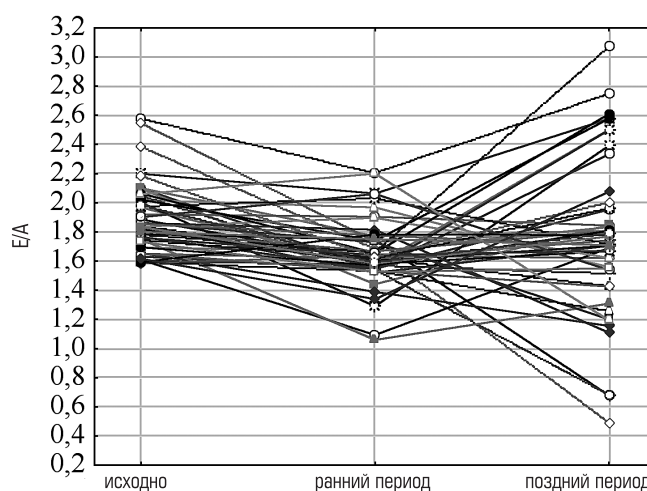


Рис. 3. Индивидуальная динамика соотношения E/A в раннем и позднем периодах после КШ

тип трансмитрального кровотока. В то же время из шести пациентов, имеющих в раннем периоде увеличение E/A и укорочение DT, в 33,33% данные параметры продолжали ухудшаться в позднем периоде, тогда как в остальных случаях наблюдалось улучшение данных показателей, достигнув у одного пациента (16,66%) перехода в псевдонормальный тип. Изучение динамики параметров диастолической функции выявило возможность их улучшения не только в раннем периоде после КШ, но и в последующее время. В пользу данного утверждения служит факт, что у 6,12% в позднем периоде зафиксирована диастолическая дисфункция по типу нарушенной релаксации, тогда как в раннем периоде данный тип трансмитрального кровотока не выявлен ни у одного участника исследования. Вероятно, это связано с возможностью гибернирующего миокарда включаться в работу на протяжении длительного периода после реваскуляризации. Сравнительный анализ ИНЛС подтвердил данную гипотезу: в позднем периоде у 20,41% больных наблюдалось снижение ИНЛС в сравнении с ранним периодом.

Следует отметить, что в позднем периоде показатели, характеризующие глобальную сократительную способность левого желудочка, сохранили свое преимущество в сравнении с исходными данными.

Выводы

1. Позитивная динамика параметров диастолической функции после хирургической реваскуляризации в раннем периоде отмечена у 87,76% пациентов с рестриктивным типом диастолической дисфункции (n=41), из них в 14,29% случаев наблюдался переход в псевдонормальный тип кровотока.

2. Оптимизация коронарного кровотока вследствие реваскуляризации приводит к сочетанному улучшению локальной и глобальной сократимости, диастолической функции левого желудочка, что подтверждается наличием корреляции между приростом фракции выброса, снижением ИНЛС, удлинением времени замедления пика Е.

3. Коронарное шунтирование позволяет остановить прогрессирование диастолических нарушений в течение 2,29±1,04 лет у пациентов с наиболее тяжелым типом диастолической дисфункции – рестриктивным.

4. Динамика диастолических показателей в позднем периоде не является строго ассоциированной с изменениями, имевшими место в раннем послеоперационном периоде. Ухудшение диастолической функции, возникшее в результате послеоперационных осложнений, нивелируется в отдаленном периоде наблюдений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев Ф.Т., Овчинников А.Г. Диастолическая дисфункция как проявление ремоделирования сердца // Сердечная недостаточность. – 2002. – Том 3. – № 4. – С. 190–195.

2. Викентьев В.В. Ишемия миокарда и нарушение диастолической функции левого желудочка // Р.М.Ж. – 2000. – Том 8. – № 5. – С. 12–15.

3. Терещенко С. Н., Демидова И.В., Александрия Л.Г. и др. Диастолическая дисфункция левого желудочка и ее роль в развитии хронической сердечной недостаточности // Сердечная недостаточность. – 2000. – Том 1. № 2. – с. 82–86

4. Carr J.A., Haithcock B.E., Paone G. et al. Long-term outcome after coronary artery bypass grafting in patients with severe left ventricular dysfunction // Ann. Thorac. Surg. – 2002. – Vol. 74. – № 5. – P. 1531–1536.

5. Fischer M., Baessler A., Hense H.W et al. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community // Eur. Heart. J. – 2003. – Vol. 24. – № 4. – P. 320–328.

6. Giannuzzi P., Temporelli P.L., Bosimini E. et al. Independent and incremental prognostic value of Doppler-derived mitral deceleration time of early filling in both symptomatic and asymptomatic patients with left ventricular dysfunction // J. Am. Coll. Cardiol. – 1996. – Vol. 28. – № 2. – P. 383–390.

7. Haney S., Sur D., Xu Z. Diastolic heart failure: a review and primary care perspective // The Journal of the American Board of Family Practice. – 2005. – Vol. 18. – P.189–198.

8. Kamel C. S., Siqueira-Filho A.G., M.Barreto L.F. et al. Congestive heart failure. Correlation between functional class and systolic and diastolic functions assessed by Doppler

echocardiography // Arq. Bras. Cardiol. – 2001. Vol.76. – № 2. – P. 1024–1028

9. Lim T.K., Ashrafian H., Dwivedi G. et al. Increased left atrial volume index is an independent predictor of raised serum natriuretic peptide in patients with suspected heart failure but normal left ventricular ejection fraction: Implication for diagnosis of diastolic heart failure. / Eur. J. Heart Fail. – 2006. – Vol. 8. – № 1. – P. 38–45.

10. Mattioli A.V., Bonatti S., Monoporoli D. et al. Influence of regression of left ventricular hypertrophy on left atrial size and function in patients with moderate hypertension // Blood Press. – 2005. – Vol. 14. – № 5. – P. 273–278

11. Nair D, Shlipak MG, Angeja B. et al. Association of anemia with diastolic dysfunction among patients with coronary artery disease in the Heart and Soul Study // Am. J. Cardiol. – 2005. – Vol. 95. № 3. P. 332–336.

12. Poulsen S.H. Clinical aspects of left ventricular diastolic function assessed by Doppler echocardiography following acute myocardial infarction // Dan. Med. Bull. – 2001. – Vol. 48. – № 4. – P. 199–210.

13. Sakate Y., Yoshiyama M., Hirata K. Relation between Doppler-Derived left ventricular diastolic function and exercise capacity in patients with myocardial infarction // Jpn. Circ. O. – 2001. – Vol. 65. – P. 627–631.

*S. Suchanov, I. Ryamzina, A. Tuyev,
I. Timofeeva*

CORONARY BYPASS INFLUENCE AT RESTRICTIVE DIASTOLIC FUNCTION AT ISCHEMIC HEART DISEASE PATIENTS

The left ventricle diastolic function changes after coronary artery bypass grafting are studied in early and late postoperative period. 49 patients with restrictive diastolic dysfunction were examined preop, intraop and postop. At 87,6% patients an improvement of diastolic function is fixed in early postop period, including transformation into pseudonormal type of diastolic dysfunction at 14,29% patients. Coronary flow optimization owing to revascularization brings to complex improvement of local, global and left ventricle diastolic function confirmed by correlation between left ventricle ejection fraction changes, decreasing of wall motion score index and peak E deceleration time. According to the data of our study in the period of 2,29±1,04 years no progressive diastolic disturbances are observed at patients after coronary bypass surgery with the restrictive type of diastolic dysfunction – the most severe one. Diastolic parameters dynamics in postop period is not strongly associated with early postop alternations. In the long term observation an early postop diastolic function regress caused by postop complications has gone.

А.Б. Толкач, В.Т. Долгих, В.В. Мороз¹, Ю.В. Толкач
**ПЕЧЕНОЧНО-ПОЧЕЧНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АБДОМИНАЛЬНОМ СЕПСИСЕ**

Омская государственная медицинская академия, г. Омск, ¹НИИ общей реаниматологии РАМН, г. Москва

Роль различных органов в патогенезе абдоминального сепсиса неравнозначна [1, 6, 7]. С одной стороны, это обусловлено их разной функционально-метаболической ролью в организме, а соответственно и разной компенсаторной нагрузкой на них в критических ситуациях, а выраженность повреждения различных органов зависит от первичной локализации патологического очага [5, 7]. Так, печень в условиях интраабдоминальной локализации инфекционного процесса является первым органом, который берет на себя барьерную роль и весь объем процессов детоксикации на начальных этапах развития абдоминального сепсиса. Учитывая вышесказанное, цель настоящего исследования – определить характер метаболических изменений в печени и почках и роль печеночно-почечной недостаточности в развитии абдоминального сепсиса.

Материалы и методы

В эксперименте было использовано 32 собаки массой $10,1 \pm 0,72$ кг, которые были разбиты на 3 группы: I группа – здоровые наркотизированные животные ($n=12$), служившие контролем, у которых на фоне ИВЛ проводили забор биологических жидкостей (кровь, моча, ликвор) для биохимических исследований. После лапаротомии иссекали кусочки печени и почек. II группа – животные с перитонитом и абдоминальным сепсисом ($n=10$), у которых спустя 12 часов после внутрибрюшинного инфицирования на фоне ИВЛ проводили забор биологических жидкостей, а после лапаротомии иссекали кусочки печени и почек. III группа – животные ($n=10$), у которых развивался перитонит, тяжелый абдоминальный сепсис и септический шок и у которых спустя 24 часа после инфицирования каловой взвесью на фоне ИВЛ проводили забор биологических жидкостей, а после лапаротомии иссекали кусочки печени и почек. У животных II и III групп перитонит вызвали внутрибрюшным введением каловой взвеси в дозе $0,11$ г/кг. Наличие абдоминального сепсиса подтверждалось при сопоставлении клинико-лабораторных параметров с контролем. На модели абдоминального сепсиса изучали в динамике 12- и 24-часового перитонита функциональное состояние печени и почек собак, анализируя биохимические параметры, критерии интенсивности перекисного окисления липидов и тяжести эндотоксикоза. Оце-

нивали эндогенную интоксикацию путем определения веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ). Сатурация кислорода определялась путем наложения датчика пульсоксиметра «Omeda» на язык животного. Проводилась следующая подготовка животных к эксперименту: премедикация (атропин $0,1\%$ – $0,5$ мл), под внутримышечным тиопентал-натриевым наркозом ($25\text{--}30$ мг/кг) и местной анестезией раствором новокаина ($0,25\%$ – $10,0$ мл) выделяли и катетеризовали полиэтиленовыми катетерами диаметром $1,0$ мм правую бедренную вену и левую бедренную артерию. Осуществляли внутривенный наркоз тиопенталом натрия $2,5\%$ раствором (10 мг/кг), проводили миорелаксацию дитилином (2 мг/кг) и интубировали трахею интубационной трубкой № 9,0 с помощью ларингоскопа с прямым клинком. Искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) осуществляли с помощью аппарата РО-6 (минутный объем вентиляции $2\text{--}3$ л/мин, дыхательный объем $200\text{--}300$ мл). Результаты исследований подвергали статистической обработке, используя методы параметрического (t-критерий Стьюдента), непараметрического и корреляционного анализа. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Наличие гнойно-воспалительного очага в брюшной полости приводит к включению срочных механизмов компенсации, которые в первую очередь направлены на коррекцию гемодинамических и ишемических нарушений в организме, обусловленных поступлением в системный кровоток продуктов нарушенного метаболизма, перекисного окисления липидов, ферментов и бактерий [1, 5, 7]. Следствием этого становятся выраженные метаболические нарушения, развивающиеся в организме собак. Уже через 12 часов перитонеального процесса у животных появляются симптомы дыхательной недостаточности: тахипноэ, участие в дыхании вспомогательной мускулатуры, снижение сатурации кислорода (табл. 1).

Именно гипоксия является ключевым фактором, определяющим выраженность метаболических нарушений в тканях [5, 10, 12, 13]. Наиболее чувствительным к гипоксии является углеводный обмен, показатели которого (табл. 1) свидетельствуют о выраженных дефектах утилизации глюкозы уже че-

Динамика показателей, отражающих общее состояние собак при каловом перитоните (M±m)

Показатель	Группы животных		
	I (n=12)	II (n=10)	III (n=10)
ЧСС, мин ⁻¹	160±4,8	190 ±7,1*	95±8,5*** ^ ^ ^
АДср., мм рт. ст.	146,6±5,7	91,2±12,3***	86,7±4,4***
ЦВД, см вод. ст.	3,2±0,3	9,3±0,7***	9,3±1,4***
ЧД, мин ⁻¹	18,0±0,5	44,0±1,4***	28,0±2,3*** ^ ^ ^
SpO ₂ , %	94,8±0,3	86,3±3,0*	77,5±1,1*** ^ ^ ^
Показатель гематокрита, л/л	0,45±0,143	0,64±0,536**	0,56±0,158***
Эритроциты, 10 ¹² /л	4,83±0,18	6,62±0,04***	5,06±0,41 ^ ^
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,7±0,58	17,3±2,96***	3,65±0,62*** ^ ^ ^
Палочкоядерные, %	8,75±1,65	32,6±0,33***	33,0±3,46***
Лимфоциты, %	12,0±1,61	3,0±1,0***	13,6±2,7 ^ ^
Тромбоциты, 10 ³ /л	395±43,8	166±58,45**	218±24,0**
Глюкоза, ммоль/л	7,46±0,11	7,43±0,57	7,03±0,24
Креатинин, ммоль/л	71,2±4,2	86,0±10,0	66,0±9,0
Мочевина, ммоль/л	5,52±0,44	4,87±0,69	15,23±3,12** ^ ^
Белок, г/л	68,8±2,28	48,7±5,92**	56,8±6,16
Билирубин, мкмоль/л	7,7±0,57	4,66±0,87**	7,7±0,49 ^ ^
Молочная кислота, ммоль/л	0,28±0,02	0,84±0,06***	0,32±0,05 ^ ^ ^
Мочевая кислота, ммоль/л	47,2±1,2	120,6±2,27***	85,3±5,4*** ^ ^ ^
Пируват, мкмоль/л	306±9,9	297±16,5	251±11,9***

Примечание: 1. I - контроль, II и III - абдоминальный сепсис, соответственно через 12 и 24 часа после заражения;
2. * P_{I-II}, P_{I-III} < 0,05; ** P_{I-II}, P_{I-III} < 0,01; *** P_{I-II}, P_{I-III} < 0,001; ^ P_{II-III} < 0,05; ^^ P_{II-III} < 0,01; ^^^ P_{II-III} < 0,001.

Таблица 2

Влияние абдоминального сепсиса на метаболические процессы в печени (M±m)

Показатель	Группы животных		
	I (n=12)	II (n=10)	III (n=10)
МДА, ммоль/л	2,58±0,119	2,80±0,077	1,99±0,110** ^ ^ ^
Глутатион, ммоль/л	0,84±0,015	0,62±0,034***	0,70±0,034***
Г-6-ФДГ, ммоль/ч.л	1,54±0,069	1,10±0,040***	1,08±0,041***
Глюкоза, ммоль/л	13,5±0,36	5,3±0,30***	2,3±0,24*** ^ ^ ^
Пируват, мкмоль/л	477±38,0	322±17,6**	272±11,8*** ^
Мочевая кислота, ммоль/л	726±24,5	690±14,6	578±11,2***

Примечание: 1. I - контроль, II и III - абдоминальный сепсис, соответственно через 12 и 24 часа после заражения;
2. * P_{I-II}, P_{I-III} < 0,05; ** P_{I-II}, P_{I-III} < 0,01; *** P_{I-II}, P_{I-III} < 0,001; ^ P_{II-III} < 0,05; ^^ P_{II-III} < 0,01; ^^^ P_{II-III} < 0,001.

рез 12 часов течения абдоминального сепсиса. Критерием тяжести гипоксии в организме считается избыток молочной кислоты в крови, которая является конечным продуктом анаэробного расщепления глюкозы, переключение на который происходит в условиях недостатка кислорода [4, 8]. Концентрация лактата в крови животных через 12 часов после инфицирования увеличена на 257% по сравнению с контролем, тогда как через 24 часа - только лишь на

14,2%, что свидетельствует об истощении пула субстратов углеводного обмена в ходе неэффективного в плане энергообразования анаэробного гликолиза.

В условиях гипоксии и повышенного расхода глюкозы в анаэробном гликолизе организм вынужден за счет срочных механизмов компенсации поддерживать адекватный уровень гликемии. С одной стороны, в первые 12 часов от момента инфицирования брюшной полости компенсация достигается за счет

Влияние абдоминального сепсиса на метаболические процессы в почках ($M \pm m$)

Показатель	Группы животных		
	I (n=12)	II (n=10)	III (n=10)
МДА, ммоль/л	1,71±0,126	1,90±0,096	1,93±0,095
Глутатион, ммоль/л	0,49±0,010	0,75±0,023***	0,48±0,016 ^ ^ ^
Г-6-ФДГ, ммоль/ч л	0,98±0,025	1,11±0,034**	0,86±0,017** ^ ^ ^
Глюкоза, ммоль/л	2,6±0,08	9,6±0,48***	3,6±0,50 ^ ^ ^
Пируват, мкмоль/л	323±17,9	232±13,3***	229±8,2***
Мочевая кислота, ммоль/л	164±12,1	153±5,9	140±3,3 ^

Примечание: I – контроль, II и III – абдоминальный сепсис, соответственно через 12 и 24 часа после заражения; 2. * $P_{I-II}, P_{I-III} < 0,05$; ** $P_{I-II}, P_{I-III} < 0,01$; *** $P_{I-II}, P_{I-III} < 0,001$; ^ $P_{II-III} < 0,05$; ^ ^ $P_{II-III} < 0,01$; ^ ^ ^ $P_{II-III} < 0,001$.

повышенного распада гликогена и ускорения глюконеогенеза в печени под действием контринсулярных гормонов (адреналина, АКТГ, кортизола) в условиях гипофункции инсулярного аппарата поджелудочной железы, обусловленной гипоксией. Об этом свидетельствует снижение содержания глюкозы в печени на 61,0% во II группе и на 83% – в III группе по сравнению с контролем (табл. 2). Через 24 часа наступает практически полное истощение гликогенного резерва печени, о чем свидетельствует снижение концентрации глюкозы и лактата в сыворотке крови (табл. 1). Вместе с тем выявляется повышение содержания глюкозы в ткани почек на 272,3% через 12 часов после инфицирования, очевидно, за счет гиперпродукции глюкозы печенью как ответной реакции организма на ацидоз и стресс.

С другой стороны, имеются публикации о том, что глюконеогенез в почках осуществляется не только за счет пирувата и лактата, но и метаболитов цикла Кребса: α -кетоглутарата и сукцината [3, 11]. Эффективность глюконеогенеза в почках увеличивается пропорционально содержанию в них этих субстратов, а в условиях гипозергоза и печеночной дисфункции за счет глюконеогенеза может образовываться до 50% всей глюкозы организма. Это подтверждается уменьшением содержания пирувата на 28,4% (на фоне неизменного содержания его в крови) и увеличением в 2,7 раза содержания глюкозы в почках через 12 часов после инфицирования брюшной полости. Уровень пирувата в почках сохраняется пониженным и через 24 часа абдоминального сепсиса (табл. 3).

Учитывая изложенное выше, можно заключить, что предел компенсации в отношении поддержания адекватного количества глюкозы в крови, а соответственно и адекватного уровня обеспеченности энергией тканей организма составляет около 12 часов и зависит, главным образом, от содержания гликогена в печени и скелетных мышцах [4, 8]. При этом, по-видимому, гликогенолиз как механизм поддержания гликемии при критических состояни-

ях более устойчив и вносит большой вклад в процесс поддержания уровня глюкозы в крови. Об этом свидетельствует угнетение процессов глюконеогенеза уже через 12 часов в печени на фоне соответствующей контрольным значениям концентрации глюкозы крови. Об угнетении глюконеогенеза в печени свидетельствует и тот факт, что в условиях дефицита энергии на фоне снижения содержания глюкозы в печени происходит одновременное снижение содержания пирувата на 32,6% и 43% через 12 и 24 часа (табл. 2). Почки в данном случае выполняют второстепенную роль, поскольку их вклад в продукцию глюкозы напрямую зависит от процессов образования глюкозы из гликогена в печени с последующим окислением ее до субстратов глюконеогенеза на периферии.

Ишемия тканей, возникающая вследствие гемодинамических нарушений при абдоминальном сепсисе, приводит к чрезмерной активации процессов перекисного окисления липидов, которые наряду с выраженной метаболической дисфункцией приводят к необратимому повреждению клеток. Об этом свидетельствуют как показатели, характеризующие интенсивность процессов ПОЛ (малоновый диальдегид и мочевая кислота), так и те, которые свидетельствуют об активности механизмов антиоксидантной защиты (глутатион – естественный антиоксидант и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, катализирующая первую реакцию пентозофосфатного шунта и одновременно контролирующая активность глутатионредуктазы).

Установлено, что в печени по мере нарастания интоксикации концентрация малонового диальдегида (МДА) имеет тенденцию к снижению (на 22,9% по сравнению с контрольными значениями). С одной стороны, это может быть связано с повышенным расходом глутатиона, этим объясняется снижение на 17% (табл. 2) по сравнению с контрольными значениями его содержания в гепатоцитах, а с другой – под таким феноменом может маскироваться более тяжелое повреждение гепатоцитов с

Содержание ВНСММ в тканях органов при экспериментальном сепсисе ($M \pm m$)

Показатель	Объект исследования	I (n=12)	Экспериментальные группы			
			II (n=10)	Прирост к контролю, %	III (n=10)	Прирост к контролю, %
ВНСММ, у.е.	Печень	71,3±5,01	56,4±2,19**	-20,9	72,8±3,03 ^ ^ ^	+2,1
	Почка	50,8±1,5	54,2±1,9	+6,6	64,1±3,47** ^	+26,1
	Плазма	5,9±0,26	7,7±0,5**	+30,5	7,1±0,49*	+20,3
	Эритроциты	10,9±1,02	12,6±1,10	+15,5	13,6±0,78*	+24,7
	Моча	25,2±5,0	31,0±6,70	+23,0	61,8±7,60*** ^ ^ ^	+145,2
ОП, у.е.	Печень	3,07±0,22	2,38±0,18*	-22,5	2,53±0,18*	-17,6
	Почка	1,86±0,06	1,60±0,02***	-14,0	2,31±0,19* ^ ^	+24,1

Примечание: 1. I – контроль, II и III – абдоминальный сепсис, соответственно через 12 и 24 часа после заражения; 2. * $P_{I-II}, P_{I-III} < 0,05$; ** $P_{I-II}, P_{I-III} < 0,01$; *** $P_{I-II}, P_{I-III} < 0,001$; ^ $P_{II-III} < 0,05$; ^ ^ $P_{II-III} < 0,01$; ^ ^ ^ $P_{II-III} < 0,001$.

необратимыми цитолитическими изменениями [2]. В пользу этого предположения говорит также и повышение на 155,5% и 80,7% содержания мочевой кислоты в крови у животных II и III групп (табл. 1), тогда как концентрация ее в ткани печени снижается по мере нарастания интоксикации. Мочевая кислота является конечным продуктом пуринового обмена, образуясь из гипоксантина и ксантина в печени под действием ксантиноксидазы, которая в условиях стресса может синтезировать большое количество свободнорадикальных форм кислорода в процессе превращения ксантина из гипоксантина, тем самым внося значительный вклад в повреждение мембран гепатоцитов в процессе интенсификации процессов ПОЛ [9].

Снижение концентрации восстановленного глутатиона в гепатоцитах на 27% и 17% через 12 и 24 часа течения абдоминального сепсиса обусловлено его повышенным расходом и недостаточной обеспеченностью им тканей печени, а также снижением активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), которая через глутатионредуктазу тормозит реакции восстановления глутатиона.

В отличие от печени, в клетках которой отмечается разобщение процессов ПОЛ и механизмов антиоксидантной защиты уже через 12 часов течения процесса (уменьшение содержания глутатиона, снижение активности Г-6-ФДГ), в почках это равновесие нарушается позднее – через 24 часа после инфицирования брюшной полости. У животных II группы отмечается повышение активности факторов антиоксидантной защиты: концентрация глутатиона и активность Г-6-ФДГ превышают контрольные значения на 53,1% и 13%. У животных же III группы концентрация глутатиона и активность Г-6-ФДГ в почках снижаются на 36% и 23,5% по отношению к таковым у животных II группы (табл. 3).

Выраженные метаболические нарушения, чрезмерная активность процессов ПОЛ, мобилизация лизосомальных ферментов, деструкция клеток в

ходе бактериальной агрессии ведет к образованию большого количества ВНСММ и развитию эндотоксемии. Оценить тяжесть эндогенной интоксикации позволяет определение концентрации ВНСММ. При изучении процессов детоксикации в печени отмечается уменьшение содержания олигопептидов на 22,5% и ВНСММ на 20,9% во II группе животных, что, по-видимому, связано с активацией процессов биотрансформации как компенсаторной реакции на гипоксию, интоксикацию, с повышенным использованием глутатиона (табл. 4). Однако по мере прогрессирования воспалительного процесса в брюшной полости, нарастания гемодинамических нарушений, артериальной гипотензии, гипоксии, ацидоза и гипопроотеинемии происходит замедление процессов биотрансформации и удаления токсинов из организма, о чем свидетельствует тенденция к нарастанию содержания олигопептидов и ВНСММ в III группе животных с тяжелым абдоминальным сепсисом. Происходит срыв компенсаторно-приспособительных возможностей печени, что сопровождается повреждением гепатоцитов.

Можно предположить, что, во-первых, часть ВНСММ переходит на гликокаликс эритроцитов как естественный абсорбент и выводится кровотоком из печени, во-вторых, захват и вывод ВНСММ через интерстиций по лимфатическим сосудам через портокавальный коллектор, и это может служить мерой защиты гепатоцита при массивном поступлении токсинов из органов брюшной полости. Об этом свидетельствует нарастание содержания ВНСММ на эритроцитах на 15,5% и в плазме на 30,5% в первые 12 часов, которые остаются повышенными и через 24 часа абдоминального сепсиса (табл. 4).

По нашему мнению, срыв компенсации в печени происходит в первые 12 часов течения процесса и к 24 часам абдоминального сепсиса печень, по-видимому, сама становится источником ВНСММ. Почки же в первые 12 часов после инфицирования, являясь активным органом детоксикации, выводят ВНСММ

с мочой: содержание ВНСММ в моче на 23% выше контрольных значений. Однако через 24 часа абдоминального сепсиса они начинают накапливать эндотоксины – содержание ВНСММ и олигопептидов в почечной ткани превышает контрольные значения на 26,1% и 24,1%, хотя выведение ВНСММ с мочой на 145,2% больше, чем в контроле (табл. 4).

Таким образом, ключевым звеном патогенеза абдоминального сепсиса у животных является необратимое повреждение печени с развитием ее недостаточности уже через 12 часов после инфицирования брюшной полости. При этом развиваются необратимые повреждения гепатоцитов, нарушается метаболическая и детоксикационная функции печени, и она становится источником ВНСММ, усугубляя эндотоксикоз. На начальных этапах печень сдерживает микробную агрессию и препятствует генерализации инфекции и развитию полиорганной недостаточности. Однако при декомпенсации ее функции непосредственно вслед за печеночной недостаточностью развивается и почечная.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гельфанд Е.Б., Гологорский В.А., Гельфанд Б.Р. Абдоминальный сепсис: интегральная оценка тяжести состояния больных и полиорганной дисфункции // Анест. и реаниматол. – 2000. – № 3. – С. 29–33.
2. Кару Т.Й. Первичные и вторичные клеточные механизмы лазерной терапии // Низкоинтенсивная лазерная терапия – М., 2000. – С. 71–94.
3. Кендыш И.Н. Регуляция углеводного обмена. – М.: Медицина, 1985. – 272 с.
4. Ленинджер А. Биохимия / Пер. с англ. – В 3-х томах. – М.: Мир. – 1985.
5. Мороз В.В., Лукач В.Н., Шифман Е.М. и др. Сепсис: Клинико-патофизиологические аспекты интенсивной терапии. – Петрозаводск: ИнтелТек, 2004. – 291 с.
6. Руднов В.А. Сепсис: Современный взгляд на проблему // Клиническая антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т.2, № 1. – С. 2–7.
7. Рябов Г.А. Синдромы критических состояний. – М.: Медицина, 1994. – 368 с.
8. Страйер Л. Биохимия / Пер. с англ. – В 3-х томах. – М.: Мир. – 1985.
9. Gutierrez G. Cellular energy metabolism during hypoxia // Crit. Care. Med. – 1991. – Vol. 19, № 5. – P. 619–626.
10. Kentner R., Safar P., Behringer W. et al. Early anti-oxidant therapy with tempol during hemorrhagic shock increases survival in rats // J. Trauma. – 2002. Vol. 53, № 5. – P. 968–977.
11. Kirton O., Civetta J. M. Ischemia-reperfusion injury in the critically ill: a progenitor of multiple organ failure // New Horizons. – 1999. Vol. 7, № 1. – P. 87–95.

12. Rajab A. Ar., Dawidson I., Fabia K. Reperfusion injury // New Horizons. – 1996. – Vol. 4, № 4. – P. 224–234.

13. Tan S., Yoshifumi Y., Wang Z. et al. Hypoxia re-oxygenation is as damagings as ischemia-reperfusion in the rat liver // Crit. Care. Med. – 1998. – Vol. 26, № 6. – P. 1089–1095.

*A.B. Tolkach, V.T. Dolgih,
V.V. Moroz¹, Y.V. Tolkach*

HEPATICORENAL INSUFFICIENCY IN EXPERIMENTAL ABDOMINAL SEPSIS

Omsk State Medical Academy, ¹Research Institute
of General Reanimatology, Russian Academy
of Medical Sciences

The authors investigated functional condition of the primary detoxication organs: liver and kidneys, – in the experimental model of abdominal sepsis performed on 32 inbred dogs. It was determined that the main pathogenic factors for abdominal sepsis were hypoxia, hyperactivity of the lipid peroxidation processes, metabolic breaks and endotoxemia. As far as the inflammatory process was developing the break of the compensatory and adaptive processes occurred in the primary detoxication organs – liver and kidneys. The key moment in pathogenesis of abdominal sepsis was damage of the hepatocytes and following hepatic dysfunction, when liver became the source of the substances of lower and medium molecular mass, aggravating endotoxemia. It was revealed, that renal insufficiency followed that of hepatic, creating the closed circle of endotoxemia.

И.В. Тимофеева

ОСОБЕННОСТИ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА У БОЛЬНЫХ ИБС ПОСЛЕ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

ГУЗ ПОКБ № 2 «Институт сердца» Филиал НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН

В свете современной концепции сердечной недостаточности выделяют два типа нарушений миокардиальной функции желудочков – систолический и диастолический [10]. Несмотря на то, что эти нарушения обладают идентичной патоморфологической и патогенетической основой, темпы их развития не имеют строгой линейной взаимосвязи. В частности, процессы расслабления миокарда более чувствительны к дефициту энергоресурсов, чем процессы сокращения [2]. У больных коронарной болезнью сердца нарушения диастолической функции наступают раньше, чем систолической, но в итоге приводят к снижению фракции выброса [18]. Известно, что коронарное шунтирование (КШ) улучшает как систолическую, так и диастолическую функцию у больных ИБС [11; 6]. В доступной литературе практически нет данных о синхронности восстановления процессов расслабления и сокращения миокарда после реваскуляризации. В связи с этим актуальным представляется оценить изменение диастолической функции левого желудочка (ЛЖ) после КШ и установить ее возможную взаимосвязь с динамикой систолической функции.

Материалы и методы

В Пермском институте сердца обследовано 366 больных ИБС, из которых 87,70% (n=321) составили лица мужского пола. Средний возраст пациентов – $55,97 \pm 8,71$ лет. Всем пациентам было проведено КШ, из них 83,61% (n=306) оперировано в условиях искусственного кровообращения (ИК), 15,85% (n=58) – без применения ИК. У 0,55% (n=2) операция была начата на «работающем» сердце, но затем потребовался переход на ИК.

Критериями исключения явились следующие:

- Постоянная форма мерцательной аритмии
- Митральная регургитация > II степени

Состояние диастолической функции оценивали дважды (до оперативного лечения и в раннем периоде на $4,1 \pm 1,8$ сутки) по трансмитральному диастолическому потоку (ТМДП). Программа ультразвукового исследования сердца проводилась на аппарате «Acuson» «Aspen» (США) с регистрацией результатов на магнито-оптических дисках. Исследования выполнялись датчиком 3,74 МГц. Определялись следующие показатели: 1) максимальная скорость трансмитрального кровотока в период раннего диастолического наполнения ЛЖ (пик E); 2) максимальная скорость трансмитрального кровотока в период позднего диа-

столического наполнения (пик A); 3) их соотношение E/A; 4) время замедления кровотока раннего диастолического наполнения ЛЖ (DT, deceleration time); 5) время изоволюмического расслабления ЛЖ (IVRT). На основании данных параметров определялся тип диастолического наполнения ЛЖ.

Критериями нормального наполнения являлись: соотношение E/A 1–2, DT 160–240 мсек, IVRT 70–90 мсек. Диастолическая дисфункция по типу нарушенной релаксации диагностировалась при соотношении E/A < 1; по псевдонормальному типу при соотношении E/A от 1 до 1,5, DT 160–200 мсек, IVRT < 90 мсек в сочетании с гипертрофией ЛЖ, увеличенным размером левого предсердия. Для постановки рестриктивного типа диастолических нарушений необходимыми считали выполнение следующих условий: соотношение E/A > 1,5, ускорение DT менее 160 мсек, IVRT менее 70 мсек [15].

Синхронно с изучением диастолической функции в В-, М-режимах измерялись размеры полости левого желудочка в систолу и диастолу: конечный систолический размер (КСР), конечный диастолический размер (КДР), толщина межжелудочковой перегородки (МЖП) и задней стенки (ЗС). Были рассчитаны показатели, характеризующие функциональное состояние левого желудочка: конечный систолический объем (КСО), конечный диастолический объем (КДО), фракция выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ). Дополнительно определялись

Масса миокарда левого желудочка (ММЛЖ) :

$$\bullet \dots \text{ММЛЖ (в граммах)} = 0,8 * (1,04 * (\text{МЖПд} + \text{КДР} + \text{ЗСд}) - \text{КДРз}) + 0,6$$

Индекс массы миокарда левого желудочка (в г/м²):

$$\bullet \text{ИММЛЖ} = \text{ММЛЖ} / \text{ППТ} \quad (\text{ППТ} - \text{площадь поверхности тела})$$

Статистическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета Statistica 6.0. Изучаемые количественные признаки представлены в работе в виде $M \pm Sd$, где M – среднее арифметическое, Sd – стандартное отклонение. Сравнение независимых групп по качественным признакам проводилось с помощью критерия Фишера, по количественным – с использованием непараметрического критерия Манн-Уитни. Для сравнения показателей в динамике применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Различия показателей считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Диастолическая дисфункция ЛЖ до операции была выявлена у 99,18% (n=363) пациентов. Данный факт является закономерным, так как недостаточное обеспечение миокарда кислородом приводит к возникновению дефицита макроэргических соединений, что в свою очередь способствует замедлению процесса раннего диастолического расслабления левого желудочка [1]. Следует отметить, что в развитие диастолической дисфункции у исследуемых пациентов, помимо ишемии, внесли вклад и другие факторы. Артериальная гипертония (АГ) была зарегистрирована у 78,14% (n=286) пациентов. Механизмы, вызывающие диастолические нарушения при АГ, обусловлены гипертрофией кардиомиоцитов и активацией фиброгенеза посредством ренин-ангиотензиновой системы [19, 20]. Гипертрофия левого желудочка, являющаяся независимым предиктором развития диастолических нарушений, была выявлена у 44,81% (n=164), из них 32 пациента были женского пола, имеющие ИММЛЖ > 110 и 132 пациента мужского пола с ИММЛЖ > 134 [8]. Другим фактором риска развития патологии диастолического процесса признан сахарный диабет (СД) [4]. В данном исследовании он зафиксирован у 6,83% (n=25) пациентов. Дальнейший анализ проводился в зависимости от типа нарушения трансмитрального кровотока. С этой целью были сформированы три группы: 1-я группа представлена 261 (71,31%) пациентом с диастолической дисфункцией по типу нарушенной релаксации левого желудочка; 2-я группа из 53 (14,48%) пациентов с псевдонормальным типом кровотока; 3-я группа из 49 (13,66%) пациентов с рестриктивным типом трансмитрального кровотока. Yu C.M. с соавт. также продемонстрировали в своем исследовании меньшую распространенность более тяжелых типов диастолических расстройств среди больных ИБС [23]. Возможно, это связано с тем, что для прогрессирования диастолической дисфункции необходимо нарушение не только активных, но и пассивных свойств миокарда, которые во многом зависят от состояния интерстиция. [1]. Обоснованность данной версии подтверждает анализ анамнестических данных, проведенный в зависимости от типа нарушений трансмитрального кровотока. У пациентов с более тяжелыми типами диастолических нарушений наблюдалось большее число факторов, способствующих из-

быточному отложению фиброзной ткани в миокарде. В частности, прослеживалась тенденция к более высокому возрастному цензу у пациентов с псевдонормальным и рестриктивным типами (табл. 1). В исследовании экспериментального характера показано негативное влияние возраста на процессы, происходящие в интерстициальной ткани [16]. Количество пациентов с ИМ в анамнезе превалировало в группе больных с нарушением диастолической функции по рестриктивному типу и составило 92%, в сравнении с 75,47% в группе с псевдонормальным типом и 66,28% в группе с нарушенной релаксацией левого желудочка ($p_{2,3}=0,02$; $p_{1,3}=0,001$). Доказано, что в 1-е сутки после ИМ повышается выработка трансформирующего ростового фактора В, который, как известно, играет ключевую роль в повышении синтетической активности фибробластов и подавлении металлопротеиназной активности [7, 16].

В группе с нарушенной релаксацией левого желудочка АГ встречалась достоверно реже, чем у пациентов с псевдонормальным типом. Однако строгой зависимости тяжести нарушения диастолической функции от наличия АГ мы не выявили. В группе с нарушенной релаксацией среди 67 пациентов без АГ 20 человек не имели в анамнезе ИМ, тогда как у всех 8 без АГ в группе с рестриктивным типом присутствовал в анамнезе ИМ с зубцом Q, у 4 из них имелось 2 и более ИМ в анамнезе. Вероятно, наличие ИМ в анамнезе явилось основой для развития рестриктивного типа диастолической дисфункции у данных пациентов. Следует акцентировать еще один момент: у пациентов без АГ в группе с нарушенной релаксацией средний возраст составил $53,75 \pm 9,19$ лет, тогда как средний возраст пациентов, не имеющих АГ в группе с рестриктивными нарушениями – $59,25 \pm 8,83$ лет. Совокупность данных факторов, по-видимому, и послужила причиной отсутствия значимых различий по количеству пациентов с АГ между наиболее легким и наиболее тяжелым типом диастолических нарушений. В отношении СД 2 типа наблюдалась тенденция к его более частой встречаемости среди пациентов с псевдонормальным и рестриктивным типами трансмитрального кровотока.

Данные, полученные при проведении эхокардиографии, указывали на закономерные структурные и функциональные изменения миокарда, усугубляющиеся при прогрессировании диастолических нарушений (табл. 2).

Таблица 1

Сравнительная оценка основных анамнестических данных изучаемых групп

Показатели	Группа 1 (n=261)	Группа 2 (n=53)	Группа 3 (n=49)	P _{1,2}	P _{2,3}	P _{1,3}
Возраст, лет	55,45±8,57	58,00±9,31	57,51±8,96	0,06	0,09	0,82
ИМ	66,28% (173)	75,47% (40)	93,88% (46)	0,13	0,01*	<0,000*
АГ	74,33% (194)	90,57% (48)	83,67% (41)	0,006*	0,23	0,11
СД	5,36% (14)	11,32% (6)	10,20% (5)	0,10	0,56	0,16

* p < 0,05.

Сравнительная оценка основных исходных ЭХО-КГ параметров изучаемых групп

Показатели	Группа 1 (n=261)	Группа 2 (n=53)	Группа 3 (n=49)	P ₁₋₂	P ₁₋₃	P ₂₋₃
ЛП, см	3,72±0,53	4,12±0,60	4,13±0,38	<0,0000*	<0,0000*	0,49*
КСР, см	3,43±0,53	3,89±0,67	4,38±0,72	<0,0000*	<0,0000*	<0,0000*
КСО, мл	51,01±19,21	69,12±29,01	93,33±35,71	<0,0000*	<0,0000*	<0,0000*
КДР, см	5,05±0,56	5,48±0,64	5,75±0,74	<0,0000*	<0,0000*	0,14*
КДО, мл	123,95±32,64	149,79±40,31	170,86±52,10	<0,0000*	<0,0000*	0,08*
ФВ, %	58,63±8,48	53,94±8,48	45,63±6,31	0,0009*	<0,0000*	<0,0000*
ИММЛЖ, г/м ²	121,86±37,16	159,32±31,18	146,76±53,39	<0,0000*	0,002*	0,01*

* p<0,05.

У пациентов с наиболее тяжелыми типами диастолической дисфункции – псевдонормальным и рестриктивным – имелось значимое ($p_{1-2} < 0,0000$; $p_{1-3} < 0,0000$) увеличение размеров левого предсердия. Полученные данные согласуются с результатами исследования, продемонстрировавшего, что объем левого предсердия является достоверным предиктором диастолических нарушений у пациентов с нормальной ФВ [12]. Увеличенные размеры левого предсердия у пациентов 2-й и 3-й групп в определенной мере связаны с достоверно большим процентом лиц с митральной регургитацией. Количество пациентов с митральной регургитацией в 1-й группе составило 26,82% (n=70), что достоверно ($p=0,01$) ниже, чем 43,40% (n=23) в группе с псевдонормальным типом, и также значимо ($p=0,04$) ниже, чем 40,82% (n=20) в группе с рестриктивными нарушениями диастолической функции.

Анализ размеров левого желудочка и ФВ показал, что у пациентов с нарушенной релаксацией и псевдонормальным типом данные параметры находятся в диапазоне нормальных значений. По данным разных авторов, от 30 до 50% пациентов имеют нормальную ФВ при наличии симптомов сердечной недостаточности [3, 22, 13]. Современная теория сердечной недостаточности предполагает более раннее развитие диастолических нарушений, вслед за которыми наступают нарушения контрактильности [18]. Аналогичная ситуация складывалась в данном исследовании: у пациентов с рестриктивным типом диастолических нарушений наблюдалась наиболее низкая ФВ – 45,63±6,31%. Логичным представляется факт синхронности снижения ФВ с увеличением полостей левого желудочка. КДР у пациентов 3-й группы составил 5,75±0,74 см в сравнении с 5,48±0,64 см во 2-й группе и 5,05±0,56 см в 1-й группе. Максимальное значение ИММЛЖ составило 159,32±31,18 и было зафиксировано у пациентов с псевдонормальным типом диастолических нарушений. В 3-й группе больных ИММЛЖ остается достоверно выше, в сравнении с пациентами с нарушенной релаксацией, однако он несколько ниже, чем у пациентов с псевдонормальным типом. Вероятным объяснением данного факта является истончение стенок ЛЖ на фоне дилатации полостей.

Дальнейшее исследование динамики ЭХО-КГ параметров после КШ проводилось в зависимости от исходного типа диастолических нарушений. В группе пациентов с нарушенной релаксацией наблюдались позитивные изменения параметров, характеризующих диастолическую функцию, после КШ. В данной группе произошло значимое ($p < 0,0000$) увеличение до 0,74±0,16 мсек исходно сниженной скорости раннего диастолического наполнения, уменьшение изначально высокой скорости позднего диастолического наполнения, что нашло свое отражение в увеличении их соотношения, которое в раннем периоде достигло нормальных значений. Учитывая этапность развития диастолической функции, следует иметь в виду, что имеющееся количественное изменение анализируемых параметров может свидетельствовать не только о нормализации диастолической функции, но и о псевдонормализации. Компенсаторное повышение давления в левом предсердии в ответ на нарушенную релаксацию может привести к временной нормализации соотношения Е/А [15]

Качественный анализ продемонстрировал, что переход в нормальный тип произошел у 33,33% (n=87) пациентов, а у 10,34% (n=27) пациентов наблюдалось ухудшение диастолической функции в виде перехода в псевдонормальный тип. Следует отметить

Таблица 3

Динамика ЭХО-КГ параметров до и после КШ у пациентов с исходно нарушенной релаксацией

Показатели	До КШ	После КШ	p
Е, м/с	0,55±0,11	0,74±0,16	<0,0000
А, м/с	0,74±0,12	0,70±0,10	<0,0000
Е/А	0,77±0,37	1,06±0,19	<0,0000
DT, мс	240,88±33,49	218,21±31,72	<0,0000
IVRT, мс	109,25±13,50	97,51±16,99	<0,0000
ЛП, см	3,73±0,53	3,71±0,48	0,52
КСР, см	3,43±0,53	3,36±0,49	0,0002*
КСО, мл	51,01±19,21	48,18±17,74	0,00004*
КДР, см	5,05±0,56	5,05±0,51	0,87
КДО, мл	123,95±32,64	123,83±29,97	0,92
ФВ, %	58,63±8,48	61,56±6,81	<0,0000*
ИММЛЖ г/м ²	121,86±37,16	122,24±34,30	0,71

* p<0,05.

достоверную ($p=0,0002$) позитивную динамику КСР ЛЖ, который уменьшился до $3,36 \pm 0,49$ см. Улучшение контрактильности миокарда нашло свое отражение в значимом приросте ФВ. Принимая во внимание высокую вероятность наличия гибернирующего миокарда у пациентов с ИБС, логично предположить, что столь выраженное увеличение контрактильной способности миокарда произошло благодаря включению в сокращения гибернирующих участков. Особенный интерес представляет сравнительный анализ прироста ФВ у пациентов с переходом в псевдонормальный тип в сравнении с остальными пациентами 1-й группы. У 27 пациентов, имеющих качественное ухудшение диастолической дисфункции ФВ после КШ снизилась на 7,77% от исходной, тогда как у остальных 234 пациентов ФВ увеличилась на 5,19 % от исходного значения. Представленные данные свидетельствуют о синхронности динамики систолической и диастолической функций после КШ у пациентов с исходно нарушенной релаксацией ЛЖ. ИММЛЖ, как и ожидалось, не претерпел значимых изменений.

Динамика ЭХО-КГ параметров у пациентов с исходно псевдонормальным типом отражена в таблице 4. Анализ показателей, характеризующих диастолические свойства миокарда, не выявил достоверных различий.

Однако при несущественных изменениях средних величин после КШ наблюдалось заметное увеличение стандартного отклонения у таких параметров, как соотношение Е/А и DT. Этот факт позволяет предположить выраженные разнонаправленные изменения, произошедшие в данной группе. Качественный анализ подтвердил данное предположение. Переход в более легкий тип диастолической дисфункции наблюдался у 26,42% ($n=14$) пациентов, тогда как переход в рестриктивный тип был выявлен у 11,32%

Таблица 4

Динамика ЭХО-КГ параметров до и после КШ у пациентов с исходно псевдонормальным типом трансмитрального потока

Показатели	До КШ	После КШ	p
Е, м/с	$0,87 \pm 0,14$	$0,86 \pm 0,16$	0,50
А, м/с	$0,71 \pm 0,08$	$0,73 \pm 0,11$	0,64
Е/А	$1,23 \pm 0,16$	$1,21 \pm 0,27$	0,56
DT, мс	$184,38 \pm 21,25$	$191,94 \pm 29,14$	0,18
IVRT, мс	$81,35 \pm 12,07$	$81,77 \pm 12,42$	0,88
ЛП, см	$4,12 \pm 0,60$	$4,03 \pm 0,59$	0,033*
КСР, см	$3,89 \pm 0,67$	$3,75 \pm 0,57$	0,002*
КСО, мл	$69,12 \pm 29,01$	$62,11 \pm 23,70$	0,0003*
КДР, см	$5,48 \pm 0,64$	$5,44 \pm 0,64$	0,47
КДО, мл	$149,79 \pm 40,31$	$145,81 \pm 41,11$	0,35
ФВ, %	$53,94 \pm 8,48$	$57,60 \pm 7,68$	0,0004*
ИММЛЖ г/м ²	$159,32 \pm 31,18$	$157,82 \pm 32,29$	0,74

* $p < 0,05$.

($n=6$). У данных 6 пациентов наблюдалось снижение ФВ в среднем на 3,14% от исходной, тогда как у остальных пациентов ФВ возросла на 10,33% от исходных значений. В целом у пациентов с исходно псевдонормальным типом отмечалось уменьшение КСР и, как следствие, возрастание ФВ. В данной группе также было выявлено достоверное уменьшение ЛП, которое, вероятно, связано как с улучшением активного расслабления ЛЖ, так и с регрессией митральной регургитации. Из 23 пациентов, имеющих исходно митральную регургитацию, у 13 отмечалось ее реверсия. Sampwala S.Z. с соавт. также описали возможность уменьшения степени митральной регургитации после КШ [5]. Анализ пациентов с исходно рестриктивным типом диастолических нарушений выявил значимое ($p=0,006$) снижение исходно высокого ($1,02 \pm 0,16$) пика Е до $0,96 \pm 0,11$ мсек, достоверное ($p=0,0002$) увеличение исходно сниженного ($0,55 \pm 0,08$) пика А до $0,59 \pm 0,07$, что нашло отражение в высокозначимом ($p < 0,0000$) снижении соотношения Е/А до $1,66 \pm 0,23$ (табл. 5). Одним из не менее важных параметров, определяющих прогноз при рестриктивном типе, считается укорочение времени DT менее 125 мсек. [9]. Следовательно увеличение исходно короткого времени у исследуемых пациентов до $139,92 \pm 17,73$ мсек, следует расценивать, как наиболее позитивный момент. Качественный анализ обнаружил переход в псевдонормальный тип у 14,29% ($n=7$) пациентов. Учитывая, что рестриктивный тип является конечным этапом развития диастолических нарушений, для качественной оценки негативной динамики был выбран 10% порог ухудшения трех основных параметров: Е/А, DT и IVRT. Среди пациентов анализируемой группы ухудшение по описанным трем параметрам на более чем 10% от исходных значений отмечено у 8,16%. ФВ у данных

Таблица 5

Динамика ЭХО-КГ параметров до и после КШ у пациентов с исходно рестриктивным типом трансмитрального потока

Показатели	До КШ	После КШ	p
Е, м/с	$1,02 \pm 0,16$	$0,96 \pm 0,11$	0,006*
А, м/с	$0,55 \pm 0,08$	$0,59 \pm 0,07$	0,0002*
Е/А	$1,88 \pm 0,23$	$1,66 \pm 0,23$	$< 0,0000^*$
DT, мс	$123,14 \pm 18,82$	$139,92 \pm 17,73$	$< 0,0000^*$
IVRT, мс	$61,79 \pm 6,38$	$66,55 \pm 5,23$	$< 0,0000^*$
ЛП, см	$4,13 \pm 0,38$	$4,01 \pm 0,35$	0,006*
КСР, см	$4,38 \pm 0,72$	$4,07 \pm 0,75$	0,00004*
КСО, мл	$93,33 \pm 35,71$	$77,67 \pm 36,74$	$< 0,0000^*$
КДР, см	$5,75 \pm 0,74$	$5,71 \pm 0,78$	0,80
КДО, мл	$170,86 \pm 52,10$	$162,58 \pm 55,34$	0,24
ФВ, %	$45,63 \pm 6,31$	$53,14 \pm 7,31$	$< 0,0000^*$
ИММЛЖ г/м ²	$146,76 \pm 53,39$	$145,77 \pm 51,58$	0,54

* $p < 0,05$.

пациентов снизилась на 4,12% от исходной, у остальных пациентов наблюдался прирост ФВ на 19,33%.

В отношении остальных параметров по группе отмечается положительная динамика: уменьшился КСР, увеличилась ФВ. Размеры ЛП также уменьшились. Исходно митральная регургитация в данной группе отмечалась у 20 пациентов. После КШ регрессия степени митральной регургитации произошла у 15 больных.

Следует отметить, что у 3 пациентов с исходно нормальной диастолической функцией после КШ зарегистрирован нормальный трансмитральный кровоток. Суммируя результаты каждой группы, мы получили улучшение диастолической функции у 29,51% (n=108) пациентов, ухудшение у – 10,11% (n=37), у 60,38% (n=221) без значимой динамики.

Анализ связи динамики диастолической функции с особенностями оперативного лечения и послеоперационными осложнениями отображен в таблице 6. Отмечалась тенденция к большему количеству наложенных шунтов у пациентов с ухудшением диастолической функции. Отчасти ухудшение диастолической функции может быть объяснено развитием реперфузионного феномена. Доказано, что в отличие от чрескожной коронарной ангиопластики, в течение 1 недели после КШ сохраняются маркеры ишемии и миокардиального некроза [17]. Не менее важным фактором явилась методика оперативного лечения: среди пациентов с улучшением диастолической функции достоверно (p=0,02) больший процент – 20,37% лиц – оперирован без применения ИК. Более того, время ИК и время ишемии были достоверно выше среди пациентов с ухудшением диастолической функции. Данный факт является закономерным, так как в результате искусственного кровообращения (ИК) могут возникать многочисленные осложнения, такие как нарушения нейрокогнитивной сферы, иммуносупрессия, системный воспалительный ответ, вторичные кровотечения вследствие дисфункции тромбоцитов, почечная недостаточность, повреждение миокарда [21].

Анемия в послеоперационном периоде встречалась

достоверно реже среди пациентов с зафиксированным улучшением диастолической функции. Тесная связь анемии и диастолических нарушений при ИБС была описана в исследовании 822 пациентов [14]. Актуальными для анализа явились такие осложнения, как постперикардотомный синдром и плеврит, относящиеся к экстрамиокардиальным факторам развития диастолической дисфункции [24]. Частота этих осложнений также была достоверно ниже среди пациентов с позитивной динамикой диастолических показателей.

Выводы

1. Улучшение диастолической функции левого желудочка после коронарного шунтирования возможно при любом исходном типе диастолических нарушений.
2. Динамика диастолических и систолических параметров на 3–7 сутки после КШ происходит параллельно с систолическими и зависит от наличия искусственного кровообращения и его продолжительности.
3. Осложнения послеоперационного периода, такие как анемия, ППТС и плеврит, оказывают негативное влияние на диастолическую функцию миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев Ф.Т., Овчинников А.Г. Диастолическая дисфункция как проявление ремоделирования сердца // Сердечная недостаточность. – 2002. – Том 3. – № 4. – С. 190–195.
2. Angeja B. G, Grossman W. Evaluation and management of diastolic heart failure // Circulation. – 2003. – Vol.107. – P. 659–663.
3. Aurigemma G.P., Gottdiener J.S., Shemanski L. et al. Predictive value of systolic and diastolic function for incident congestive heart failure in the elderly: the Cardiovascular Health Study // J. Am. Coll. Cardiol. – 2001. – Vol. 37. – P. 1042–1048.
4. Bajraktari G., Qirko S., Rexhepaj N. Non-insulin dependent diabetes as an independent predictor of asymptomatic left ventricular diastolic dysfunction // Croat. Med. J. – 2005. – Vol. 46. – № 2. – P. 225–231.

Таблица 6

Взаимоотношение динамики диастолической функции в послеоперационном периоде с особенностями оперативного лечения и послеоперационными осложнениями

Показатели	Улучшились (n=108)	Без динамики (n=221)	Ухудшились (n=37)	P _{1,2}	P _{1,3}	P _{2,3}
Количество шунтов	3,02±1,33	3,22±1,28	3,49±1,19	0,23	0,06	0,21
Без ИК	20,37% (22)	15,38% (34)	5,40% (2) + 5,40% (2) переход	0,16	0,02*	0,08
Время ИК**	63,26±25,58	67,47±44,28	80,86±41,33	0,52	0,04*	0,07
Время ишемии**	37,90±13,17	39,48±17,80	50,29±28,51	0,83	0,04*	0,04*
Анемия	50,93% (55)	63,80% (141)	72,97% (27)	0,02*	0,015*	0,19
ППТС	12,96% (14)	35,29% (78)	35,14% (13)	<0,000*	0,004*	0,5
Плеврит	25,93% (28)	40,27% (89)	56,76% (21)	0,007*	0,0008*	0,045*

* p<0,05, ** средняя рассчитана только для когорты больных с ИК.

5. Campwala S.Z., Bansal R.C., Wang N. et al. Factors affecting regression of mitral regurgitation following isolated coronary artery bypass surgery // *Eur. O. Cardiorhorac. Surg.* – 2005. – Vol. 28. – № 5. – P. 783–787.
6. Carr J.A., Haithcock B.E., Paone G. et al. Long-term outcome after coronary artery bypass grafting in patients with severe left ventricular dysfunction // *Ann. Thorac. Surg.* – 2002. – Vol. 74. – № 5. – P. 1531–1536.
7. Deten A., Holzl A., Leicht M. et al. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2001. – Vol. 33. – № 6. – P. 1191–1207.
8. Fischer M., Baessler A., Hense H.W et al. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community // *Eur. Heart. J.* – 2003. – Vol. 24. – № 4. – P. 320–328.
9. Giannuzzi P., Temporelli P.L., Bosimini E. et al. Independent and incremental prognostic value of Doppler-derived mitral deceleration time of early filling in both symptomatic and asymptomatic patients with left ventricular dysfunction // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1996. – Vol. 28. – № 2. – P. 383–390.
10. Haney S., Sur D., Xu Z. Diastolic heart failure: a review and primary care perspective // *The Journal of the American Board of Family Practice.* – 2005. – Vol. 18. – P. 189–198.
11. Hedman A., Samad B.A., Larsson T. et al. Improvement in diastolic left ventricular function after coronary artery bypass grafting as assessed by recordings of mitral annular velocity using Doppler tissue imaging // *Eur. J. Echocardiogr.* – 2005. – Vol. 6. – № 3. – P. 202–209.
12. Lim T.K., Ashrafian H., Dwivedi G. et al. Increased left atrial volume index is an independent predictor of raised serum natriuretic peptide in patients with suspected heart failure but normal left ventricular ejection fraction: Implication for diagnosis of diastolic heart failure. // *Eur. J. Heart Fail.* – 2006. – Vol. 8. – № 1. – P. 38–45.
13. MacCarthy P.A., Kearney M.T., Nolan J. et al. Prognosis in heart failure with preserved left ventricular systolic function: prospective cohort study // *B.M.J.* – 2003. – Vol. 327. – P. 78–79.
14. Nair D, Shlipak MG, Angeja B. et al. Association of anemia with diastolic dysfunction among patients with coronary artery disease in the Heart and Soul Study // *Am. J. Cardiol.* – 2005. – Vol. 95. № 3. P. 332–336.
15. Oh J. O., Seward J.B., Tajik A.J. *The echo manual.* 1999. – DNLN/DLC for library of congress.
16. Orlandi A., Francesconi A., Marcellini M. et al. Role of ageing and coronary atherosclerosis in the development of cardiac fibrosis in the rabbit // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – Vol. 64. – № 3. – P. 544–552.
17. Palazzuoli A., Carrera A., Calabria P. et al. Brain natriuretic peptide levels during cardiac reperfusion: comparison between percutaneous coronary angioplasty and aorto-coronary bypass // *Clin. Chim. Acta.* – 2004. – Vol. 342. – № 1–2. – P. 87–92.
18. Poulsen S.H. Clinical aspects of left ventricular diastolic function assessed by Doppler echocardiography following acute myocardial infarction // *Dan. Med. Bull.* – 2001. – Vol. 48. – № 4. – P. 199–210.
19. Sakata Y., Masuyama T., Yamamoto K. et al. Renin angiotensin system-dependent hypertrophy as a contributor to heart failure in hypertensive rats: different characteristics from renin angiotensin system-independent hypertrophy // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2001. – Vol. 37. – № 1. – P. 293–299.
20. Sakata Y., Yamamoto K., Mano T. et al. Temocapril prevents transition to diastolic heart failure in rats even if initiated after appearance of LV hypertrophy and diastolic dysfunction // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – Vol. 57. – № 3. – P. 757–765.
21. Sellke F. W., Di Maio M.J., Caplan L. R. Comparing on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting // *Circulation.* – 2005. – Vol. 111. – P. 2858–2864.
22. Vasan R.S., Larson M.G., Benjamin E.J. et al. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1999. – Vol. 33. – P. 1948–1955.
23. Yu C.M., Lin H., Kum L.C. et al. Evidence of atrial mechanical dysfunction by acoustic quantification in abnormal relaxation and restrictive filling patterns of diastolic dysfunction in patients with coronary artery disease // *Eur. J. Echocardiogr.* – 2003. – Vol. 4. – № 4. – P. 272–278.
24. Zile M.R., Brutsaert D. L. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105. – P. 1503.

I.T. Timofeeva

LEFT VENTRICLE DIASTOLIC FUNCTION AFTER CORONARY REVASCULARIZATION

The aim of the study is to evaluate dynamics of the left ventricle diastolic function after coronary bypass and determine its possible connection with systolic function dynamics. 366 patients with initial types of transmitral flow are examined before undergoing coronary bypass surgery. More often fixed diastolic dysfunction type is an abnormal relaxation, and rarely happened pseudo-normal and restrictive types. Left ventricle diastolic function improvement after coronary bypass is possible at any initial diastolic dysfunction type. Dynamics of diastolic parameters is simultaneous to systolic ones and depends on on-pump technique and cross-clamp time. Postop complications like anemia, cardiomy syndrome and pleuritis negatively change left ventricle diastolic function.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

