

ISSN 1609-1175

Тихоокеанский Медицинский Журнал

PACIFIC MEDICAL JOURNAL

2012, № 1

РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1997 году
Выходит один раз в три месяца

ДАЛЬНЕВОСТОЧНАЯ НАУКА – МЕДИЦИНЕ



Издательство
МЕДИЦИНА ДВ

Главный редактор В.Б. Шуматов

Редакционная коллегия:

Н.Н. Беседнова, Б.И. Гельцер, А.И. Дубиков, Е.В. Елисеева, Ю.В. Каминский, Е.В. Крукович, Ю.В. Кулаков, П.А. Лукьянов, В.Н. Лучанинова, Е.В. Маркелова (отв. секретарь), В.И. Невожай, В.А. Невзорова (зам. главного редактора), В.А. Петров, К.В. Стегний, В.Б. Туркутюков, Ю.С. Хотимченко, В.М. Черток (зам. главного редактора), В.В. Шапкин, А.Д. Юцковский

Редакционный совет:

А.С. Белевский (Москва), А.Ф. Беляев, А.В. Гордеев, Ю.И. Гринштейн (Красноярск), С.Е. Гуляева, Н.А. Догадина, В.А. Иванис, Ю.И. Ишпахтин, В.П. Колосов (Благовещенск), Д.Б. Ларионова, В.Ю. Мареев (Москва), В.Я. Мельников, П.А. Мотавкин, А.Я. Осин, А.А. Полежаев, Б.Я. Рыжавский (Хабаровск), Л.М. Сомова, Г.И. Суханова, Н.Д. Татаркина, Л.Н. Трусова, Г.И. Цыпкина, Jin Liang Hong (КНР), Moon oh Riin (Республика Корея), Yamamoto Masaharu (Япония), Zhao Baoshang (КНР)

Научный редактор О.Г. Полушин

Ответственный редактор номера *Н.Н. Беседнова*

«Тихоокеанский медицинский журнал», 2011, № 1 (47)

| | | |
|---|--|---|
| Тихоокеанский медицинский журнал Учредители: Владивостокский государственный медицинский университет, Департамент здравоохранения администрации Приморского края, НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Краевой клинический центр охраны материнства и детства <i>Свидетельство о регистрации</i> <i>Министерства РФ по делам печати,</i> <i>телерадиовещания и средств массовых</i> <i>коммуникаций</i> ПИ № 77-13548 от 20.09.2002 г. | Адрес редакции: 690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 4, Владивостокский государственный медицинский университет Тел./факс: (423) 245-77-80 Редактор О.Н. Мишина Зав. редакцией Л.В. Бирилло Технический редактор А.В. Яунвалкс Тел.: (423) 245-56-49 Корректор О.М. Тучина | Издательство «МЕДИЦИНА ДВ» 690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 4; тел.: 245-56-49; <i>e-mail: medicinadv@mail.ru</i> Подписано в печать 02.11.2011 г. Печать офсетная. Формат 60×90/8 Усл. печ. л. 12,5. Заказ № 2115 Тираж 1000 экз. Отпечатано ИД «Принт-Восток» в типографии № 1 г. Харбин (Китай) Цена свободная |
|---|--|---|

Передовые статьи

Гуляева С.Е., Овчинникова А.А., Овчинников А.В., Каблуков Д.А.
Гепатолентикулярная дегенерация 5

Обзоры

Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синебрюхов С.Л., Хрисанфова О.А.,
Легостаева Е.В., Завидная А.Г., Пузь А.В., Хлусов И.А.
Функциональные покрытия
для имплантационных материалов 12
Мельников В.Г., Абрамов В.М., Хлебников В.С., Чикилева И.О.,
Василенко Р.Н., Косарев И.В., Сакулин В.К., Овинова Г.Р.,
Захарова И.Н., Киселевский М.В., Запорожец Т.С., Кузнецова Т.А.
Восстановление микробного баланса матери как оптимальный
путь профилактики врожденного дисбиоза у детей 20

Оригинальные исследования

Васьковский В.Е., Горбач Т.А., Еситов А.В.,
Светашев В.И., Яцкова М.А.
Омега-3 жирные кислоты: диагностическое значение
и роль индивидуальных особенностей организма пациентов 23
Соколова Е.В., Иванова Т.Б., Крыжановский С.П.,
Богданович Л.Н., Барабанова А.О., Ермак И.М.
Влияние биологически активной добавки на основе полисахаридов
красной водоросли на липидный обмен пациентов с ишемической
болезнью сердца 26
Крыжановский С.П., Яцкова М.А., Головачева В.Д.
Гиполипидемическое действие биологически активной добавки
к пище из икры морских ежей в монотерапии и комбинации
с аторвастатином 29
Максема И.Г., Компанец Г.Г., Барабанова А.О., Ермак И.М., Слонова Р.А.
Противовирусное действие каррагинанов из красной водоросли
при экспериментальной хантавирусной инфекции 32
Сергеева Н.В., Богданович Л.Н., Хотимченко Ю.С.
Влияние альгината натрия на спонтанную и индуцированную
продукцию цитокинов мононуклеарами периферической
крови здоровых доноров *in vitro* 35
Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Макаренко И.Д.,
Тимченко Н.Ф., Беседнова Н.Н., Звягинцева Т.Н.,
Шевченко Н.М., Мандракова Н.В., Мельников В.Г.
Пребиотический потенциал полисахаридов из бурой водоросли
Fucus evanesces и значение для клинического использования 37
Бивалькевич Н.В., Караман Ю.К.
Экспериментальное обоснование применения
фукоидана в качестве гепатопротекторного средства
при неалкогольной жировой болезни печени 41
Макаренко И.Д., Леонова Г.Н., Майстровская О.С.,
Звягинцева Т.Н., Имбс Т.И., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н.
Противовирусная активность сульфатированных полисахаридов
из бурых водорослей при экспериментальном клещевом
энцефалите: связь структуры и функции 44
Молчанова В.И., Чикаловец И.В., Черников О.В.,
Попов А.М., Кривошапко О.Н., Лукьянов П.А.
Сравнительное изучение биологической активности
биоликанов из дальневосточной мидии *Stenomyltilus grayanus* 47
Пономарева Т.И., Добряков Ю.И., Добряков Е.Ю.
Влияние экстракта из асцидии *Halocynthia aurantium* на
кроветворные процессы в условиях миелосупрессии,
вызванной цитостатиком 50
Долматова Л.С., Заика О.А., Тимченко Н.Ф.
Влияние экстракта из дальневосточных видов голотурий
на оксидантно-антиоксидантный баланс и апоптоз в макрофагах
мышей при экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции 53
Ли В., Ху М., Тон Ч., Джин Х., Ю К., Ван В., Лукьянов П.А.
Антиоксидантные свойства гликопептидов
кожного секрета гигантской китайской саламандры 57
Смолина Т.П., Кузнецова Т.А.,
Назаренко Е.Л., Беседнова Н.Н.
Гликополимеры морских протеобактерий – перспективные
активаторы клеток врожденного иммунитета человека 59
Бахаев Д.В., Стенкова А.М., Иванова Ю.В., Щеголева О.В.,
Просекова Е.В., Рассказов В.А., Исаева М.П.
Анализ полиморфизма генов интерлейкина-13 и системы
детоксикации ксенобиотиков у детей с аллергопатологией 63
Колесникова С.М., Левкова Е.А., Гребеняк О.А.
Антенатальные аспекты формирования тимуса плода
при различных типах гестации 66

Вострикова О.П., Новикова О.Д., Горбач Т.А., Рябова Н.Н.,
Портнягина О.Ю., Хоменко В.А., Павлова Г.Г.
Верификация и клинико-иммунологическая
характеристика поражения периферической
нервной системы иерсиниозной этиологии 68
Запорожец Т.С., Майстровский К.В., Раповка В.Г.,
Иванушко Л.А., Смолина Т.П., Гажа А.К.
Оценка системной воспалительной реакции
у пациентов с облитерирующим атеросклерозом
сосудов нижних конечностей 72
Киняйкин М.Ф., Суханова Г.И., Рассохина Н.Ю., Крамар А.В.
Влияние гипоксемии на некоторые клинико-функциональные
показатели, характеризующие качество жизни больных
хронической обструктивной болезнью легких 77
Пестрякова Я.Ф., Шабанов Г.А., Мельников В.Я.,
Рыбченко А.А.
Скрининговая диагностика первичной
открытоугольной глаукомы 80
Кондрашова Н.М., Плехова Н.Г., Сомова Л.М.,
Костюшко А.В., Гельцер Б.И.
Оптимизация оценки показателей функциональной
активности клеток врожденного иммунитета
при воспалительных заболеваниях легких 83
Чикаловец И.В., Черников О.В., Молчанова В.И.
Гликозилирование С-реактивного белка у пациентов
с ишемической болезнью сердца 87
Суханова Г.И., Киняйкин М.Ф., Рассохина Н.Ю., Крамар А.В.
Роль гипоксемии в развитии дисфункции мускулатуры
верхних конечностей при хронической обструктивной
болезни легких 90
Ляпун И.Н., Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И.,
Крылова Н.В., Максема И.Г.
Функциональная активность нейтрофилов, зараженных
РНК-содержащими вирусами 93
Турмова Е.П., Лукьянов П.А., Григорюк А.А.,
Бычков Е.А., Цыбульский А.В.
Развитие эндотелиальной дисфункции
при экспериментальной гиперлипидемии 97
Короткова М.А., Гуляева С.Е., Овчинникова А.А.,
Овчинников А.В.
Структура нейрпсихологического дефекта у больных
рассеянным склерозом 101
Агафонова И.Г., Колосова Н.Г., Рассказов В.А.
Сравнительный анализ изменения мозгового
кровообращения у крыс с индуцированным острым
нарушением мозгового кровообращения методом магнитно-
резонансной томографии 104

Организация здравоохранения

Овчинникова А.А., Гуляева С.Е., Гуляев С.А.,
Новиков Д.В., Захарычева Т.А.
Клещевой энцефалит на Дальнем Востоке:
аспекты эпидемиологии 107
Соляник Е.В., Елисеева Е.В., Гельцер Б.И.
Фармакоэкономический анализ органических нитратов
в антиангинальной терапии стабильной стенокардии 110

Методика

Калиновская И.В., Задорожная А.Н., Карасев В.Е.
Толуилаты неодима (III) –
интенсивные инфракрасные люминофоры 114
Гринштейн Ю.И., Шестовицкий В.А., Максимова А.В.
Дифференциальная диагностика бронхиальной астмы
и хронической обструктивной болезни легких 115
Пономарев П.Ю., Суханова Г.И.
Опыт использования новой методики рефлексотерапии
в лечении двух больных с сочетанным заболеванием –
бронхиальной астмой, аллергическим ринитом и гонартрозом 118
М.С. Старцева, В.М. Черток
Количественная оценка интенсивности гистохимических
и иммуногистохимических реакций с применением
стандартных компьютерных программ 121

Юбилей

Александр Дмитриевич Юцковский 124

Editorials

- Gulyaeva S.E., Ovchinnikova A.A., Ovchinnikov A.V., Kablukov D.A.
Hepatolenticular disease..... 5

Reviews

- Gnezdenkov S.V., Sharkeev Yu.P., Sinebryukhov S.L.,
Khrisanforova O.A., Legostaeva E.V., Zavidnaya A.G.,
Puz A.V., Khlusov I.A.
Functional coatings for implants.....12
Melnikov V.G., Abramov V.M., Khlebnikov V.S., Chikileva I.O.,
Vasilenko R.N., Kosarev I.V., Sakulin V.K., Ovinova G.R.,
Zakharova I.N., Kiselevsky M.V., Zaporozhets T.S., Kuznetsova T.A.
Restoration of mother's microbial balance
as optimal way of preventing innate dysbiosis20

Original Researches

- Vaskovsky V.E., Gorbach T.A., Esipov A.V., Svetashev V.I., Yatskova M.A.
Omega-3 fatty acids: diagnostic value and role
of individual features in patients' organisms23
Sokolova E.V., Ivanova T.B., Kryzhanovskiy S.P., Bogdanovich L.N.,
Barabanova A.O., Ermak I.M.
Red algae polysaccharide-based additive and lipid exchange
of patients with ischemic heart dis-ease.....26
Kryzhanovskiy S.P., Yatskova M.A., Golovacheva V.D.
Hypolipidemic effects of sea urchin-derived bioactive food additives
in monotherapy and in combination with atorvastatin29
Maksema I.G., Kompanets G.G., Barabanova A.O.,
Ermak I.M., Slonova R.A.
Antiviral action of red algae-derived Carrageenans
in case of experimental Hunt virus infection32
Sergeeva N.V., Bogdanovich L.N., Khotimchenko Yu.S.
Effect of sodium alginate on spontaneous and induced
cytokine production by peripheral blood mononuclear
cells of healthy donors *in vitro*35
Kuznetsova T.A., Zaporozhets T.S., Besednova N.N.,
Makarenkova I.D., Timchenko N.F., Zvyagintseva T.N.,
Shevchenko N.M., Mandrakova N.V., Melnikov V.G.
Prebiotic properties of polysaccharides from brown seaweed *Fucus*
evanescens and perspectives for clinical using..... 37
Bivalkevich N.V., Karaman Yu.K.
Experimental substantiation of fucoïdan used
as hepatoprotective drug in case of non-alcoholic fatty liver disease.....41
Makarenkova I.D., Leonova G.N., Maystrovskaya O.S.,
Zvyagintseva T.N., Imbs T.I., Ermakova S.P., Besednova N.N.
Antiviral effect of brown algae-derived sulphated
polysaccharides in case of experimental tick-borne encephalitis:
tying structure and function44
Molchanova V.I., Chikalovets I.V., Chernikov O.V.,
Popov A.M., Krivoshepko O.N., Lukianov P.A.
Comparable study of biological effects from Far-Eastern mussel
Crenomytilus grayanus-derived bioglicanes.....47
Ponomareva T.I., Dobryakov Yu.I., Dobryakov E.Yu.
The effect of hydrobiont *Halocynthia aurantium* extract
on hemopoiesis under conditions of cytostatic myelosuppression.....50
Dolmatova L.S., Zaika O.A., Timchenko N.F.
Effects from Far Eastern Holothurians extract on oxidant-antioxidant
balance and apoptosis in mice macrophages in case of experimental
pseudotuberculosis infection.....53
Li W., Qu M., Tong Ch., Jin Q., Yu X., Wang W., Lukyanov P.A.
Antioxidant properties of Chinese giant salamander skin
secretion glycopeptides.....57
Smolina T.P., Kuznetsova T.A.,
Nazarenko E.L., Besednova N.N.
Marine proteobacterium glycopolymers as promising
activators of human innate immunity cells.....59
Bakhaev D.B., Stenkova A.M., Ivanova Yu.V., Schegoleva O.V.,
Prosekova E.V., Rasskazov V.A., Isaeva M.P.
Polymorphism of interleukin-13 genes and xenobiotic
detoxification systems in children with allergic pathology.....63

- Kolesnikova S.M., Levcova E.A., Grebenyuk O.A.
Antenatal aspects of foetal thymus formation
in case of various gestation types66
Vostrikova O.P., Novikova O.D., Gorbach T.A.,
Ryabova N.N., Portnyagina O.Yu.,
Khomenko V.A., Pavlova G.G.
Verification and clinical immunological characteristics
of peripheral nervous system lesions of Yersiniosis aetiology.....68
Zaporozhets T.S., Maystrovskiy K.V., Rapovka V.G.,
Ivanushko L.A., Smolina T.P., Gazha A.K.
Estimating systemic inflammatory response in patients
with obliterating arterial sclerosis of lower limb arteries.....72
Kinyaikin M.F., Sukhanova G.I.,
Rassokhina N.Yu., Kramar A.V.
Effect of hypoxemia on several clinical functional
parameters characterising life quality of patients
with chronic obstructive lung disease77
Pestryakova Ya.F., Shabanov G.A.,
Melnikov V.Ya., Ryibchenko A.A.
Screening for primary open-angle glaucoma80
Kondrashova N.M., Plekhova N.G., Somova L.M.,
Kostyushko A.V., Geltser B.I.
Optimising estimation of parameters describing
functional activity of innate immune cells in case
of inflammatory lung diseases83
Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I.
Glycosylation in C-reactive protein in patients
with ischemic heart disease.....87
Sukhanova G.I., Kinyaikin M.F., Rassokhina N.Yu., Kramar A.V.
Role of hypoxemia in formation of upper limb muscle
dysfunction in case of chronic obstructive lung disease90
Lyapun I.N., Plekhova N.G., Somova L.M.,
Drobot E.I., Kryilova N.V., Maksema I.G.
Functional activity of neutrophils infected by RNA viruses.....93
Turmova E.P., Lukyanov P.A., Grigoryuk A.A.,
Byihkov E.A., Tsyiulskiy A.V.
Progression of endothelial dysfunction during
experimental hyperlipidemia.....97
Korotkova M.A., Gulaeva S.E., Ovchinnikova A.A., Ovchinnikov A.V.
Structure of neuropsychological defect of disseminated sclerosis patients..... 101
Agafonova I.G., Kolosova N.G., Rasskazov V.A.
Comparative analysis of changing cerebral circulation
in rats with induced acute cerebrovascu-lar accident
using magnetic resonance imaging.....104

Public Heals Organization

- Ovchinnikova A.A., Gulyaeva S.E., Gulyaev S.A.,
Novikov D.V., Zaharyicheva T.A.
Tick-borne encephalitis in the Far East: epidemiology aspects 107
Solyanik E.V., Eliseeva E.V., Geltser B.I.
Pharmacoeconomic analysis of organic nitrates
in antianginal therapy of stable angina..... 110

Methods

- Kalinovskaya I.V., Zadorozhnaya A.N., Karasev V.E.
Neodymium toluilates (III) – intensive infrared luminofors114
Grinshtein Yu.I., Shestovitskiy V.A., Maksimova A.V.
Differential diagnostics of bronchial allergy
and chronic obstructive lung disease.....115
Ponomarev P.Yu., Sukhanova G.I.
Experience in application of new methods of reflexotherapy
in treatment of two patients with polypathia – bronchial allergy,
nasal allergy and gonarthrosis118
Startseva M.S., Chertok V.M.
Quantification of intensity of histochemical and
immunohistochemical responses using standard computer software.....121

Anniversaries

- A.D. Yutskovskiy124

УДК [616.831.322-004-056.7:616.36-004]-07

ГЕПАТОЛЕНТИКУЛЯРНАЯ ДЕГЕНЕРАЦИЯ

С.Е. Гуляева, А.А. Овчинникова, А.В. Овчинников, Д.А. Каблуков

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: гепатолентикулярная дегенерация, клиника, диагностика, лечение.

В представленном обзоре литературы с целью преодоления недостаточной информированности врачей изложены современные взгляды на молекулярно-генетический дефект гепато-лентикулярной дегенерации, особенности мутаций гена *ATP7B*, мутацию его дефектных экзонов, оценку полиморфизма клиники и принципы ранней диагностики патологии. Особое внимание уделено вопросам нейровизуализации, ультразвукового и биопсийного исследования печени и лабораторным показателям. Уточнены современные взгляды на механизм развития заболевания и систематизацию клинических проявлений.

Гепатолентикулярная дегенерация (ГЛД), или болезнь Вильсона–Коновалова, является моногенным заболеванием с аутосомно-рецессивным типом наследования, в основе которого лежит нарушение метаболизма меди с избыточным накоплением ее в печени, головном мозге, почках, роговице и других органах при снижении экскреции с желчью. Это заболевание относится к тем немногим тяжелым наследственным болезням, для которых разработана эффективная патогенетическая терапия. Поэтому своевременная диагностика данной патологии способна перевести ее в разряд курабельных. Однако по мере накопления знаний оказалось, что ни один из существующих методов диагностики здесь нельзя считать строго специфическим. Поэтому за последние десятилетия в отечественной и в зарубежной литературе интерес к описанию всех аспектов болезни Вильсона–Коновалова оживился.

В истории изучения ГЛД принято выделять 4 этапа:

1. Определение нозологической самостоятельности патологии (конец XIX – начало XX века);
2. Установление связи между поражением внутренних органов и головного мозга и избыточным накоплением в них меди;
3. Открытие возможностей патогенетической терапии путем использования препаратов, связывающих и выводящих медь из организма;
4. Определение локализации патологического гена, ответственного за развитие заболевания.

Итак, в 1883 г. С. Westphal и в 1898 г. А. Strumpell описали заболевание, при котором признаки многоочагового поражения центральной нервной системы выявлялись на фоне патологии печени. Они назвали заболевание «псевдосклерозом», а неврологи стали именовать его болезнью Вестфала–Штрюмпеля. В 1902 г. В. Kayser, а в 1903 г. Fleischer обнаружили у таких больных отложения зеленовато-бурого пигмента по периметру роговицы (кольцо Кайзера–Флейшера). В 1912 г. А.К. Wilson представил патоморфологическую

характеристику болезни, указав на преобладание в головном мозге двусторонних изменений чечевицеобразных ядер, а в печени – цирроза. В клинике он выделил сочетание признаков поражения экстрапиримидной системы, бульбарного синдрома и психических расстройств. Начало в молодом возрасте и прогрессирующее течение позволило ему назвать болезнь прогрессирующей лентикулярной дегенерацией.

В 1912 г. Н.С. Hall, объединив «псевдосклероз» Вестфала–Штрюмпеля и прогрессирующую лентикулярную дегенерацию Вильсона в единую нозологическую форму, предложил именовать ее гепатолентикулярной дегенерацией. Почти через 40 лет J.N. Cumings (1948) и Н.Г. Kunkel (1952) выявили нарушения обмена меди с накоплением ее в мозговой ткани и гиперсекрецией с мочой из-за дефицита медьсодержащего белка церулоплазмина в плазме крови.

J.M. Walshe в 1956 г. удалось синтезировать из пенициллина тиоловый препарат D-пеницилламин, обладающий медьвыводящим действием. Это ознаменовало собой новую эру – эру лечения ГЛД и надежды перевода ее в разряд курабельных заболеваний.

В России изучение ГЛД связано с именем Н.В. Коновалова. Его заслугой является описание основных клинических форм данной патологии и создание подробной классификации (1960) [9]. Н.В. Коновалов предложил выделять пять основных ГЛД. Однако большое количество переходных вариантов, диссоциация в проявлениях отдельных признаков и неоднозначный ответ на медикаментозные препараты вызывали дискуссии и мешали выбору критериев клинической диагностики. Целый поток описаний клинико-лабораторных и нейрофизиологических исследований свидетельствовал о том, что на пути систематизации клинических проявлений заболевания обнаруживается еще несколько препятствий [1, 2, 10, 18]. Появились новые классификации, предлагающие объединять признаки ГЛД по принадлежности заболевшего к той или иной этнической группе или к возрасту [27, 39], но ни одна из них не отражала полиморфизма клиники, особенно в дебюте заболевания.

Генетическая характеристика

Открытие молекулярного дефекта явилось следующим важным шагом в изучении ГЛД. Ген заболевания был картирован на длинном плече 13-й хромосомы и обозначен как *ATP7B*. В 1993 г. он был идентифицирован двумя исследовательскими группами из США и Канады (P.C. Bull et al., R.E. Tanzi et al.). Установлено, что этот ген кодирует синтез медьтранспортирующей

аденозинтрифосфатазы Р-типа и при патологии обуславливает генерализованное нарушение обмена меди в организме. Продукт гена *ATP7B* играет двоякую функциональную роль в клетках печени: одна из них – участие в биосинтезе путем доставки меди к апоцериулоплазмину внутри аппарата Гольджи, другая – транспорт избытка меди из клетки [27].

После открытия первичного молекулярного дефекта появилась реальная возможность непосредственно анализировать в гене повреждения, ведущие к развитию ГЛД, сопоставлять характер мутаций в разных популяциях и вплотную подойти к разработке прямых методов ДНК-диагностики данного заболевания. К настоящему времени в мире у больных ГЛД из большого числа популяций идентифицировано уже около 300 различных мутаций. В основном они представляют собой нуклеотидные замены и короткие делеции/вставки [5, 20, 21, 28, 29]. Было установлено, что в разных этнических группах спектр мутаций гена *ATP7B* имеет свои особенности [4, 5, 25, 38]. Наиболее частой оказывается замена С на А в кодоне 1069 гена, которая ведет к замещению аминокислоты гистидина глутамином. Одни исследователи обнаруживают эту мутацию у 22 %, другие – у 38 % славян, больных ГЛД [7, 28, 33, 37]. Иные относительно частые кластеры мутаций, характерные для определенных популяций мира, выявляются преимущественно во 2, 5, 8, 14, 15, 16 и 18-м экзонах гена. Так, в Испании среди заболевших ГЛД преобладает мутация экзона гена *ATP7B* – *M645R*; в странах Восточной Азии – *R778L*; в Японии – *R 778L* и *A803T* [21, 29].

Сопоставление особенностей клинических проявлений ГЛД и результатов молекулярно-генетического исследования показало, что существуют корреляции между преобладанием мутации в каком-либо из экзонов гена *ATP7B* и патологией у пациентов различных этнических групп. Становилось понятным, что большинство вопросов диагностики, лечения и профилактики данной патологии продолжают требовать углубленных исследований и нуждаются в разработке принципиально новых подходов к решению.

К концу XX столетия распространенность ГЛД стала составлять 1 на 30 000 (1,1 % населения мира, то есть 50 млн человек) при частоте гетерозиготного носительства 1:90–1:22 [2, 30, 31].

Патогенез

В патогенезе ГЛД ведущая роль принадлежит нарушению баланса между объемом поступившей с пищей меди и ее экскрецией. В норме среднесуточное потребление меди с пищей составляет около 4 мг. Она транспортируется в эпителий проксимальной части тонкой кишки, где ее большая часть связывается со специфическим мелкомолекулярным белком – металлотионеином. Эту прочную связь сохраняет 40–75 % меди, которая выводится с фекалиями. Остальные 25–60 % меди, утрачивая эту связь из-за взаимодействия с крупномолекулярными белками, абсорбируются из тонкой кишки в систему воротной вены при участии

специфического переносчика – продукта гена болезни Менкеса. В кровяном русле медь связывается с белками и аминокислотами и затем транспортируется в печень. Попадая в печень, где она практически полностью (90 %) остается, медь включается в гепатоцит. Лишь небольшая часть альбуминсвязанной меди (<50 мкг/сутки), минуя печень, попадает в системный кровоток и выводится почками. В гепатоците медь включается в специфические металлоэнзимы: супероксиддисмутазу, цитохромоксидазу, моноаминоксидазу. Экспорт меди осуществляется с помощью транспортного белка – церулоплазмينا. Включение ее в церулоплазмин происходит в аппарате Гольджи при участии продукта гена ГЛД – медьтранспортирующего аденозинтрифосфатазного протеина Р-типа, который, как предполагается, также принимает участие в лизосомальной экскреции меди. Синтезируясь в гепатоците, церулоплазмин секретируется как галопротеин. В процессе секреции в него включается от 1 до 6 атомов меди. По мнению J.H. Menkes et al. [31], именно церулоплазмин играет основную роль в ее обмене. В сыворотке крови 95 % меди находится в связанном состоянии (с церулоплазмином). Механизмами, защищающими гепатоцит от избытка меди, являются детоксикация при связывании меди с глутатионом и металлотионеином, билиарная экскреция с участием лизосом и, возможно, других медьтранспортирующих систем. В желчи медь связывается с крупномолекулярными белками, препятствующими ее реабсорбции в тонком кишечнике. Поступившая в желчь медь до 80 % экскретируется с желчью в виде неабсорбируемых комплексов. Этим предотвращается энтерогепатическая циркуляция меди, а ее поступление и выделение становится практически равным. Данный механизм обеспечивает баланс микроэлементов и позволяет установить норму биохимических показателей (содержание церулоплазмينا в сыворотке крови и уровень меди в суточной моче).

При ГЛД этот баланс нарушается, содержание свободной меди в крови и тканях возрастает и ее выделение с мочой увеличивается. Генетическая гетерогенность может обуславливать разнообразие механизмов дефекта экскреции меди: в одних случаях он может возникать из-за аномалии экспрессии гена на разных уровнях регуляции синтеза церулоплазмينا; в других – из-за препятствия всасываемости меди в тонком кишечнике; в третьих – из-за нарушения выведения меди с желчью; в четвертых – из-за появления в печени патологически измененного металлотионеона, который обладает повышенной способностью связывать медь.

И хотя патогенез ГЛД еще недостаточно изучен, существует несколько его гипотез, две из которых считаются ведущими. Согласно первой, в случаях грубого генетического дефекта синтеза церулоплазмينا активность его снижается или совсем утрачивается. Это, с одной стороны, приводит к компенсаторному увеличению абсорбции меди в кишечнике, с другой – к

нарушению поступления меди в печень для синтеза в гепатоците. Тогда возврат меди в кровь обеспечивает поступление ее с током крови к органам-мишеням (мозг, сердце, роговица, почки и др.).

Согласно другой гипотезе, первичным звеном болезни следует считать не дефект синтеза церулоплазмина, а изменение метаболизма меди в печени из-за нарушения ее выделения из аппарата Гольджи в желчь. Это приводит к накоплению в гепатоците так называемой регуляторной фракции меди. Избыточная концентрация последней провоцирует генерацию свободных радикалов, нарушение проницаемости плазматической мембраны и мембран митохондрий, истощение клеточных запасов и как следствие – повреждение структур гепатоцита [35]. В данном случае также наблюдается низкое содержание церулоплазмина в сыворотке крови, но оно является следствием нарушения метаболизма меди в печени и имеет скорее диагностическое, а не патогенетическое значение [11].

Накапливаясь в печени, медь вновь поступает в кровь и, циркулируя в ней, избирательно захватывается различными тканями и органами. Происходит депонирование ее в органах-мишенях, где она блокирует SH-группы многих ферментов и не может быть использованной. Ионы меди, поступающие в избытке в ткани, очень токсичны, способны окислять белки и липиды клеточных мембран, связывать белки и нуклеиновые кислоты и усиливать синтез свободных радикалов.

G.J. Brewer и Vol. Yuzbasiyan-Gurkan в 1992 г. предположили, что в норме «регуляторная» медь связана с церулоплазмином. Нарушение синтеза церулоплазмина, которое ранее рассматривалось рядом авторов как первичный биохимический дефект, играет хотя и важную патогенетическую роль, но, вероятно, вторичную. Ген, ответственный за синтез церулоплазмина, по-видимому, не служит «ответственным за ГЛД». Он и собственно ген болезни являются различными генами и находятся на разных хромосомах (соответственно на 3-й и 13-й).

При нарушении выведения меди с желчью при ГЛД она долгое время депонируется в гепатоцитах. Избыток меди ведет к возникновению каскада патобиохимических реакций, вызывая развитие вильсоновского гепатита (гепатоза) с последующим переходом в атрофический нодулярный цирроз печени. В патобиохимическом каскаде принято выделять четыре стадии (по A. Deiss et al., 1971) [22].

На I стадии по мере постепенного заполнения «медных депо» печени процесс протекает клинически асимптомно. Во II стадии переполнение цитозоля гепатоцитов медью приводит к поступлению ее избытка в кровь. Эта медь, соединенная рыхлой связью с альбуминами и аминокислотами, считается «прямой», в отличие от церулоплазминовой – «непрямой» или связанной меди. Клинически II стадия характеризуется началом висцеральных проявлений и гемолитической анемии вплоть до гемолитических кризов (стадия II A). Данные нарушения развиваются в результате токсического

действия избытка «прямой» меди на мембраны эритроцитов и возникновения печеночной недостаточности (стадия II B) в результате дистрофических изменений гепатоцитов. На III стадии при отсутствии элиминирующей терапии медь в избытке откладывается в других органах и тканях, в первую очередь в мозге и роговице. Формируются патологические изменения в подкорковых узлах (скорлупа, хвостатое ядро), появляется неврологическая симптоматика, происходит образование фрагментов роговичного кольца Кайзера–Флейшера. Для IV стадии характерно постепенное нарастание неврологической симптоматики, возникающей в результате эндогенной интоксикации медью тканей нервной системы и нарушения ее функций. Полностью формируется роговичное кольцо Кайзера–Флейшера.

Клиническая характеристика

Клиническая картина ГЛД характеризуется большим разнообразием неврологических и соматических проявлений. Она редко выявляется у больных до достижения ими 5-летнего возраста [2, 4, 22, 24].

В 1983 г. J. Walshe предложил выделять в течении заболевания две основных стадии: висцеральную (пре-неврологическую) и неврологическую, отражающие этапы его развития. Обе стадии отличаются необычным разнообразием клиники. В дебюте заболевания, как правило, возникают признаки поражения печени, но встречаются случаи и с другой, преимущественно неврологической, симптоматикой. Так, согласно исследованиям G.J. Gollan и J.G. Gollan, на долю печеночной манифестации болезни приходится 42 %, неврологической и психопатологической – 34 %, гемолитической – 12 %, почечной – 1 % [30]. За последние годы в отечественной медицинской печати оживился интерес к описанию висцерального этапа патологии [10, 13–16, 18].

Ведущими клиническими неврологическими проявлениями оказываются прогрессирующие экстрапирамидные, интеллектуально-эмоциональные нарушения, бульбарный синдром и пароксизмальные состояния эпилептического характера с постепенным формированием подкорковой деменции и акинетико-ригидного синдрома. В каждом конкретном случае возникает индивидуальный характер их сочетания и ритма прогрессирования [10].

В России наиболее распространена классификация ГЛД, предложенная в 1960 г. Н.В. Коноваловым [9]. Согласно данной классификации, ГЛД подразделяется на 5 форм:

1. **Брюшная форма** наблюдается как самостоятельная, так и в комплексе с другими в так называемой пре-неврологической стадии болезни [14, 15]. Заболевание развивается в возрасте от 5 до 17 лет и характеризуется несколькими вариантами поражения печени. Нередко этот процесс принимает острое галопирующее течение и завершается летально;

2. **Аритмогиперкинетическая (ранняя) форма** манифестирует преимущественно в возрасте от 7 до 15 лет.

Она характеризуется аритмичными гиперкинезами, чаще торсионно-дистонического характера. Гиперкинезы охватывают различные мышечные группы (конечностей, туловища, а также мышцы, ответственные за артикуляцию и глотание) и приводят к изменению позы тела, позиции конечностей, дизартрии и дисфагии. Нередко они сопровождаются резкими болями. Быстро нарастает мышечная ригидность, формируются анкилозы суставов. Присоединяются снижение интеллекта, психические нарушения и висцеральные расстройства. Без лечения летальный исход наступает через 2–3 года.

3. **Дрожательно-ригидная форма** отличается от аритмогиперкинетической более поздним началом (15–25 лет) и более доброкачественным течением. Она встречается чаще других. Для данного варианта характерно одновременное развитие ригидности и дрожания. Часто отмечается дисфагия и дизартрия. Соотношение ригидности и дрожания варьирует. В одних случаях преобладает синдром паркинсонизма с развитием в первую очередь ригидности при менее выраженном дрожании, в других – при нерезко выраженной ригидности превалирует типичное дрожание, которое усиливается в среднефизиологическом положении сгибания при удерживании рук на весу, а также при целенаправленных движениях. Выраженность психических нарушений и висцеральных проявлений также варьирует. Без лечения заболевание прогрессирует в течение 5–6 лет и заканчивается летально.

4. **Дрожательная форма** (соответствующая форме Вестфаля) отличается наиболее доброкачественным (10–15 лет) течением и более поздним началом (в среднем в возрасте 20–25 лет, но известны случаи и дебюта заболевания в 40 и даже в 50 лет). Основным клиническим проявлением является дрожание. Мышечный тонус не изменен или снижен. По мере прогрессирования болезни дрожание резко усиливается, становится крупноамплитудным с резко выраженным интенционным компонентом. При любой попытке активного движения оно нарастает, достигая степени двигательной бури, и превращается в генерализованное. Интеллект длительное время сохранен. Однако по мере прогрессирования болезни наряду с повышением мышечного тонуса возникают изменения психики, отличающиеся развитием аффективных расстройств. Висцеральные проявления выражены менее значительно.

5. **Экстрапирамидно-корковая форма** не является самостоятельной. Она может развиваться с течением времени или под воздействием внешних факторов (например, черепно-мозговой травмы) из любой основной неврологической формы ГЛД. Характеризуется присоединением к имеющимся типичным нарушениям остро развивающихся пирамидных парезов и эпилептических припадков, чаще очагового характера. Быстро прогрессируют психические нарушения [12].

Остановившись подробнее на клинических проявлениях отдельных симптомокомплексов в дебюте ГЛД, следует отметить, что обычно до развития

неврологической симптоматики поражается печень. Накопление меди в ней может вызвать как острое, так и хроническое ее воспаление (гепатит). Степень поражения печени может быть различной – от умеренного повышения сывороточных аминотрансфераз до тяжелой печеночной недостаточности. У большинства больных ГЛД на ранних этапах эта патология проявляет себя как острый вильсоновский гепатит. В детстве он нередко протекает под маской инфекционного гепатита, часто спонтанно переходит в латентную стадию без выраженных клинических проявлений, прогрессирует вплоть до формирования нодулярного постнекротического атрофического цирроза печени. Такое скрытое (латентное) течение вильсоновского цирроза связывают с тем, что в печени наряду с очагами некроза параллельно формируются очаги регенерации. Симптомы нарушения функции печени чрезвычайно variabelны и имеют тенденцию к прогрессированию. Они проявляют себя в виде повышенной утомляемости, недомогания, потери аппетита вплоть до анорексии, снижения массы тела, артропатий, болей в правом подреберье, развития желтухи, появления темной мочи, гепатомегалии и др. Нередко развивается такое тяжелое поражение печени как цирроз. Он длительно может протекать бессимптомно, затем проявляется спленомегалией, портальной гипертензией и асцитом. Однако иногда в детском и подростковом возрасте вильсоновский гепатит может приобретать молниеносное (фульминантное) течение с быстрым летальным исходом [5, 16, 18]. В ряде случаев он оказывается первым проявлением ГЛД (особенно у подростков). Тогда, развиваясь, как правило, на фоне раннее не диагностированного цирроза печени, он характеризуется появлением прогрессирующей желтухи, асцита, печеночной и почечной недостаточности. Даже при своевременной постановке диагноза и интенсивной терапии прогноз при фульминантном гепатите у больных с ГЛД крайне неблагоприятен. Патология приобретает стремительно прогрессирующее течение и обычно завершается летальным исходом. Единственным эффективным способом лечения таких больных становится трансплантация печени [2, 24].

Иногда заболевание может дебютировать лейкопенией и тромбоцитопенией. Они сопровождаются кровотечениями из десен, повторными носовыми кровотечениями, появлением специфических «сосудистых звездочек» на коже груди и живота или своеобразных полосок в области бедер (белых с периодической сменой окраски на красно-синюшную) [32]. Это обусловлено массивным выбросом из разрушающихся клеток печени меди, который приводит к повышению ее концентрации в крови, повреждению мембран эритроцитов, гемолизу [16, 19]. Гемолиз может предшествовать другим клиническим проявлениям заболевания, приобретать хроническое течение, способствовать (совместно с нарушением функции печени) развитию желчно-каменной болезни.

У некоторых больных нарушаются функции щитовидной и паращитовидной желез, что проявляется

симптомами гипотиреоза и нарушения обмена кальция.

У ряда пациентов с ГЛД возникает поражение почечных канальцев (из-за отложения меди в их проксимальных отделах). Это может проявлять себя аминоацидурией, глюкозурией, повышенной экскрецией мочевой кислоты и кальция, снижением фильтрации и почечного кровотока. Дистальный ренальный тубулярный ацидоз предрасполагает к образованию камней, способствующих микрогематурии [13]. Поэтому поражение почек при ГЛД обычно проявляется нерезко выраженной протеинурией тубулярного характера, реже – пиелонефритом, гломерулонефритом, «солевым» циститом и мочекаменной болезнью.

Накопление меди в суставах приводит к остеоартритам. Наблюдается широкий спектр поражений опорно-двигательного аппарата: остеопороз, рахит, остеомаляция, спонтанные переломы, остеохондроз. Деминерализация костей обусловлена гипокальциемией и гипофосфатемией, которые развиваются вследствие потерь кальция и фосфора через почки, а также дистоническими контрактурами и иммобилизацией. Поражение костной ткани может быть также следствием нарушения функции печени. Иногда при биопсии отмечается повышенное содержание меди в хрящевой ткани.

У некоторых больных регистрируются эндокринные и гормональные нарушения: отставание в росте или необычайно высокий рост, отставание в половом развитии, геникомастия у юношей, аменорея или дисменорея у девушек, ожирение и появление *stria gravidarum*, акромегалия и другие нарушения. Они нередко выступают в обрамлении нейродермита, себореи и др. [2, 4, 22, 24, 30].

Часто болезнь дебютирует нерезким снижением интеллекта, эмоциональными нарушениями, ухудшением успеваемости в школе, изменениями поведения или психическими проявлениями, которые отличаются большим полиморфизмом и клинически не имеют каких-либо специфических признаков, и заболевание длительно может оставаться нераспознанным. Патология колеблется от незначительной раздражительности, дисфорий и дисцимий до выраженных дефектов психики – абсессий, компульсий, депрессий, истерических синдромов, психозов и деменции [2, 4, 5, 24]. Поэтому лица молодого возраста, у которых в какой-либо комбинации встречаются перечисленные психопатологические проявления, особенно при наличии гепатита в анамнезе или больного в семье (родные братья и сестры), составляют первую группу риска для биохимического и молекулярно-генетического обследования с целью подтверждения или исключения ГЛД в преневрологической стадии.

Так как нарушения обмена меди отмечаются с момента рождения, то клинические симптомы могут проявлять себя на самых ранних этапах развития ребенка. Однако незрелость тканей и систем не позволяет дифференцировать патологию по клиническим

признакам в первые годы жизни, а различные мутации гена АТР7В определяют разнообразие клиники в дальнейшем. Симптомы, свидетельствующие о поражении нервной системы, могут выявляться обычно уже к 3–6 годам, но их диагностика запаздывает на 5–6 лет. На этапе 10–20 лет формы ГЛД с преобладанием неврологических проявлений выявляются уже в 69–70 % случаев. Реже (в 14,9 % случаев) в этом возрасте встречаются наблюдения с печеночными проявлениями или изолированными дефектами психики (2,4 %). И лишь в 5,3 % случаев на этом возрастном этапе заболевание протекает асимптомно [34, 36].

Патоморфологические изменения

При ГЛД максимальные изменения отмечаются в печени и головном мозге. При поражении внутренних органов в ранней стадии заболевания диагностируются гепатит или гепатоз с резким увеличением содержания меди. Для развернутой стадии ГЛД характерно формирование нодулярного, чаще крупноузлового, цирроза печени с уменьшением ее размера. При световой микроскопии выявляются участки ткани с нормальной структурой, которые чередуются с очагами некроза и постнекротического склероза и островками регенерации. При пункционной биопсии все компоненты вильсоновского цирроза печени не видны. О его наличии судят по нарушению нормальной структуры печени, хаотичной блочной структуре, краевому фиброзу или очагам регенерации. Представлены различные типы дистрофии печеночных клеток – жировая, углеводная, белковая. Характерной чертой является вакуольное перерождение гепатоцитов вплоть до появления «баллонных» клеток с «пустыми» ядрами и пенистой цитоплазмой. На субклеточном уровне отмечается, главным образом, патология митохондрий. Характерны изменения формы, мембран, электронной плотности матрикса, ориентации и количества крист, наличие включений. С помощью гистохимического метода выявляется повышение содержания меди в печени. В далекозашедших стадиях цирроз печени осложняется спленомегалией и расширением вен пищевода, являющихся причиной тромбоцитопении и спонтанных кровотечений.

При поражении почек отмечаются изменения в клубочках и особенно в эпителии канальцев (зернистое перерождение, возникновение клеток с «голыми» ядрами). Могут наблюдаться локальные тубулярные некрозы с внутриклеточным отложением меди, пролиферативные процессы в клубочках и дистрофические изменения эпителия канальцев. Снижение фильтрационной функции почек сочетается с относительной сохранностью реабсорбции и секреции.

Поражение мозга характеризуется прогрессирующими изменениями подкорковых ганглиев: чечевицеобразных ядер (преимущественно скорлупы), хвостатого ядра, наружного членика бледного шара, зубчатых ядер, коры мозжечка, подбугорных образований, коры больших полушарий. Макроскопически

отмечается сморщивание мозгового вещества и образование полостей, микроскопически – своеобразные изменения глии, получившие названия глии Альцгеймера I и II типа. Для глии I типа характерно увеличение клетки и большое ядро, богатое хроматином. При II типе изменений отмечается почти полное отсутствие цитоплазмы и гигантское ядро с очень бедным хроматином («голое» ядро). Другим компонентом поражения нервной системы является ангиотоксический, который представлен атонией мелких сосудов и капилляров мозга, способствующей возникновению стаза, мелких кровоизлияний и периваскулярного отека. Эти нарушения приводят к ишемии и аноксии нервной ткани с последующей ее гибелью и формированием так называемого *status spongiosus*, характерного для гепатолентикулярной дегенерации [17].

Данные лабораторных и функциональных исследований

Роговичное кольцо Кайзера–Флейшера является одним из важнейших диагностических критериев ГЛД [8]. При светлых глазах отложение желто-бурого пигмента по краю радужной оболочки обнаруживается визуально, при темных – выявляется окулистом при помощи щелевой лампы. Однако отсутствие кольца Кайзера–Флейшера не исключает ГЛД.

Наиболее важным диагностическим критерием является уменьшение уровня медьсодержащего церулоплазмينا в сыворотке крови [11, 21]. Уже на ранних этапах заболевания его концентрация снижена. Отмечается повышение концентрации свободной меди в крови и увеличение суточной экскреции меди с мочой. При сомнительных показателях необходимо исследование биоптата печени с определением концентрации меди [6]. У гетерозиготных носителей гена *ATP7B* концентрация меди в печени тоже повышена, но в меньшей степени.

Результаты нейровизуализационных исследований (компьютерная и магнитно-резонансная томография) являются дополнительным клинико-диагностическим критерием. Для ГЛД характерны атрофические изменения в области больших полушарий, мозжечка, подкорковых структур с расширением субарахноидальных пространств и желудочковой системы. При компьютерной томографии выявляются очаги пониженной плотности, а при магнитно-резонансной томографии – усиление сигнала в области лентикулярных ядер, бледного шара, зрительного бугра [3, 23, 26, 32].

При эхографическом исследовании печени выявляется очагово-диффузная неоднородность ткани. Изменяются размеры печени: от ее увеличения на этапе вильсоновского гепатита, до уменьшения на этапе цирроза. Часто отмечается увеличение селезенки [6, 11, 33].

Критерии постановки диагноза:

- сочетанное поражение мозга и внутренних органов, в первую очередь печени;
- аутосомно-рецессивный тип наследования;
- дебют заболевания в детском, подростковом и юношеском возрасте;

- симптомы, свидетельствующие о поражении экстрапирамидной системы: тремор, ригидность, патологические позы, болезненные тонические спазмы, дизартрия, дисфагия, снижение интеллекта;
- экстрапиральные симптомы: боли в области печени, гепатоспленомегалия, кровоточивость десен, носовые кровотечения, боли в костях и суставах, раннее разрушение зубов;
- нарушения медно-белкового обмена:
 - а) роговичное кольцо Кайзера–Флейшера;
 - б) снижение концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови (нижняя граница нормы – 20 мг/дл или 1,3 ммоль/л);
 - в) гиперэкскреция меди с мочой (более 80 мг/сутки или 1,25 ммоль/сутки);
 - г) повышение концентрации свободной меди в сыворотке;
 - д) снижение концентрации связанной меди в сыворотке крови;
 - е) повышение концентрации меди в биоптатах печени (в норме менее 50 мг/кг сухого веса и менее 10 мг/кг сырого веса);
- ДНК-диагностика;
- высокий терапевтический эффект при применении медьвыводящих препаратов.

Лечение

Наиболее распространенным и эффективным препаратом для лечения больных ГЛД является D-пеницилламин – тиоловый препарат, содержащий сульфгидрильные группы, образующие комплексы с медью (купренил, артамин, металлкаптаза и др.). Лечение D-пеницилламином является патогенетическим, поддерживающие дозы препарата необходимо принимать в течение всей жизни для стабилизации баланса меди на уровне, близком к физиологическому. Кроме клинического мониторинга, осуществляется также биохимический контроль с определением свободной меди в сыворотке крови и динамики экскреции меди с мочой. По мере выведения избытков меди из организма нормализуется функционирование клеток различных органов и тканей (в первую очередь печени и мозга), а состояние больных в 95 % случаев улучшается. Лучше всего реагируют на лечение больные с дрожательной и дрожательно-ригидной формами ГЛД.

Альтернативным методом является применение препаратов цинка (сульфат цинка, ацетат цинка). Цинк обладает минимальной токсичностью, связываясь с металлотонином кишечника, он способствует экскреции меди с желчью и выведению ее с калом (а не с мочой, как при лечении тиоловыми препаратами).

Большое значение во всех стадиях ГЛД имеет диета, щадящая печень: исключение продуктов, богатых медью (шоколад, кофе, бобовые, орехи и др.). Проводится лечение витаминами группы В, антиоксидантами (аскорбиновая кислота, витамин Е, эссенциале), при синдроме гемодепрессии – переливание свежемороженой одногруппной плазмы, эритроцитарной или

тромбоцитарной массы и другие виды симптоматической терапии. При висцеральных формах, осложненных гепатолиенальным синдромом, гиперспленизмом с резко выраженной вторичной гемодепрессией в ряде случаев положительный эффект дает спленэктомия.

References

1. Bagaeva M.E. The Wilson's disease in children: synopsis, thesis. M., 2004. 24 p.
2. Belousova E.D. Hepatolenticular degeneration (Wilson's disease), *Rossiiskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 2009. Vol. 54, No. 3. P. 34–37.
3. Zaljalova Z.A. Clinical and MRI analysis for the various options of the Wilson's disease, *Nevrologicheskij vestnik*. 2002. Vol. 34, No. 1/2. P. 5–10.
4. Ivanova-Smolenskaja I.A. Wilson's disease, *Nervy*. 2006. No. 4. P. 12–16.
5. Illarioskhin S.N., Ovchinnikov I.V., Ivanova-Smolenskaja I.A. et al. Molecular genetic analysis of inherited neurodegenerative diseases, *Genetika*. 2004. Vol. 40, No. 6. P. 816–826.
6. Kaganov B.S., Zanutdinov Z.M., Strokova T.V. et al. The criteria of the diagnosis and clinical course for children cirrhosis, *Infekcionnye bolezni*. 2008. Vol. 6, No. 3. P. 14–21.
7. Karabanov A.V., Ovchinnikov I.V., Poliwuk V.V. The analysis of mutations in the gene ATR7V and experience of direct DNA diagnosis in hepatolenticular degeneration, *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2001. Vol. 101, No. 4. P. 44–47.
8. Karaguljan N.A. Features of the eye damage in children with Wilson's disease, *Oftalmologija*. 2005. Vol. 2, No. 3. P. 54–60.
9. Konovalov N.V. Hepatolenticular dystrophy. M.: Medgiz, 1960. 556 p.
10. Lazebnik L.B. Hepatolenticular degeneration: yesterday, today and tomorrow, 2007. No. 2. P. 55–64.
11. Misao Ovada, Ken Suzuki, Masaru Fukushi et al. Mass screening for Wilson's disease by measuring urinary holotseruloplazmina, *Voprosy sovremennoj pediatrii*. 2002. Vol. 1, No. 4. P. 21–23.
12. Proskokova T.N. Partial seizures as a debut of neurological stage in hepatolenticular degeneration, *Nevrologicheskij zhurnal*. 2007. Vol. 12, No. 2. P. 22–25.
13. Rahimova O.Ju. The variants of renal damage in Wilson's disease, *Ter. arhiv*. 2004. Vol. 76, No. 9. P. 88–91.
14. Rozina T.P. Clinical characteristics, course and prognosis for abdominal forms of Wilson's disease, *Rossiiskij zhurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2005. Vol. 15, No. 6. P. 68–74.
15. Rozina T.P., Rahmanova O.Ju., Arion E.A. et al. Vascular purpura and Guillain-Barre syndrome in severe Wilson's disease., *Klin. medicina*. 2005. No. 6. P. 80–83.
16. Rossina A.L. Decompensated liver cirrhosis in the Wilson's disease, *Detskie infekcii*. 2008. Vol. 7, No. 1. P. 65–66.
17. Starikov A.S. Electrical stimulation of the brain in the Wilson's disease (neuromorphological and neurophysiological analysis), *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2001. Vol. 101, No. 5. P. 21–23.
18. Suhareva G.V., Caregorodceva T.M., Petrakov A.V. et al. Liver damage in patients with gepatoterebralnoy dystrophy, *Ter. arhiv*. 2006. Vol. 78, No. 2. P. 52–57.
19. Ferenci P. Hemochromatosis and Wilson's disease, *Rossiiskij zhurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2001. Vol. 11, No. 4. P. 64–67.
20. Shadrina M.I., Slomenskij P.A., Karabanov A.V. et al. Simple and fast method for the determination of mutation 1069Gln in Wilson's disease, *Genetika*. 2002. Vol. 38, No. 12. P. 1723–1725.
21. Shvarcman A.L., Vaharlovskij V.G., Gajchoki V.S. The molecular structure of human ceruloplasmin gene and its expression during the mutation in Wilson's disease, *Dokl. AN SSSR*. 1981. No. 3. P. 717–720.
22. Sherlock Sh., Duli Dzh. Liver and biliary tract disease. M.: GEOTAR-Media, 2000. 864 p.
23. Shuleshova N.V., Mackevich O.R., Ananeva N.I. et al. The fetchers of the neuroimaging in cerebral degeneration with with a description of their own observations, *Medicinskaja vizualizacija*. 2001. No. 4. P. 38–42.
24. Werbakova M.Ju., Strokova T.V., Potalov A.S. et al. Wilson's disease in children: variants of debut and difficulties of diagnosis, *Pediatrija*. 2008. Vol. 87, No. 5. P. 59–65.
25. Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene, *Nat. Genet*. 1993. Vol. 5. P. 327–337.
26. Chou M.S., Kuo Y.T., Chen C.K. MRI manifestations of Wilson's disease and its change in response to treatment, *Rivista di Neuroradiology*. 1998. Vol. 11, No. 2. P. 31–34.
27. Cox D.W. Genes of the copper pathway, *Am. J. Hum Genet*. 1995. Vol. 56. P. 828–834.
28. Czlonkowska A., Rodo M., Galda J. Very high frequency of the His1069Gln mutation in Polish Wilson disease patients, *J. Neurol*. 1997. Vol. 244. P. 591–599.
29. Ferenci P. Regional distribution of mutations in the ATP7B gene in patients with Wilson disease impact in genetic testing, *Hum. Genet*. 2006. Vol. 120. P. 151–159.
30. Gollan J.L., Gollan T.J. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects, *J. Hepatol*. 1998. Vol. 28. P. 28–36.
31. Menkes J.H., Sarnat H.B. (eds.) Child Neurology. Philadelphia–Baltimore: Lippicott Williams and Wilkins. 2000. 1280 p.
32. Mochizuki H., Kamakura K., Masaki T. Atypical MRI features of Wilson's disease: high signal in globus pallidus on T1-weighted images, *Neuroradiology*. 1997. Vol. 39, No. 3. P. 171–178.
33. Shah A.B., Chernov I., Zhang H.T. Identification and analysis of mutation in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses, *Am. J. Hum Genet*. 1997. Vol. 61. P. 6317–6328.
34. Soltanzaden A., Soltanzaden P., Nafissi S. Wilson's disease: a great masquerader, *Eur. Neurol*. 2007. Vol. 57, No. 2. P. 80–85.
35. Sternlieb I., Scheinberg I.H. D-penicillamine duced Goodpasture's syndrome in Wilson's disease, *Liver and Biliary Disease / eds. R. Wright et al. London, 1985. P. 949–961.*
36. Taly A.B., Meenakshi-Sundaram S., Sinha S. Wilson disease: description of 282 patients evaluated over 3 decades, *Medicine (Baltimore)*. 2007. Vol. 86, No. 2. P. 112–121.
37. Tanzi R.E., Petrukhin K., Chernov I. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene, *Nat. Genet*. 1993. Vol. 5. P. 344–350.
38. Thomas G.R., Forber J.R., Roberts E.A. The Wilson disease gene spectrum of mutations and their consequences, *Nat. Genet*. 1995. Vol. 9. P. 210–217.
39. Walshe J.M. Management of penicillamine nephropathy in Wilson's disease: a new chelating agent, *Lancet*. 1969. Vol. 2. P. 1401–1402.

Поступила в редакцию 05.06.2011.

HEPATOLENTICULAR DISEASE

S.E. Gulyaeva, A.A. Ovchinnikova, A.V. Ovchinnikov, D.A. Kablukov
Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok
690950 Russian Federation)

Summary – The paper reviews the cited literature in an effort to overcome insufficient information awareness of doctors, describes up-to-date views on the molecular genetic defect of hepatolenticular degeneration, features of ATP7B-gene mutation, mutation in its defect exons, estimates the polymorphism of its clinical picture and principles of early pathology diagnostics. The authors focus special attention on the issues of neuroimaging, ultrasound investigation and biopsy of liver, and laboratory indices. The study specifies modern standpoints on the disease mechanism and systematises clinical manifestations.

Key words: hepatolenticular disease, clinical picture, diagnostics, treatment.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 5–11.

УДК 661.882.27:666.651.4:616-089.843

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКРЫТИЯ ДЛЯ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ

С.В. Гнеденков¹, Ю.П. Шаркеев², С.Л. Синябрюхов¹, О.А. Хрисанфова¹, Е.В. Легостаева², А.Г. Завидная¹, А.В. Пузь¹, И.А. Хлусов^{3,4}

¹Институт химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159), ²Институт физики прочности и материаловедения СО РАН (634021 г. Томск, Академический пр-т, 2/4), ³Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова (640014 г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6), ⁴НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при Томском политехническом университете и Сибирском государственном медицинском университете (634050 г. Томск, Московский тракт, 2).

Ключевые слова: имплантаты, покрытия, гидроксипатит, биоактивность/биоинертность.

Обзор результатов научных исследований по модификации поверхности титановых сплавов, используемых в имплантационной хирургии, на примере изучения антикоррозионных биоинертных композиционных покрытий на никелиде титана и биоактивных кальцийфосфатных слоев, содержащих гидроксипатит, на титане VT1-0. Представлены результаты модификации поверхности титановых сплавов с использованием плазменного электролитического оксидирования. Условия получения покрытий определяют их функциональное назначение. Показано, что целенаправленный подбор электролитов, используемых для формирования покрытий, позволил получить на поверхности технически чистого титана VT1-0 кальциево-фосфатные слои, биологическая активность которых подтверждена экспериментальными данными *in vivo* и *in vitro*. Показана перспективность применения метода плазменного электролитического оксидирования для формирования на поверхности никелида титана композиционных биоинертных покрытий, улучшающих его морфологическую структуру и электрохимические свойства, существенно снижая выход ионов никеля в организм.

Современная медицина широко использует искусственные материалы для замены поврежденных тканей и органов. В зависимости от их назначения вводимые в организм имплантаты должны замещаться живой тканью и/или функционировать в течение длительного времени. Большую часть металлических имплантатов, используемых в настоящее время в медицине, изготавливают из титана и титановых сплавов. Титановые сплавы, как материалы с приемлемыми (но небезупречными) для этих целей коррозионными и коррозионно-механическими свойствами, широко применяются в имплантационной хирургии.

В целом материалы, претендующие на роль имплантатов, должны удовлетворять ряду требований, а именно: не подвергаться коррозии, иметь характеристики, близкие к механическим характеристикам костной ткани, не вызывать реакций иммунной системы, интегрироваться с костной тканью и стимулировать процесс остеогенеза.

Одним из способов повышения прочности соединения костной ткани с имплантатом является нанесение на него покрытий, состоящих из родственных организму материалов. В силу сходства химического

состава соединения на основе фосфатов кальция находят широкое применение в медицине при операциях по восстановлению целостности поврежденной кости в качестве биоактивной керамики [19]. В частности, физические и химические свойства гидроксипатита, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, обеспечивают ему идеальную биосовместимость, активно стимулируя остеогенез и восстановление костной ткани. Иногда для повышения биосовместимости с костной тканью применяют гидроксипатит нестехиометрического состава $(\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x})(\text{OH})_{2-x}$, где $0 < x < 1$, разбавляя более растворимыми фосфатами кальция, например трехзамещенным ортофосфатом [12]. Вместе с тем установлено, что не только химический состав, но и морфология поверхности имплантата является важной характеристикой, определяющей реакцию организма на чужеродный материал [28]. С целью повышения адгезионной прочности покрытий к титановой основе в ряде случаев перед их нанесением необходимо проводить обработку поверхности для создания определенной шероховатости. Это может быть пескоструйная обработка или химическое травление, что позволяет сформировать многоуровневую (многомодальную) поверхность с высокопористой структурой, которая обеспечивает повышение адгезионной прочности кальцийфосфатного покрытия к титановой основе [11].

Кроме того, важнейшей проблемой для некоторых имплантационных материалов является создание на их поверхности биологически инертных покрытий. Одним из таких материалов, используемым в имплантационной хирургии, является никелид титана (46÷52 ат. % – Ti и 48÷54 ат. % – Ni), обладающий уникальным эффектом памяти формы [25]. В частности, он используется для изготовления фиксаторов при лечении позвоночно-спинальных травм и дегенеративно-дистрофических заболеваний, имплантатов-скрепок, применяемых для соединения грудины при кардиологических операциях, и т.д. Однако диффузия и накопление ионов никеля в мягких тканях может приводить к негативным последствиям, в частности, к развитию новообразований.

Для защиты имплантата от коррозионно-активной биологической среды и для лучшей адаптации костных

Гнеденков Сергей Васильевич – д-р хим. наук, профессор, заместитель директора Института химии ДВО РАН, тел.: +7 (423) 231-25-90; e-mail: svg21@hotmail.com

тканей к инородному телу оптимальным вариантом является создание гетерооксидных композиционных биоинертных (в случае присутствия в них полимера) или биоактивных (в случае присутствия в них гидроксиапатита кальция, фосфатов, антибиотиков и т.д.) слоев на поверхности титаносодержащих материалов с использованием метода плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) [1–9, 15].

Метод ПЭО основан на анодной или переменноточковой поляризации обрабатываемого материала при высоких напряжениях, вызывающих протекание плазменных микрозарядов на поверхности электрода. В результате местного высокоэнергетического воздействия на поверхности изделий формируются слои, включающие в свой состав как элементы матрицы (оксидируемого металла), так и элементы электролита [4, 10]. Свойства таких слоев отличаются от свойств обычных анодных оксидных пленок. Последующей обработкой созданной методом ПЭО поверхностной структуры (заполнение пор биоактивными и/или биоинертными композитами) можно сформировать композиционное покрытие, имеющее перспективу практического использования в имплантационной хирургии.

В данном обзоре представлены результаты научных исследований, связанные с модификацией поверхности титановых сплавов, используемых в имплантационной хирургии, на примере изучения антикоррозионных биоинертных композиционных покрытий на никелиде титана и биоактивных кальцийфосфатных поверхностных ПЭО-слоев, содержащих гидроксиапатит, на титане ВТ1-0 [1, 5–9, 16–18, 27].

Антикоррозионные покрытия на никелиде титана

В научной литературе к настоящему времени чрезвычайно мало представлена информация о получении защитных покрытий на никелиде титана (в отличие от титановых и алюминиевых сплавов), а тем более об обработке поверхности с использованием ПЭО. В результате проведенного поиска для формирования защитных поверхностных слоев был выбран электролит, содержащий алюминат натрия (NaAlO_2), карбонат натрия (Na_2CO_3) и трехзамещенный фосфат натрия ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). На основе ранее разработанных принципов направленного плазменно-электролитического синтеза предполагалось, что в данном составе электролита на поверхности никелида титана могут формироваться слои, содержащие в своем составе соединения алюминия (оксиды, фосфаты) и диоксид титана (TiO_2) [13]. Кроме того, в электролит добавляли диметилглиоксим, который, как известно, связывает в растворе катионы никеля (Ni^{2+}) в хелатное соединение – диметилглиоксимат никеля, $\text{Ni}(\text{HC}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2)_2$, имеющее красный цвет. Предполагалось, что катионы никеля, образующиеся в растворе электролита в процессе оксидирования при анодном растворении никеля из никелида титана, будут

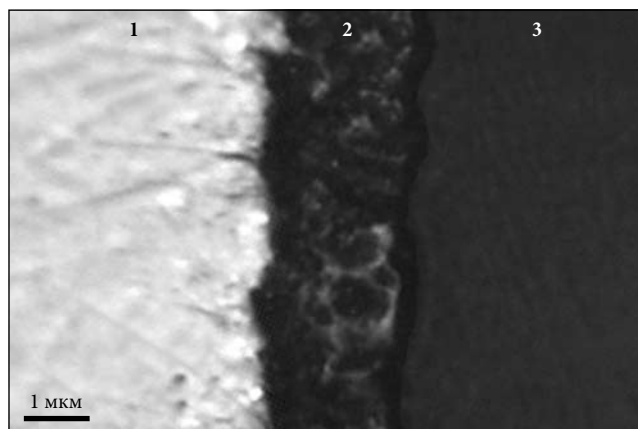


Рис. 1. Фотография поперечного шлифа ПЭО-покрытия, сформированного на поверхности никелида титана:
1 – никелид титана, 2 – покрытие, 3 – полимер [5].

связываться диметилглиоксимом в комплексное соединение, стабильное при комнатной температуре и нерастворимое в водном электролите. Согласно предполагаемому механизму, осадок будет способствовать уменьшению пористости формируемого анодного слоя, увеличивая его антикоррозионные свойства. О наличии же диметилглиоксимата никеля в растворе электролита свидетельствует появление в процессе оксидирования окрашенного осадка как в объеме электролитической ячейки, так и на поверхности оксидируемого образца.

Согласно данным рентгенофазового анализа, в состав покрытия входят фосфат алюминия (AlPO_4) и двойной оксид никеля-алюминия (NiAl_2O_4) [5, 27]. При анализе дифрактограмм поверхностных слоев на некоторых образцах было установлено присутствие кислородсодержащего соединения никеля и титана ($\text{Ni}_3\text{Ti}_3\text{O}$), концентрация которого мала. В то же время в составе поверхностных слоев не было обнаружено оксидов титана. На рис. 1 представлена оптическая фотография поперечного шлифа образца с ПЭО покрытием на поверхности. Толщина ПЭО покрытия составляет около 20 мкм. Из анализа фотографии следует, что поверхность формируемых на никелиде титана слоев неоднородна: встречаются поры и наросты. Возможно, что покрытия имеют кластерный характер.

Поскольку состояние поверхности изделия существенно влияет на его поведение в коррозионно-активной среде [25], с целью изменения состояния поверхности исходного материала и последующего выявления этого влияния образцы никелида титана были обработаны несколькими способами:

- 1) нанесением на поверхность ультрадисперсного политетрафторэтилена с последующим отжигом при 100°C в течение часа;
- 2) плазменно-электролитическим оксидированием в потенциодинамическом монополярном режиме до 180 В со скоростью развертки напряжения 0,25 В/с и в знакопеременном биполярном комбинированном

Таблица 1

Коррозионные свойства исследуемых образцов никелида титана с различными покрытиями [5, 27]

| № образца | Режим формирования покрытия, электролит | R_p , Ом·см ² | I_C , А/см ² | E_C , В |
|-----------|---|----------------------------|---------------------------|-----------|
| 1 | Без покрытия | $1,57 \cdot 10^5$ | $1,66 \cdot 10^{-7}$ | -0,215 |
| 2 | УПТФЭ* (отжиг при 100 °С, 1 час) | $2,34 \cdot 10^5$ | $1,11 \cdot 10^{-7}$ | -0,261 |
| 3 | ПЭО в монополярном режиме: $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 10 г/л, NaAlO_2 – 20 г/л, Na_2CO_3 – 10 г/л | $6,39 \cdot 10^5$ | $4,09 \cdot 10^{-8}$ | -0,262 |
| 4 | ПЭО в биполярном режиме: $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 10 г/л, NaAlO_2 – 20 г/л, Na_2CO_3 – 10 г/л | $6,60 \cdot 10^6$ | $3,95 \cdot 10^{-9}$ | -0,273 |
| 5 | ПЭО в монополярном режиме: $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 10 г/л, NaAlO_2 – 20 г/л, Na_2CO_3 – 10 г/л, ДМГО** – 1 г/л | $8,12 \cdot 10^5$ | $2,34 \cdot 10^{-8}$ | -0,080 |
| 6 | Как образец № 3 + УПТФЭ* | $6,05 \cdot 10^6$ | $4,31 \cdot 10^{-9}$ | -0,055 |
| 7 | Как образец № 4 + УПТФЭ* | $9,11 \cdot 10^6$ | $3,67 \cdot 10^{-9}$ | -0,082 |

* Ультрадисперсный политетрафторэтилен.

** Диметилглиоксим.

режиме. Комбинированный режим представляет собой сочетание анодного потенциостатического ($dU/dt = 0,25$ В/с) и катодного гальваностатического ($j_k = 0,5$ А/см²) режимов поляризации. Соотношение длительностей анодного и катодного периодов поляризации составляло $\tau_a/\tau_k = 4$;

3) плазменно-электролитическим оксидированием (в режимах, соответствующих пункту 2) с последующим нанесением на поверхность ПЭО-слоя ультраполитетрафторэтилена и отжигом структуры при 100 °С в течение часа.

Анализ электрохимического поведения образцов в физиологическом растворе показывает, что наибольшими защитными свойствами обладают композиционные покрытия с ПЭО-слоем, обработанным ультрадисперсным политетрафторэтиленом (рис. 2, кривые 6 и 7). Такая обработка приводит к облагораживанию стационарного потенциала (потенциала свободной коррозии) образца (E_C) и к снижению уровня токов коррозии (I_C). Введение в формирующий раствор диметилглиоксима также влечет за собой небольшое повышение защитных свойств (вывод сделан из сравнения обр. № 3 и 5). В табл. 1 представлены сравнительные коррозионные характеристики образцов никелида титана, обработанных различными способами, также приведено значение поляризационного сопротивления образца (R_p), определенное по линейному участку поляризационной кривой в области стационарного потенциала.

Анализ результатов электрохимических исследований [5, 27] показывает, что обработка поверхности никелида титана ультрадисперсным политетрафторэтиленом мало влияет на состояние границы раздела электрод/электролит, лишь незначительно уменьшая уровень анодного тока (рис. 2). Низкий эффект от такой обработки, вероятнее всего, связан со слабой адгезией полимера к металлической подложке и недостаточной сплошностью образовавшегося защитного слоя. Обработка образца методом ПЭО приводит к повышению его устойчивости в исследуемой среде

[18]. Добавление в электролит диметилглиоксима несколько увеличивает защитные свойства покрытий (рис. 2, кривая 5), однако отличие весьма незначительное. На поляризационных кривых (рис. 2, кривая 5) фиксируется заметное увеличение только потенциала свободной коррозии. Анодный ток для такого покрытия, соизмеримый на начальном участке с анодным током для образца с ПЭО-слоем, сформированным в биполярном комбинированном режиме, после 0,7 В становится даже больше, чем у других образцов с ПЭО-покрытиями. Можно предположить, что хелатное соединение – диметилглиоксимат никеля, – осаждающаяся в порах оксидного слоя, приводит к некоторому повышению защитных свойств поверхностного слоя. Однако его концентрация в пленке невысока (менее 10 %), так как рефлексы, соответствующие этой фазе, не фиксируются на дифрактограмме. Являясь термически нестойким соединением, диметилглиоксимат никеля частично разрушается при плазменно-электролитическом воздействии, как известно, сопряженном с реализацией высоких температур в короткоживущих плазменных каналах, а также в результате термоллиза в прилегающих к плазменному

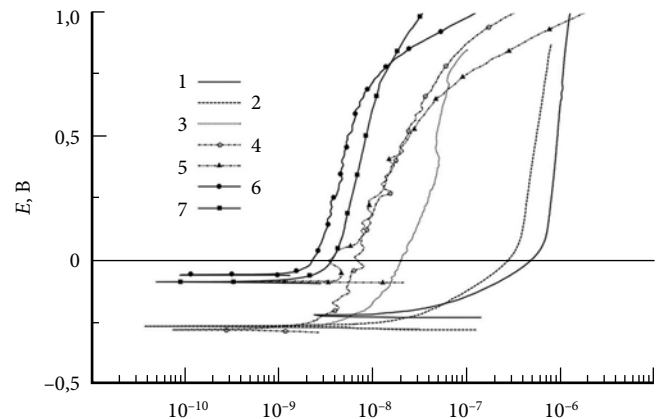


Рис. 2. Поляризационные кривые, снятые в физиологическом растворе со скоростью развертки $v=10$ мВ/мин. Условные обозначения образцов в соответствии с таблицей в тексте статьи [5].

Таблица 2

Некоторые параметры исследуемых в условиях *in vivo* поверхностных ПЭО-слоев [9]

| № образца | Состав электролита, г/л; режим поляризации | Кол-во срезов | R _a , мкм | Фазовый состав покрытий | S КОСТИ, мм ² | S КОСТНОГО МОЗГА, мм ² | Содержание хим. элементов, ат. % | | | Ca/P |
|-----------|---|---------------|----------------------|--|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------|------|------|
| | | | | | | | Ti | Ca | P | |
| 1 | Ca ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ ·4H ₂ O, 30; Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 30; монополярный | 17 | 2,15 | TiO ₂ + рентгеноаморфная фаза | 0,4483 | 0,4318 | 11,32 | 3,18 | 3,69 | 0,86 |
| 2 | Ca ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ ·4H ₂ O, 20; Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 20; монополярный | 17 | 2,86 | TiO ₂ + рентгеноаморфная фаза | 0,4749 | 0,8140 | 11,49 | 3,11 | 3,28 | 0,95 |
| 3 | Ca ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ ·4H ₂ O, 40; Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 40; монополярный | 11 | 9,13 | TiO ₂ + рентгеноаморфная фаза | 0,3346 | 0,2950 | 6,29 | 9,28 | 5,24 | 1,77 |
| 4 | Ca ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ ·4H ₂ O, 20; Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 20; биполярный | 9 | 1,97 | TiO ₂ + рентгеноаморфная фаза | 0,7635 | 0,3670 | 19,07 | 11,73 | 7,21 | 1,63 |
| 5 | Ca(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O, 50; Na ₂ HPO ₄ , 25; биполярный | 17 | 1,79 | Ca ₅ (PO ₄) ₂ OH + Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 0,7453 | 0,5450 | 2,57 | 17,22 | 8,85 | 1,94 |

каналу областей покрытия [20, 24]. Таким образом, низкое содержание диметилглиоксимата никеля в порах покрытия не позволяет обеспечить существенной коррозионной защиты при больших полевых смещениях.

Следует учитывать, что ПЭО-покрытие представляет собой слой, состоящий из внешней пористой и внутренней беспористой частей. Пористый подслой, как правило, имеет кратероподобные углубления с диаметром до нескольких микрон. Таким образом, размеры пор несколько больше размеров частиц порошка ультрадисперсного политетрафторэтилена (порядка 1 мкм), применяемого для обработки поверхности пленки. Создание пористой структуры поверхности может быть дополнительным преимуществом ПЭО, поскольку развитая поверхность способствует лучшему обрастанию имплантата костной тканью, а также позволяет заполнить поры биоинертными или биоактивными композитами. После обработки образца с ПЭО-покрытием ультрадисперсным политетрафторэтиленом происходит значительное увеличение модуля импеданса, который становится на порядок выше, чем у образца без покрытия [27]. Это свидетельствует о том, что обработка политетрафторэтиленом позволяет заполнить поры покрытия полимером и создать на поверхности дополнительный барьер, препятствующий выходу ионов металла в раствор.

Таким образом, показана перспективность применения метода ПЭО для формирования на поверхности никелида титана покрытий, улучшающих его морфологическую структуру и электрохимические свойства. Установлено, что использование ультрадисперсного политетрафторэтилена в составе композиционного покрытия на данном материале позволяет повысить его устойчивость в коррозионно-активной среде [18]. Сочетание поляризационного и плазменного воздействий на поверхности образцов, реализуемое при ПЭО, позволяет сформировать покрытия с

защитными антикоррозионными свойствами. Такие слои содержат поры в поверхностной части покрытия, которые могут быть использованы в качестве контейнера для лекарств (например, антибиотиков, гидроксилатапата или других фосфатсодержащих веществ, обеспечивающих наилучшую совместимость с костными тканями, если необходимо получить биологически активную поверхность имплантата или порошка полимера, если необходимо создать биологически инертную поверхность). Как показывают экспериментальные результаты предшествующих исследований, после наполнения пор ультрадисперсным порошком политетрафторэтилена, который может быть использован в качестве полимера, для получения сглаженных гидрофобных поверхностных слоев необходима термообработка [2, 14, 17, 18]. Полимер в этом случае запечатывает поры, в которые можно предварительно ввести лекарственные препараты и, таким образом, уменьшить их диффузию из поверхностного слоя. Это увеличивает продолжительность терапевтического действия лекарства, находящегося в поре. Кроме того, формируемые антикоррозионные защитные покрытия, значительно уменьшая диффузию ионов никеля из никелида титана, препятствуют его аккумуляции в тканях человека [16].

Биоактивные кальциево-фосфатные покрытия на титане

В результате проработки различных кальцийсодержащих электролитических систем, а также режимов оксидирования было установлено, что методом ПЭО на поверхности титана VT1-0 можно формировать различные кальциево-фосфатные покрытия, в том числе содержащие гидроксилатапатит [6, 7, 9, 11]. Различные кальцийсодержащие соли были выбраны в качестве компонентов электролита с целью формирования ПЭО-покрытий на титане VT1-0 с отношением Ca/P, близким к отношению в костной ткани человека (1,67). В табл. 2 приведены составы электролитов, условия формирования, фазовый и элементный составы и

отношение Ca/P для покрытий, полученных на титане в электролитах, содержащих цитрат и ацетат кальция с добавлением двузамещенного фосфата натрия. Как следует из анализа результатов эксперимента, приведенных в таблице, покрытия, полученные в ацетатсодержащем электролите, включают в свой состав гидроксиапатит. Покрытия, сформированные в цитратсодержащем электролите, хотя и содержат в составе кристаллической фазы только диоксид титана, но, судя по величине отношения Ca/P, в их состав входят кальциево-фосфатные соединения, присутствующие в виде рентгеноаморфной фазы.

Важным фактором, определяющим синтез гидроксиапатита в поверхностном слое, является характер поляризации при ПЭО. Только в биполярном режиме ПЭО в ацетатсодержащем электролите был получен гидроксиапатит, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, а в цитратсодержащем электролите были достигнуты большие концентрации Ca и P в составе покрытия при невысоких концентрациях электролита (табл. 2). Вероятно, при биполярном режиме обработки титана переполяризация электрода приводит к последовательному насыщению приэлектродного пространства ионами кальция и фосфата (при катодной поляризации приповерхностные слои электролита насыщаются ионами Ca^{2+} , при анодной поляризации – ионами, которые, взаимодействуя, образуют молекулы кальциево-фосфатных соединений: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Кроме того, в биполярном режиме плазменно-электролитической обработки в состав плазмы вовлекается большее количество элементов электролита, что обеспечивает на поверхности имплантата более интенсивный электрохимический синтез кальциево-фосфатных соединений из соответствующих элементов, чем в монополярном режиме. Биполярный режим плазменного электролитического формирования покрытий имеет некоторые преимущества перед монополярным. В интервале катодной поляризации происходит переформирование двойного электрического слоя (Гельмгольца или Гуи-Чепмена), который снижает ионный транспорт и вероятность проникновения окисляющих реагентов к обрабатываемому электроду. Кроме того, наряду с разупорядочиванием двойного электрического слоя электролита в катодный период происходит также переформирование слоя, увеличивающего сопротивление переносу заряда (область пространственного заряда) в материале самого покрытия. В силу этих причин при последующем положительном смещении на аноде реализуются более мощные плазменные разряды. В состав плазмы при этом попадает большее количество элементов электролита. Выделяемая при термической деструкции цитратсодержащих и ацетатсодержащих анионных комплексов теплота обеспечивает большую длительность теплового воздействия на формируемый материал оксидного слоя (по сравнению с длительностью, обеспечиваемой разрушением легких анионов), что способствует, в свою очередь, переходу

метастабильного состояния соединений, входящих в материал покрытия, в стабильные. Это влияет на морфологию поверхностных слоев, изменяет антикоррозионные характеристики покрытий.

Исследование элементного состава покрытий показало, что во всех образцах присутствуют кальций и фосфор (см. табл. 2), в то время как рентгенофазовый анализ не подтвердил наличия кальциево-фосфатных соединений в некоторых покрытиях. Это означает, что такие соединения присутствуют либо в концентрации менее 10% (предел обнаружения рентгенофазового анализа), либо находятся в составе рентгеноаморфной фазы. Данные энергодисперсионной спектроскопии позволяют вычислить отношение кальция к фосфору, которое показывает степень соответствия состава покрытия, полученного методом ПЭО, составу минеральной составляющей костной ткани [9].

При исследовании методом электронной сканирующей микроскопии морфологии покрытий, полученных в цитрат-фосфатном и ацетат-фосфатном электролитах, было установлено, что поверхность развитая, имеет поры, наличие которых благоприятно для врастания в них костной ткани и формирования более прочного соединения имплантата с костью. Одним из преимуществ пористых покрытий является перспектива их использования для создания композиционных гетероструктур. Поры и неровности в поверхности покрытий могут быть заполнены различными лекарственными веществами, например, антибиотиками, чтобы дополнительно снизить вероятность воспалительных процессов [9]. Развитая пористая поверхность полученного покрытия и его состав, близкий к минеральному составу костной ткани, предполагают быстрое вживление имплантата за счет того, что костная ткань прорастает в поры его поверхности.

Одним из самых важных условий для заместителей кости, в особенности для тех, которые используются в качестве нагруженных деталей, является близость их механических характеристик свойствам естественной костной ткани. Изделия из титана имеют модуль упругости $E=80$ ГПа (при микротвердости $H=2,7$ ГПа), что значительно больше по сравнению с естественной костью, для которой $E=20$ ГПа (при $H=1,2$ ГПа). Несоответствие этих параметров является причиной возникновения краевых напряжений в месте соединения имплантата с окружающей костью. При определенных величинах деформаций, возникающих при нагрузках, иногда случается отслоение кости от имплантата, приводящее к некрозу. Поэтому в данной работе были изучены механические и упруго-пластические характеристики кальцийфосфатных поверхностных слоев на титане.

Согласно проведенным измерениям, микротвердость поверхностного ПЭО-слоя составила 2,2 ГПа, что несколько меньше микротвердости титана ВТ1-0 ($H=2,7$ ГПа) [9]. В то же время модуль Юнга для покрытия ($E=30$ ГПа) почти в 2,5 раза меньше по сравнению с подложкой ($E=80$ ГПа). Таким образом,

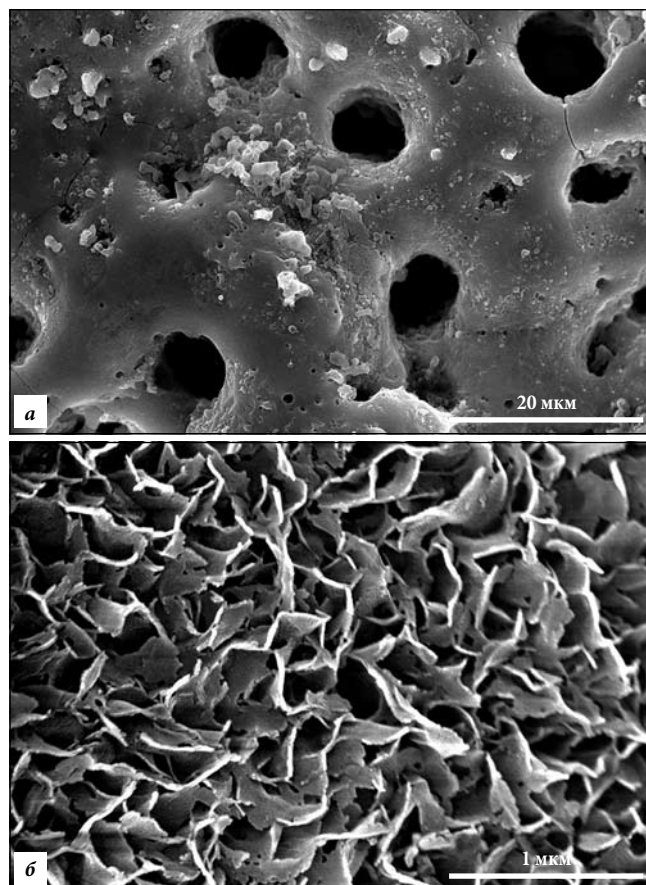


Рис. 3. Поверхность образца титана VT1-0 с покрытием, полученным в ацетатно-фосфатном электролите:
 а – до, б – после выдержки в SBF-растворе в течение 30 сут. Сканирующая электронная микроскопия [9].

сформированное на поверхности титана кальцийфосфатное покрытие имеет более близкие к естественной костной ткани механические характеристики по сравнению с подложкой, что также является важным достоинством получаемых методом ПЭО оксидных гетерогенных слоев. Кальциево-фосфатное покрытие в этой ситуации, может выполнять функции демпфера, минимизируя вероятность отслоения кости от имплантата при деформациях [9].

Основополагающим фактором успешного применения любого материала в медицине является предварительное тестирование в условиях *in vitro* и *in vivo*. Испытания *in vivo* продолжаются длительный период времени, как правило, до нескольких месяцев. Поэтому проводят предварительное тестирование *in vitro*, которое в ходе простых экспериментов позволяет разделить материалы по степени биоактивности, в доступных для проведения в лабораторных условиях.

Для оценки в лабораторных условиях биологической активности образцов с ПЭО-покрытиями использовали их выдержку в искусственной среде, имитирующей плазму крови человека (Simulated Body Fluid – SBF) [23] при постоянной температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. После выдержки покрытий в насыщенном по ионам

Ca^{2+} и SBF-растворе происходит минерализация и осаждение кристаллов кальциево-фосфатных соединений на активных центрах поверхности покрытия и формирование чешуйчатой структуры гидроксиапатита, присутствие которого подтверждается методом рентгенофазового анализа (рис. 3) [7, 9].

Полученные результаты [7, 9] согласуются с данными, приведенными в ряде работ [21, 26, 29, 30], где констатируется, что кальциево-фосфатные покрытия с определенным уровнем шероховатости могут индуцировать образование кристаллического гидроксиапатита. Р. Huang et al. [21] было показано, что при выдержке образца с покрытием в SBF-растворе на поверхности покрытия наблюдается рост гидроксиапатита, образование которого является критерием биоактивности пленки. Покрытие улучшает биоактивность оксидной пленки и стимулирует биологические реакции *in vivo*, ускоряя рост кости и уменьшая время вживления имплантата. Как известно, полученные методом ПЭО покрытия на титане во многих случаях содержат помимо кальциево-фосфатного покрытия еще и диоксид титана (в модификации рутил и анатаз). Изоэлектрическая точка рутила – $4,6 \pm 0,4$ и анатаза – $5,9 \pm 0,2$ [20]. В SBF-растворе рутил и анатаз могут заряжаться отрицательно и электростатически адсорбировать Ca^{2+} на поверхности покрытия. Последние, притягивая анионы OH^- , и создают пересыщение фосфата кальция в приповерхностном слое покрытия. При определенных условиях фосфат кальция может минерализоваться из раствора с образованием гидроксиапатита.

Вместе с тем, установлено, что эффективность остеоинтеграции, т.е. врастания имплантатов, зависит от многих факторов, в том числе от состояния кости, структуры и свойств имплантируемого изделия, его адгезии, механических свойств, процессов, протекающих на границе раздела покрытие/костная ткань и покрытие/имплантат [22], что можно выяснить только в результате прямого эксперимента на биологическом объекте.

Для дальнейшего, более глубокого исследования биоактивности полученных ПЭО-покрытий *in vivo* были проведены эксперименты по вживлению титановых имплантатов с покрытиями, полученными в цитрат-фосфатном и ацетат-фосфатном электролитах, непосредственно в организм лабораторных мышей [9]. Результаты исследований показали, что подкожная имплантация дисков не вызвала побочных эффектов, связанных с воспалительными и аллергическими явлениями. Было установлено, что для возникновения остеоиндуктивных свойств в покрытии необходимо наличие соединений фосфора и кальция в определенном количественном соотношении. Однако, судя по результатам эксперимента, этот фактор является не единственным значимым параметром. Одним из важных условий также служит шероховатость кальциево-фосфатного слоя и абсолютная концентрация кальция и фосфора в покрытии [9].

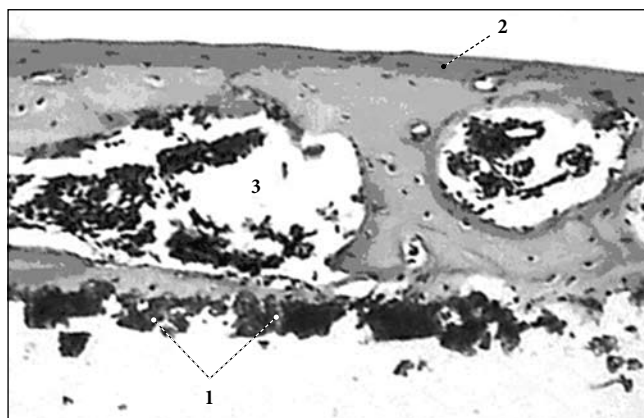


Рис. 4. Структура тканевых пластинок, выросших на кальциево-фосфатных покрытиях в тесте эктопического костеобразования у мышей:

1 – фрагменты кальциево-фосфатного покрытия, 2 – костная пластинка, 3 – лакуны, заполненные красным костным мозгом. Окр. гематоксилином и эозином, $\times 400$ [9].

На гистологических препаратах тканевых пластинок, выросших на искусственных поверхностях с ПЭО-слоями, при окраске гематоксилином и эозином была выявлена грубоволокнистая костная ткань с полостями, заполненными костным мозгом (рис. 4).

Количественные параметры гистологического состава (кость, костный мозг) тканевых пластинок, показатель шероховатости (Ra), фазовый состав и отношение Ca/P покрытий приведены в табл. 2. Из анализа данных следует, что в режиме ПЭО на титане, в растворах электролитов, содержащих цитрат и ацетат натрия, были получены биологически активные кальциево-фосфатные покрытия. При этом данные рентгенофазового анализа, согласно которым в составе некоторых покрытий обнаружен только диоксид титана, не отрицают присутствия в них кальциево-фосфатных соединений в виде рентгеноаморфной фазы. Об этом можно судить по высоким значениям отношения Ca/P в образцах, содержащих только TiO_2 . В составе образца 5 (табл. 2) были обнаружены гидроксипатит кальция и фосфат кальция. Отношение Ca/P составило 1,92. Ключевым фактором оценки биоактивных свойств полученных покрытий является количество сформированной на их поверхности костной ткани.

В результате исследования влияния параметра шероховатости (Ra) на количественные показатели остеогенеза *in vivo* не было выявлено линейной зависимости между площадью кости (S кости, mm^2) и площадью костного мозга (S костного мозга, mm^2) от параметра шероховатости искусственных поверхностей. Однако были обнаружены точки экстремума биоактивности при шероховатости покрытий в диапазоне 2–3 μm .

Вместе с тем шероховатость является важным, но не единственным критерием интенсивного образования костной ткани. Важную роль играет как абсолютное содержание в покрытии фосфора и кальция, так и их соотношение [9]. Согласно данным, приведенным в табл. 2, максимальное костеобразование

наблюдалось для образцов № 4 и 5. При различии их фазового состава (TiO_2 , рентгеноаморфная фаза – для образца № 4 и гидроксипатита, $Ca_3(PO_4)_2$ – для образца № 5), отношение Ca/P здесь оказалось выше, чем для остальных образцов. Образец № 3 имеет достаточно высокое значение отношения Ca/P , но содержание Ca и P было меньше по сравнению с образцами № 4 и 5. К тому же параметр шероховатости для образца № 3 имел максимальное значение (9,13 μm) среди исследуемых поверхностей. С другой стороны, образцы № 1 и 2 имели оптимальную величину шероховатости, равную 2,15 и 2,86 μm (табл. 2). Однако концентрации Ca и P , а также отношение Ca/P для этих образцов оказалось существенно ниже, чем для образцов № 4 и 5. В силу этих причин, вероятнее всего, рост костной ткани на этих поверхностных слоях (образцы № 1, 2 и 3) был незначительным. Таким образом, значение шероховатости поверхности является важным, но не достаточным условием костеобразования [9].

Это согласуется с данными ранее проведенных *in vitro* исследований, выявивших оптимум шероховатости ($Ra=2-3$ μm) искусственных поверхностей для проявления наилучших остеогенных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. Можно предположить, что оптимумы значений Ra для остеогенной дифференцировки этих клеток человека *in vitro* и мыши в тесте эктопического костеобразования во многом аналогичны.

Таким образом, показано, что метод ПЭО позволяет формировать на изделиях из титана ВТ1-0 кальциево-фосфатные и оксидные покрытия. Исследованы их фазовый и элементный составы, морфология поверхности и определено отношение Ca/P . Установлено, что по своим механическим характеристикам кальциево-фосфатные покрытия приближаются к механическим характеристикам костной ткани. Проведенные испытания покрытий в SBF-растворе продемонстрировали биологическую активность изучаемых поверхностных слоев. Показано, что эта активность *in vivo* определяется суперпозицией специфических параметров: химическим составом, в частности, значениями концентраций кальция и фосфора, а также их соотношением и морфологическими особенностями (шероховатостью) кальциево-фосфатного покрытия на поверхности титановых имплантатов.

Заключение

На основании результатов комплексного исследования, проведенного взаимодополняющими, в том числе прямыми (*in vivo*) методами анализа, можно констатировать, что с использованием плазменного электролитического оксидирования разработаны способы формирования биологически инертных и биологически активных поверхностных слоев, существенно расширяющих практические возможности имплантационных материалов.

References

- Gnedenkov S.V., Hrisanfova O.A., Sinebrjuhov S.L. et al. A process for preparing the biocompatible fluoropolymer coatings on the base of products from nitinol. Patent No.. 2316357. Russian Federation, 10.02.2008.
- Gnedenkov S.V., Sinebrjuhov S.L., Mashtaljar D.V. et al. The compositional polymer protective coatings on titanium, *Korroziya: materialy, zavita*. 2007. No. 7. P. 37–42.
- Gnedenkov S.V., Sinebrjuhov S.L., Mashtaljar D.V. et al. The formation of compositional polymer layers on metals and alloys, *Vestnik Dalnevostochnogo otdelenija RAN*. 2009. No. 2. P. 98–106.
- Gnedenkov S.V., Hrisanfova O.A., Ignat'eva L.N., et al. Complexation of aluminum with salts of tartaric acid, *Zhurnal neorganicheskoj himii*. 2005. Vol. 50, No. 12. P. 2050–2058.
- Gnedenkov S.V., Hrisanfova O.A., Sinebrjuhov S.L. et al. The compositional protective coatings on the surface of NiTi, *Korroziya: materialy, zavita*. 2007. No. 2. P. 20–25.
- Gnedenkov S.V., Hrisanfova O.A., Sinebrjuhov S.L. et al. Method of application for calcium-phosphate coatings on implants made from titanium and its alloys. Patent No.. 2348744. Russian Federation, 10.03.2009.
- Gnedenkov S.V., Hrisanfova O.A., Sinebrjuhov S.L. et al. The formation of the containing hydroxyapatite surface layers on titanium, *Korroziya: materialy, zavita*. 2008. No. 8. P. 24–30.
- Gnedenkov S.V., Hrisanfova O.A., Sinebrjuhov S.L., Puz A.V. A method of producing protective coatings on the products from nitinol. Patent No.. 2319797. Russian Federation, 20.03.2008.
- Gnedenkov S.V., Sharkeev Ju.P., Sinebrjuhov S.L. et al. Bioactive calcium phosphate coatings on titanium, *Vestnik DVO RAN*. 2010. No. 5. P. 47–57.
- Gordienko P.S., Gnedenkov S.V. Microarc oxidation of titanium and its alloys. Vladivostok: Dalnauka, 1997. 198 p.
- Legostaeva E.V., Sharkeev Ju.P., Tolkacheva T.V. et al. Bioactive coating on a titanium implant and method thereof. Patent No.. 2385740. Rossijskaja Federacija, 10.04.2010.
- Putljaev V.I. Modern Bio-ceramic materials, *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*. 2004. Vol. 8, No. 1. P. 44–50.
- Hrisanfova O.A., Volkova L.M., Gnedenkov S.V., et al. Film synthesis of chemical compounds on titanium in microplasma discharges, *Zhurnal neorganicheskoj himii*. 1995. Vol. 40, No. 4. P. 558–562.
- Gnedenkov S. V., Sinebryukhov S. L., and Sergienko V. I. Electrochemical impedance simulation of a metal oxide heterostructure/electrolyte interface, *A Review Russian Journal of Electrochemistry*. 2006. Vol. 42, No. 3. P. 197–211.
- Gnedenkov S.V., Khrisanfova O.A., Zavidnaya A.G., et al. Production of hard and heat-resistant coatings on aluminium using a plasma micro-discharge, *Surface and Coatings Technology*. 2000. Vol. 123. P. 24–28.
- Gnedenkov S.V., Sinebryukhov S.L. Composite polymer containing coatings on the surface of metals and alloy, *Composite Interfaces*. 2009. Vol. 16, No. 4–6. P. 387–405.
- Gnedenkov S.V., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Scorobogatova T.M. Electrochemical and morphological features of the anticorrosion films obtained on the titanium surface, *Surface Engineering*. 2005. Vol. 2, No. 2A. P. 107–114.
- Gnedenkov S.V., Sinebryukhov S.L., Mashtaljar D.V. et al. Composite polymer-containing protective layers on titanium, *Protection of Metals*. 2008. Vol. 44, No. 7. P. 67–72.
- Han Y., Hong S.H., Xu K.W. Structure and in vitro bioactivity of titania-based films by micro-arc oxidation, *Surface and Coatings Technology*. 2003. Vol. 168. P. 249–258.
- Hanawa T., Kon M., Doi H. et al. Amount of hydroxyl radical in calcium-ion implanted titanium and point of zero charge of constituent oxide of the surface modified layers, *J. Material Sci.: Mater. Med.* 1998. Vol. 9. P. 89–92.
- Huang P., Xu K.-W., Han Y. Preparation and apatite layer formation of plasma electrolyte oxidation film on titanium for biomedical application, *Materials Letters*. 2005. Vol. 59. P. 185–189.
- Kim M., Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials*. 2003. Vol. 24. P. 2161–2175.
- Kokubo T., Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006. Vol. 27. P. 2907–2915.
- Li X., Zhang X., Li Z. et al. Synthesis and characteristics of NiO nanoparticles by thermal decomposition of nickel dimethylglyoximate rods, *Solid State Communications*. 2006. Vol. 137, No. 11. P. 581–584.
- Rondelli G. Corrosion resistance tests of NiTi shape memory alloy, *Biomaterials*. 1996. Vol. 17. P. 2003–2008.
- Ryu H.S., Song W.-H., Hong S.-H. Biomimetic apatite induction of P-containing titania formed by microarc oxidation before and after hydrothermal treatment, *Surface and Coatings Technology*. 2008. Vol. 202. P. 1853–1858.
- Sinebryukhov S.L., Gnedenkov A.S., Khrisanfova O.A. et al. The influence of plasma electrolytic oxidation on the mechanical characteristics of the NiTi alloys, *Surface Engineering*. 2009. Vol. 25, No. 8. P. 565–569.
- Suchanek W., Yashma M., Kakihana M., et al. Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives, *Biomaterials*. 1997. Vol. 18. P. 925–933.
- Wei D., Zhou Y., Jia D. et al. Biomimetic apatite deposited on microarc anatase-based ceramic coatings, *Ceramic International*. 2008. Vol. 34. P. 1139–1144.
- Wei D., Zhou Y., Jia D. et al. Characteristics and in vitro bioactivity of a microarc-oxidized TiO₂-based coating after chemical treatment, *Acta Biomaterialia*. 2007. Vol. 3. P. 817–827.

Поступила в редакцию 20.04.2011.

FUNCTIONAL COATINGS FOR IMPLANTS

S.V. Gnezdenkov¹, Yu.P. Sharkeev², S.L. Sinebryukhov¹, O.A. Khrisanforova¹, E.V. Legostaeva², A.G. Zavidnaya¹, A.V. Puz¹, I.A. Khlusov^{3, 4}

¹Institute of Chemistry (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation), ²Institute of Strength Physics and Materials Science of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (2/4 Akademicheskij Av. Tomsk 634021 Russian Federation), ³Federal State Institution "Russian Ilizarov Scientific Centre 'Restorative Traumatology And Orthopaedics' of Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation (6 Ulyanova St. Kurgan 640014 Russian Federation), ⁴REC 'Bio-compatible Materials and Biomedical Engineering' of Tomsk Polytechnic University and Siberian State Medical University (2 Moskovskij Tr. Tomsk 634050 Russian Federation)

Summary – The paper reviews results of the scientific researches on the surface modification of titanium alloys used in implant surgery, considering a specific example of corrosion-resistant bioinert composite coatings made of titanium nickelide and hydroxyapatite-containing bioactive calcium-phosphate layers, and titanium-BT1-0. The authors have modified the titanium alloy surfaces by plasma electrolytic oxidation method. The production conditions determine the planned functions of coatings. As reported, the task-specific selection of electrolytes used to produce coatings allows to obtain calcium-phosphate layers on the surface of technical grade titanium BT1-0. Their biological activity is confirmed by *in vivo* and *in vitro* experiments. The authors offer promising prospects for applying plasma electrolytic oxidation method in an effort to produce on the titanium nickelide the bioinert composite coatings known to improve its morphological structure and electrochemical properties, thus considerably decreasing ingress of nickel ions into organism.

Key words: implants, coatings, hydroxyapatite, bioactivity/bioinertness.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 12–19.

УДК [616-008.87-053.3-02:616-056.716]-039.71

ВОССТАНОВЛЕНИЕ МИКРОБНОГО БАЛАНСА МАТЕРИ КАК ОПТИМАЛЬНЫЙ ПУТЬ ПРОФИЛАКТИКИ ВРОЖДЕННОГО ДИСБИОЗА У ДЕТЕЙ

В.Г. Мельников¹, В.М. Абрамов², В.С. Хлебников², И.О. Чикилева², Р.Н. Василенко², И.В. Косарев², В.К. Сакулин², Г.Р. Овинова³, И.Н. Захарова⁴, М.В. Киселевский⁵, Т.С. Запорожец⁶, Т.А. Кузнецова⁶

¹Международный научно-технический центр (127473 г. Москва, ул. Краснопролетарская, 32–34, а/я 20),

²Институт инженерной иммунологии (142380 Московская обл., Чеховский р-н, пос. Любучаны), ³Перинатальный медицинский центр (117209 г. Москва, Севастопольский пр-т, 24, корп. 1), ⁴Российская медицинская академия последилового образования (123995 г. Москва, ул. Баррикадная, 2/1), ⁵Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН (115478 г. Москва, Каширское шоссе, 24), ⁶НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

Ключевые слова: антибиотики, дисбактериоз, пробиотики, экосистема «мать–новорожденный».

Обзор литературы, посвященный дисбактериозу, возникающему в результате антибиотикотерапии у матери, и его влиянию на плод. Первый контакт новорожденного с микрофлорой окружающей среды происходит интранатально при прохождении родовых путей. Количественные и качественные особенности генитального микробиоценоза роженицы выступают в качестве одного из ключевых факторов, воздействующих на процесс формирования микробиологического здоровья ребенка. Сформировавшийся врожденный дисбиоз очень трудно поддается коррекции и способствует увеличению контингента детей, а затем и взрослых, страдающих хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями. Поэтому важнейшее значение имеет перинатальная профилактика дисбиоза новорожденных с помощью новых синбиотических препаратов, эффективно восстанавливающих микробиоценоз матери.

В последние десятилетия отмечается возрастание тяжести оппортунистических инфекций и усиление агрессивных свойств условно-патогенных микроорганизмов. Это является следствием традиционной стратегии классической медицины, делающей ставку на использование антибиотиков, химио-, гормональной и иммунодепрессивной терапии без учета их отдаленных отрицательных последствий.

Во многих странах мира, включая Россию, выявляют возбудителей нозокомиальных инфекций с множественной лекарственной резистентностью, имеющей различную генетическую природу. Широкое распространение феномена лекарственной устойчивости отмечается также и среди микроорганизмов (особенно кишечной группы), выделяемых от сельскохозяйственных животных и птицы. Сегодня резистентные к антибиотикам условно-патогенные бактерии стали постоянной составной частью микробиоценозов человека и животных [6].

Женщины оказались более чувствительными к отрицательному воздействию антибиотиков, чем мужчины. Применение антибиотиков приводит к развитию у них не только дисбиоза желудочно-кишечного тракта, но и к нарушению микробиологии влагалища, что свидетельствует о серьезном повреждении микробиоценоза всего организма [4]. Этиологическими агентами

бактериального вагиноза и кандидозного вагинита, наряду с *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans*, являются ассоциации антибиотикорезистентных анаэробных микроорганизмов, таких как *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, концентрация которых у больных возрастает до 10^9 – 10^{11} КОЕ/мл. При этом количество лактобацилл резко снижается [1, 5].

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости восстановления дружественных взаимоотношений с индигенными микроорганизмами, о положительных свойствах которых уже накоплено значительное количество убедительных данных [23]. Антибиотики и пробиотики – это две стороны одной медали. Антибиотики, при их адекватном использовании, и в дальнейшем будут занимать важное место в арсенале медикаментозных средств. Основной задачей пробиотикотерапии является не уничтожение вредной флоры, а восстановление оптимальных, физиологичных для хозяина межпопуляционных соотношений микроорганизмов, то есть возвращение макроорганизму функционально полноценного здорового микробиоценоза. Рациональное сочетание антибиотико- и пробиотикотерапии поможет решить многие современные проблемы, связанные с частыми рецидивами болезни и побочными эффектами медикаментозного воздействия.

Эволюция аутофлоры человека отчетливо прослеживается в процессе онто- и филогенеза. От степени физиологичности ее формирования в значительной мере зависит здоровье ребенка как в период новорожденности, так и в дальнейшей жизни. В экосистеме «мать–новорожденный» первым и основным донором индигенных микроорганизмов, необходимых ребенку для формирования собственного микробиоценоза, является мать [7, 15]. Поэтому состоянию нормальной микрофлоры отводится первостепенное значение в сохранении колонизационной резистентности влагалищного биотопа и предотвращении развития заболеваний как у матери, так и у новорожденного. Здоровая вагинальная экосистема женщины репродуктивного возраста характеризуется интактным эпителием и микрофлорой со значительным преобладанием лактобацилл: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus*

acidophilus и *Lactobacillus casei* [15]. Снижение их уровня сопровождается развитием урогенитальной патологии [1, 4]. В предродовом периоде во влагалище и кишечнике увеличивается содержание лактобацилл и бифидобактерий *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* и *Bifidobacterium longum* [8].

В норме первый контакт новорожденного с микроорганизмами происходит при прохождении родовых путей матери. Количественные и качественные особенности генитального микробиоценоза роженицы являются одним из ключевых факторов, влияющих на процесс формирования микроэкологического здоровья ребенка. Поэтому при подготовке женщины к родам необходимо способствовать благоприятному переходу плода из стерильных внутриутробных условий в новую среду, заселенную разнообразными микроорганизмами, среди которых нередко встречаются болезнетворные. Естественное вскармливание также играет важную роль в обеспечении колонизационной резистентности организма ребенка. Содержащиеся в женском молоке бифидогенные факторы способствуют заселению биотопов младенца материнской защитной лактофлорой [7]. У здорового новорожденного, находящегося на естественном вскармливании, материнская молочнокислая флора размножается более активно, чем факультативные и транзиторные микроорганизмы. Главным бифидогенным компонентом женского грудного молока являются олигосахариды. Они состоят из остатков глюкозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина, фукозы и сиаловой кислоты. Помимо пребиотической активности данные соединения обладают способностью блокировать прикрепление патогенных микроорганизмов к рецепторам эпителия кишечника [11, 22].

Результатом симбиотического взаимодействия клеток эпителия с микрофлорой является формирование сложной специфической приэпителиальной структуры – биопленки. Она представляет собой защитный барьер, состоящий из слоя слизи, молекул секреторного иммуноглобулина А, бактериальных микроколоний и их метаболитов. В процессе формирования биопленки фаза транзиторного дисбиоза у здорового ребенка постепенно трансформируется в нормобиоценоз с доминированием индигенной микрофлоры. В современных условиях процесс становления нормобиоценозов у детей стал более продолжительным. Даже у практически здоровых детей к 6–7-му дню жизни в большинстве случаев концентрация нормальной микрофлоры, особенно в кишечном биотопе, оказывается значительно ниже нормы. Это способствует пролиферации условно-патогенных бактерий и включению их в состав биопленки. Бактерии-оппортунисты, закрепившиеся в биопленке за счет лиганд-рецепторных взаимодействий с клетками, чрезвычайно трудно удалить из приэпителиальной зоны. Сформировавшиеся врожденные дисбиозы очень трудно поддаются коррекции и часто приобретают хроническую форму. На протяжении всей жизни, начиная с младенческих лет, они являются причиной инфекционно-воспалительных процессов,

ведущих к возникновению «болезней цивилизации», таких как сердечно-сосудистые, аллергические заболевания, рак, диабет [2, 8, 13, 14]. В свете этих данных перинатальная профилактика заселения биотопов новорожденного потенциальными патогенами приобретает особенно важное значение.

Апатогенные бесспорные сахаролитические облигатно-анаэробные молочнокислые бактерии рода *Bifidobacterium* выполняют важную роль в поддержании колонизационной резистентности организма, улучшении процессов гидролиза и всасывания углеводов, протеинов и липидов, синтезе витаминов, нормализации минерального обмена, метаболизме желчных кислот, холестерина, стероидных гормонов, регенерации слизистой оболочки кишечника, стимуляции иммунной системы. У здоровых детей грудного возраста чаще выделяются виды: *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*. У детей более старшего возраста и взрослых достаточно часто также встречаются *B. adolescentis* и другие [9, 10, 17, 21].

Бактерии рода *Lactobacillus* также являются важными представителями нормальной аутофлоры организма человека любого возраста, в том числе и детского. Их общий популяционный уровень в микроэкосистеме человека не уступает бифидобактериям. Лактобациллы широко представлены в микробных популяциях, населяющих все отделы пищеварительного тракта – от ротовой полости до прямой кишки. У здоровых женщин репродуктивного возраста лактобациллы доминируют в вагинальном биотопе. Поэтому новорожденный ребенок изначально в большей концентрации приобретает лактобациллы и в меньшей – бифидобактерии. Лактобациллярная флора первой вступает в защиту открытых биологических систем ребенка от колонизации их патогенными микроорганизмами и подготавливает условия для заселения бифидобактерий.

На российском рынке недавно появился принципиально новый препарат – «Лактогин». Это первый в мире пероральный пробиотик, предназначенный для нормализации вагинальной микрофлоры. Лактогин содержит в своем составе штаммы *L. ramosus* GR-1 и *L. reuteri* RC-14, выделенные из урогенитального тракта здоровых женщин и обладающие высокой адгезивной активностью к вагинальным эпителиоцитам [18]. Данные штаммы сохраняют жизнеспособность в желудке, кишечнике, колонизируют влагалище и подавляют рост различных патогенных микроорганизмов [19, 20]. Они способны размножаться в молоке, а йогурт, приготовленный на их основе, может быть использован в качестве продукта функционального питания для профилактики и лечения дисбиозов кишечника и влагалища [12].

Важно отметить, что другие пробиотические препараты (ацилакт, лактобактерин и т. д.), как при пероральном, так и при местном использовании, не всегда приводят к желаемому клиническому и терапевтическому эффекту, по-видимому, вследствие того, что обладают низкими адгезивными свойствами по отношению к эпителиоцитам влагалища [5].

Таким образом, для сохранения здоровья матери, профилактики врожденного дисбиоза и формирования нормальной микрофлоры у новорожденных целесообразно создавать новые пробиотические препараты, приближающиеся по составу и свойствам к компонентам молочнокислой генитальной микрофлоры женщин репродуктивного возраста. Такие пробиотики могут применяться внутрь в качестве фармакопейных средств или продуктов функционального питания. Для повышения их эффективности следует, по нашему мнению, использовать не лабораторные культуры лактобацилл и бифидобактерий, а популяции, выращенные в виде биопленки, то есть в состоянии, близком к таковому в естественной среде обитания данных микроорганизмов. В качестве пребиотиков могут служить фукоиданы, полисахариды из бурых водорослей, которые по своей химической структуре и свойствам имеют сходство с олигосахаридами женского молока. Фукоиданы относятся к так называемым поливалентным биомодуляторам и обладают противоопухолевой, иммуномодулирующей, антивирусной, противовоспалительной, противосвертывающей активностью, а также способностью стимулировать рост молочнокислых бактерий [3, 16].

References

- Ankirskaia A.S. Nonspecific vaginitis, *Ginekologija*. 2005. No. 4. P. 15–18.
- Gracheva N.M. Dysbacterioses and superinfection: causes, diagnosis, treatment, *Lechawij vrach*. 1998. No. 1. P. 18–21.
- Kuznecova T.A., Zaporozhec T.S., Besednova N.N. et al. Immunostimulatory and anticoagulant activity of fucoïdan from the brown alga *Fucus evanescens*, *Antibiotiki i himioterapija*. 2003. V. 48, no. 4. P. 11–13.
- Emergencies in obstetrics and gynecology: diagnosis and treatment / eds. M. Pirlman, Dzh. Tintinali, P. Din. M.: BINOM, 2009. 499 p.
- Prilepskaja V.N., Bajramova G.R. Violation vaginal microbiota, the ways of its correction, *Ginekologija*. 2007. Vol. 9, No. 4. P. 34–36.
- Strachunskij L.S. β -laktomazy of spread spectrum – a rapidly growing and poorly perceived threat, *Klin. mikrobiol. antimikrob. himioter*. 2005. no. 1. P. 2–6.
- Shabalov N.P. Neonatology. Vol. 2. SPb.: MEDpress, 1997. 640 p.
- Shenderov B.A. Medical microbial ecology and functional food. Vol. 1: Mikroflora cheloveka i zhivotnyh i ee funkcii. M: Grant, 1998. 288 p.
- Jankovskij D.S. The Composition and functions of the microbiocenoses for various human biotopes, *Zdorove zhenwiny*. 2003. Vol. 16, No. 4. P. 145–158.
- Favier C., De Vos W. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborns babies, *Anaerobe*. 2003. Vol. 9. P. 219–229.
- German J.B., Freeman S.F., Lebrilla C., Mills D.A. Human milk oligosaccharides: Evolution, structures, bioselectivity as substrates for intestinal bacteria, *Personalized Nutrition for the Diverse Needs of Infants and Children* / D.M. Bier, J.B. German, B. Lonnerdahl, eds. Basil: Karger AG, 2008. P. 205–222.
- Hekmat S., Soltani H., Reid G. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus ramosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2009. Vol. 10. P. 293–296.
- Ishikava H., Akedo T., Otani T. et al. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors, *Int. J. Cancer*. 2005. Vol. 116. P. 762–767.
- Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H. et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomized placebo-controlled trial, *Lancet*. 2001. Vol. 357. P. 1076–1079.
- Kim T.K., Thomas S.M., Ho M. et al. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals, *J. Clin. Microbiol*. 2009. Vol. 47. P. 1181–1189.
- Kusaykin M., Bakunina I., Sova V. et al. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoïdians from the brown seaweeds, *Biotechnol. J*. 2008. Vol. 3. P. 904–915.
- Pereira D., Gibson G. Cholesterol Assimilation by Lactic acid and Bifidobacteria isolated from the human gut, *Appl. Environ. Microbiol*. 2002. Vol. 68. P. 4689–4693.
- Reid G., Bruce A.W., Taylor M. Instillation of *Lactobacillus* and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections, *Microecol. Ther*. 1995. Vol. 23. P. 32–45.
- Reid G., Bruce A., Fraser N. et al. Oral probiotics can recolve urogenital infections, *FEMS Microbiol Immunol*. 2001. Vol. 30. P. 49–52.
- Reid G., Dols J., Miller W. Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections, *Curr. Opin. in Clin. Nutr. and Metabolic Care*. 2009. Vol. 12. P. 583–587.
- Schell M.A., Karmirantzou M., Snel B. et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2002. Vol. 99. P. 14412–14427.
- Sela D.A., Mills D.A. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides, *Trends Microbiol*. 2010. Vol. 18. P. 298–307.
- Tutnbaugh P., Ley R., Hamady M. et al. The human microbiome project, *Nature*. 2007. Vol. 449. P. 804–810.

Работа выполнена в рамках проектов МНТЦ № 3949 «Изучение пробиотических свойств штаммов лактобацилл и бифидобактерий» и № 4000 «Клинико-иммунологическая эффективность нового синбиотического продукта категории функционального питания».

Поступила в редакцию 03.05.2011.

RESTORATION OF MOTHER'S MICROBIAL BALANCE AS OPTIMAL WAY OF PREVENTING INNATE DYSBIOSES

V.G. Melnikov¹, V.M. Abramov², V.S. Khlebnikov², I.O. Chikileva², R.N. Vasilenko², I.V. Kosarev², V.K. Sakulin², G.R. Ovinova³, I.N. Zakharova⁴, M.V. Kiselevsky⁵, T.S. Zaporozhets⁶, T.A. Kuznetsova⁶

¹International Science and Technology Center (32–34 Krasnoproletarskaya St. Moscow 127473 Russian Federation), ²Institute of Engineering Immunology (Lyubuchani Settl. Chekhovskiy District, Moscow Oblast 142380 Russian Federation), ³Perinatal Medical Center (Bld. 1, 24 Sevastopolsky Av. Moscow 117209 Russia), ⁴Russian Medical Academy of Postgraduate Education (2/1 Barrikadnaya St. Moscow 123995 Russian Federation), ⁵N.I. Blokhin Russian Oncological Research Center (24 Kashirskoye Sh. Moscow 115478 Russian Federation), ⁶Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation)

Summary – The paper reviews literature devoted to dysbacteriosis likely to occur as a result of mother's antibiotic treatment and its effects on foetus. First a newborn comes in contact with ambient microbial flora intranatally, when the foetus passes through the maternal passages. The quantitative and qualitative features of the genital microbiocenosis in a woman in labour are considered to be ones of the crucial factors known to have effects on the formation of baby's microecological health. The in-nate dysbiosis is not easy to deal with, and results in an increase of children, and then adults, who suffer from chronic infectious inflammatory diseases. Therefore, it is of high importance to perinatally prevent newborn children's dysbiosis using new symbiotic drugs that prove to efficiently restore mother's microbiocenosis.

Key words: antibiotics, dysbacteriosis, probiotics, 'mother–newborn' ecosystem.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 20–22.

УДК 616-074:577.115.3

ОМЕГА-3 ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ: ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РОЛЬ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОРГАНИЗМА ПАЦИЕНТОВ

В.Е. Васьковский^{1, 2}, Т.А. Горбач³, А.В. Есинов², В.И. Светашев¹, М.А. Яцкова³

¹Институт биологии моря ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17), ²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159), ³Медицинское объединение ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95)

Ключевые слова: жирные кислоты, кровь, экспресс-метод, диагностика.

Для диагностики состояния пациентов по уровню высших омега-3 жирных кислот в их организме и контроля за действием препаратов этих кислот при приеме разработан экспресс-метод определения состава жирных кислот цельной крови. С помощью этого метода проанализировали кровь около 180 пациентов. Полученные данные варьировали в широких пределах. Начата работа по выявлению факторов, влияющих на состав жирных кислот крови. На добровольцах показано, что льняное масло не может рассматриваться как активный препарат омега-3 жирных кислот. Сделан вывод, что препараты этих кислот должны использоваться в рамках персонализированной медицины.

В первой публикации, посвященной исследованиям омега-3 жирных кислот в интересах медицины, мы на основе краткого обзора литературы показали, что эта проблема вызывает все больший интерес в мире, но особенно актуальна для России, которая по объему исследований в этой области существенно отстает от многих стран мира [1]. Так как в начальный период планировалось применение препаратов омега-3 жирных кислот для профилактики и лечения нейродегенеративных и некоторых других заболеваний, был проведен анализ 15 препаратов этих кислот, представленных на рынке России: исследовалось содержание липидных компонентов и главных жирных кислот. На основе полученных данных для дальнейшего использования был выбран препарат «Атероблок» [1]. Однако углубленная работа с информацией по проблеме заставила нас изменить план исследований. В литературе появляется все больше сведений о том, что пониженный уровень омега-3 жирных кислот в тканях человека, в первую очередь в крови, является фактором риска сердечно-сосудистых, неврологических, онкологических и ряда других заболеваний [1–3, 9, 10, 15]. Поэтому мы решили провести анализ жирных кислот крови пациентов, чтобы выявить среди них группу с факторами риска и, возможно, найти отличия в спектрах жирных кислот при различной патологии.

Уровень жирных кислот определяют как в цельной крови, так и в ее отдельных фракциях: сыворотке, плазме и эритроцитах [2, 3, 9, 10, 15]. Так как нам требовался экспрессный метод анализа, в качестве субстрата была выбрана цельная кровь. Уже после начала исследований появилась работа итальянских

авторов [11], которая подтвердила правильность выбора цельной крови, а также возможность анализа состава жирных кислот крови для диагностики некоторых заболеваний.

Настоящая статья посвящена модификации экспресс-метода определения содержания жирных кислот в цельной крови, а также результатам анализа проб крови с помощью разработанного подхода. Также начато выявление факторов, влияющих на состав жирных кислот крови пациентов, и приведены результаты нескольких опытов на добровольцах по выяснению индивидуальной реакции на прием растительных масел и препарата «Атероблок».

Материал и методы. Венозную кровь отбирали в пластиковые герметичные пробирки объемом 2 мл, содержащие в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусную кислоту (Greiner Bio-One Vacuette, Austria). Обработку крови проводили в течение 1–2 часов после отбора. Аликвоту крови (100 мкл) помещали в стеклянную пробирку с герметичной крышкой, покрытой тефлоном, добавляли 600 мкл 10 % раствора ацетилхлорида в метаноле, полученную смесь тщательно перемешивали до получения тонкой суспензии. Пробирку наполняли аргоном и помещали в термостат на 60 мин при температуре 90 °С. Затем к остывшей смеси добавляли 600 мкл дистиллированной воды. Полученные метиловые эфиры жирных кислот дважды экстрагировали 400 мкл гексана. Для более быстрого разрушения эмульсии, возникавшей во время экстракции, использовали центрифугу Micro-Centrifuge, type 320 (Poland) – 2000 об./мин, 1 мин. После этого гексановый экстракт переносили в отдельную стеклянную пробирку, растворитель удаляли в токе аргона, а метиловые эфиры растворяли в 100 мкл гексана.

Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили на газожидкостном хроматографе Shimadzu GC-2010 с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Supelcowax-10 (длина – 30 м, внутренний диаметр – 0,25 мм, температура колонки – 205 °С, температура испарителя – 250 °С). Жирные кислоты идентифицировали с помощью стандартов и по значениям эквивалентной длины цепи [13]. Для более строгой идентификации метиловых эфиров жирных кислот в ряде проб использовали газожидкостную хроматографию с масс-спектрометрией на

Васьковский Виктор Евгеньевич – д-р биол. наук, гл.н.с. лаборатории сравнительной биохимии ИБМ ДВО РАН и гл.н.с. лаборатории химии углеводов и липидов ТИБОХ ДВО РАН; e-mail: vev35@mail.ru

Таблица 1

Содержание главных жирных кислот в крови обследованных

| Липидная формула | Содержание в крови, % | | |
|--------------------|-----------------------|-------|-------|
| | среднее | мин. | макс. |
| 20:5n-3 | 1,84 | 0,30 | 6,26 |
| 22:6n-3 | 3,69 | 1,45 | 6,95 |
| 20:4n-6 | 8,57 | 4,15 | 13,82 |
| 16:0 | 21,31 | 16,86 | 28,69 |
| 16:1n-7 | 2,45 | 0,55 | 8,09 |
| 18:0 | 7,34 | 4,99 | 11,19 |
| 18:1n-9 | 14,24 | 9,05 | 21,60 |
| 18:1n-7 | 2,07 | 0,57 | 6,56 |
| 18:2n-6 | 26,44 | 16,63 | 38,41 |
| 18:3n-3 | 1,61 | 0,03 | 2,50 |
| 20:3n-6 | 1,07 | 0,16 | 1,92 |
| 22:4n-6 | 0,65 | 0,18 | 2,08 |
| 22:5n-3 | 1,02 | 0,43 | 1,88 |
| <i>Соотношение</i> | | | |
| 20:4n-6/20:5n-3 | 7,41 | 1,39 | 34,42 |
| n-6/n-3 | 5,81 | 2,22 | 11,34 |

приборе Shimadzu GCMS-QP5050A с колонкой MDN-5S (температурная программа – 160 °С, затем 2 °С/мин до 250 °С).

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. За основу экспресс-метода получения метиловых эфиров жирных кислот был взят предложенный недавно способ их получения из капли крови [4]. Разработанный нами метод включает в себя прямое метилирование жирных кислот в пробе цельной крови, экстракцию полученных метиловых эфиров, анализ их смеси методом газожидкостной хроматографии. Отличия нашего метода заключаются в использовании 10 % раствора ацетилхлорида вместо 5 %, добавлении воды к смеси после переэтерификации для лучшего разделения фаз, а также использовании микроцентрифуги для быстрого разрушения эмульсии. Для более строгой идентификации жирных кислот в ряде случаев мы использовали газожидкостную хроматографию с масс-спектрометрией полученных эфиров.

В упомянутой выше работе итальянских авторов [11] проанализирован состав жирных кислот цельной крови более тысячи пациентов, как здоровых, так и страдавших различными заболеваниями. Представители контрольной группы не употребляли в пищу источники высших омега-3 жирных кислот. Для оценки состояния обследуемых авторы ввели два показателя: соотношение количеств арахидоновой (20:4n-6) и эйкозапентаеновой (20:5n-3) кислот и суммарное соотношение жирных кислот двух серий – омега-6 и омега-3. Было установлено, что эти показатели менялись в зависимости от возраста пациентов, а также при различных заболеваниях.

Таблица 2

Изменения содержания некоторых ЖК в крови после однократного приема соевого* и льняного** масел

| День анализа | Содержание главных жирных кислот, % | | | | | | |
|--------------|-------------------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|
| | 20:5n-3 | 22:6n-3 | 20:4n-6 | 16:0 | 18:1n-9 | 18:2n-6 | 18:3n-3 |
| 1-й* | 5,05 | 5,50 | 5,50 | 20,20 | 14,80 | 28,00 | 0,80 |
| 4-й | 3,00 | 4,50 | 5,00 | 19,70 | 14,30 | 35,95 | 0,50 |
| 5-й | 2,70 | 5,00 | 4,90 | 21,70 | 16,20 | 30,90 | 0,60 |
| 6-й** | 2,20 | 4,10 | 4,50 | 25,00 | 14,90 | 25,30 | 1,20 |
| 7-й | 1,95 | 3,85 | 3,30 | 24,65 | 16,80 | 24,90 | 0,90 |
| 11-й | 2,35 | 4,20 | 5,00 | 21,70 | 13,95 | 26,60 | 4,30 |

Нами для анализа жирных кислот крови было отобрано более 180 пациентов, сопоставимых по полу и возрасту, с нейродегенеративными (основная группа), сердечно-сосудистыми (контрольная группа) заболеваниями и патологией опорно-двигательного аппарата (группа сравнения), а также практически здоровые лица (табл. 1).

Первый вывод, который можно сделать по результатам наших исследований, – приморская популяция пациентов отличается по количественному составу жирных кислот крови от итальянской. Для оценки полученного массива информации требуется многофакторный анализ, установление корреляции состояния здоровья обследованных с образом жизни, включая питание. Для выполнения этой задачи одним из участников настоящего исследования (А.В. Есипов) разработана специальная компьютерная программа, с помощью которой полученную информацию начали обрабатывать.

Используя контроль над уровнем жирных кислот крови, мы провели на добровольцах несколько исследований, которые дали интересные и важные для дальнейшей работы результаты.

Хотя еще в 80-е годы XX века было показано, что α -линоленовая кислота не может заменить для человека эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты, в последнее время все чаще в качестве препарата омега-3 жирных кислот рекомендуют льняное масло, состоящее примерно на 50 % из α -линоленовой кислоты. Мы проверили влияние на состав жирных кислот приема 50 мл соевого масла, богатого линолевой кислотой и содержащего более 5% α -линоленовой кислоты, и последующего приема такой же дозы льняного масла.

Прием масла, богатого линолевой или α -линоленовой кислотой, снижал уровень высших полиеновых кислот, особенно серии омега-3, хотя через некоторое время их уровень несколько увеличивался по сравнению с минимальным (табл. 2). Полученные результаты подтвердили то, что уже известно в научной литературе: льняное масло не может считаться препаратом, увеличивающим уровень эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот в организме человека.

Важные для практики результаты получены при приеме двумя испытуемыми с исходно низким уровнем эйкозапентаеновой кислоты в крови препарата «Атероблок». У первого пациента содержание эйкозапентаеновой кислоты, составлявшее примерно 0,4 % от суммы жирных кислот, не изменилось после 1-й недели приема препарата (по одной капсуле в день), а к концу 2-й недели увеличилось до 0,75 %. У второго пациента уровень этой кислоты в крови (примерно 0,5 %) не изменился в течение 70 дней приема препарата по аналогичной схеме. Однако через месяц после увеличения дозы до 2 капсул в день уровень эйкозапентаеновой кислоты повысился до 0,9 %.

Мы обратили внимание на то, что авторы недавних обзоров литературы, посвященных медицинским исследованиям омега-3 жирных кислот, говорят о том, что следует продолжать работы, увеличив число пациентов и используя плацебо, так как далеко не всегда положительное действие препаратов, показанное эпидемиологически и в опытах на животных, подтверждается в клинике [6–8, 14]. Мы полагаем, что такой подход, обычный при изучении действия различных лекарств и биологически активных добавок к пище, для препаратов омега-3 жирных кислот не вполне оправдан. Большинство лекарств и добавок не присутствуют в организме человека до их приема. Что касается высших омега-3 жирных кислот, то они в организме человека и других млекопитающих играют важную роль в функционировании центральной нервной системы, зрительного анализатора, репродуктивной и ряда других систем.

У человека уровень эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот в тканях, включая кровь, определяется несколькими процессами помимо получения их с препаратами: это потребление в готовом виде как компонентов диеты, в которой присутствуют морские продукты, а также биосинтез из α -линоленовой кислоты, присутствующей в ряде растительных масел и других продуктах [12]. Способность к такому биосинтезу варьирует у людей в широких пределах [5]. Поэтому, по нашему мнению, правильное использование препаратов омега-3 жирных кислот относится к сфере персонализированной медицины, когда препараты назначают с учетом результатов биохимических и генетических исследований, на фоне тщательно контролируемой диеты.

Работа поддержана грантом ДВО РАН по программе «Фундаментальные и прикладные исследования в интересах медицины».

References

1. Vaskovskij V.E., Gorbach T.A., Esipov A.V. et al. Preparations of the omega-3 fatty acids and their use in medicine, *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 2. P. 16–20.
2. Albert C.M., Campos H., Stampfer M.J. et al. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death, *New Engl. J. Med.* 2002. Vol. 346, No. 15. P. 1113–1118.
3. Beydoun M.A., Kaufman J.S., Satia J.A. et al. Plasma n-3 fatty acids and the risk of cognitive decline in older adults: the atherosclerosis risk in communities study, *Am. J. Clin. Nutr.* 2007. Vol. 85, No. 4. P. 1103–1111.
4. Bicalho B., David F., Rumpel K. et al. Creating a fatty acid methyl ester database for lipid profiling in a single drop of human blood using high resolution capillary gas chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 2008. Vol. 1211, No. 1–2. P. 120–128.
5. Burdge G. α -Linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications, *Current Opinion Clinical Nutr. Metabol. Care*. 2004. Vol. 7, No. 2. P. 137–144.
6. Di Minno M.N.D., Tremoli E., Tufano A. et al. Exploring newer cardioprotective strategies: omega-3 fatty acids in perspective, *Thromb. Haemostasis*. 2010. Vol. 104, No. 4. P. 664–680.
7. Huang T.L. Omega-3 fatty acids, cognitive decline, and Alzheimer's disease: A critical review and evaluation of the literature, *J. Alzheimers Disease*. 2010. Vol. 21, No. 3. P. 673–690.
8. Kirby A., Woodward A., Jackson S. Benefits of omega-3 supplementation for schoolchildren: review of the current evidence, *Brit. Educat. Res. J.* 2010. Vol. 36, No. 5. P. 699–732.
9. Kuriki K., Hirose K., Wakai K. et al. Breast cancer risk and erythrocyte compositions of n-3 highly unsaturated fatty acids in Japanese, *Int. J. Cancer*. 2007. Vol. 121, No. 2. P. 377–385.
10. Nogi A., Yang J.J., Li L.M. et al. Plasma n-3 polyunsaturated fatty acid and cardiovascular disease risk factors in Japanese, Korean and Mongolian workers, *J. Occupat. Health*. 2007. Vol. 49, No. 3. P. 205–216.
11. Rizzo A.M., Montorfano G., Negroni M. et al. A rapid method for determining arachidonic: eicosapentaenoic acid ratios in whole blood lipids: correlation with erythrocyte membrane ratios and validation in a large Italian population of various ages and pathologies, *Lipids in Health and Disease*. 2010. Vol. 9. Art. No. 7.
12. Simopoulos A.P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk, *Exp. Biol. Med.* 2010. Vol. 235, No. 7. P. 785–795.
13. Stransky K., Jursik T., Vitek A. Standard equivalent chain length values of monoenic and polyenic (methylene-interrupted) fatty acids, *J. High Resol. Chromatogr.* 1997. Vol. 20, No. 3. P. 143–158.
14. Turner D., Shah P.S., Steinhart A.H. et al. Maintenance of remission in inflammatory bowel disease using omega-3 fatty acids (fish oil): A systematic review and meta-analyses, *Inflamm. Bowel Diseases*. 2011. Vol. 17, No. 1. P. 336–345.
15. Virtanen J.K., Mursu J., Voutilainen S., Tuomainen T.P. Serum long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of hospital diagnosis of atrial fibrillation in men, *Circulation*. 2009. Vol. 120, No. 23. P. 2315–2321.

Поступила в редакцию 12.01.2010.

OMEGA-3 FATTY ACIDS: DIAGNOSTIC VALUE AND ROLE OF INDIVIDUAL FEATURES IN PATIENTS' ORGANISMS

V.E. Vaskovsky^{1,2}, T.A. Gorbach³, A.V. Esipov², V.I. Svetashev¹, M.A. Yatskova¹

¹Institute of Marine Biology (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russia), ²Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia), ³Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russia) Summary – The authors have created an express method for detecting fatty acid composition in whole blood intended to diagnose the state of patients by the level of omega 3 fatty acids in their organisms and monitor the effects from these acids when taking drugs. This method allowed testing blood taken from about 180 patients. The findings have varied in a wide range. The authors began working to identify factors appeared to have effect on the fatty acid composition in blood. In case of volunteers, it is evident that the linseed oil cannot be considered as active omega 3 fatty acid drug. As reported, the acid-containing drugs should be used as part of the personalised medicine.

Key words: fatty acids, blood, express method, diagnostics.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 23–25.

УДК 616.12-005.4-085.272.4:615.322:582.273

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Е.В. Соколова¹, Т.Б. Иванова², С.П. Крыжановский², Л.Н. Богданович², А.О. Барабанова¹, И.М. Ермак¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100-лет Владивостоку, 159),

²Медицинское объединение ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95)

Ключевые слова: пищевые волокна, каррагинан, холестерин, воспаление.

У 32 пациентов 44–64 лет, страдавших ишемической болезнью сердца (стенокардия II–III функционального класса), исследовали влияние биологически активной добавки к пище «Каррагинан-ДВ» на показатели липидного обмена и маркеры хронического воспаления. Препарат давали в капсулах по 250 мг в течение 20 суток. После приема биологически активной добавки наблюдалось снижение содержания в плазме крови общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности, а также коэффициента атерогенности до уровня нормативных показателей. Отмечены и снижение концентрации С-реактивного белка, общего количества лейкоцитов и уровня фибриногена. Сделано заключение, что БАД «Каррагинан-ДВ» может использоваться в качестве дополнительного источника пищевых волокон в комплексной терапии пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Биологически активные добавки к пище (БАД) на основе пищевых волокон играют важную роль в здоровом питании, проявляя физиологический эффект, нормализуют баланс питательных веществ, способствуют профилактике заболеваний и ускоряют процесс выздоровления [6]. Недостаток пищевых волокон в диете человека способствует возникновению многих желудочно-кишечных, метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний [10]. В случае сердечно-сосудистых нарушений пищевые волокна способны понижать риск их развития посредством нормализации липидных показателей крови, улучшения чувствительности к инсулину и увеличения фибринолитической активности крови [3, 4].

К пищевым волокнам относятся полисахариды, которые являются компонентами растительной пищи и необходимы для нормального функционирования не только пищеварительного аппарата, но и всего организма в целом. Полисахариды пищевых волокон устойчивы к гидролитическому действию пищеварительных ферментов, связывают и выводят потенциально опасные вещества пищи. Кроме того, они ингибируют их всасывание, обволакивая стенку кишечника, и находятся в тесном контакте с ассоциированной лимфоидной тканью кишечника, которая составляет около 70 % общей иммунной системы человека [8].

Полисахариды морских водорослей представляют особый интерес в качестве дополнительного источника пищевых волокон, благодаря уникальности физико-химических свойств и структурному разнообразию, что обуславливает широкий спектр их физиологического действия. Полисахариды красных

водорослей – каррагинаны, используемые как загустители и стабилизаторы различных пищевых продуктов, относятся к растворимым пищевым волокнам и внесены в список пищевых и медицинских продуктов [5]. В США и ЕЭС каррагинаны признаны безопасными и разрешены для применения в качестве пищевой добавки. В связи с широким потреблением каррагинанов в последние годы проводятся интенсивные исследования их физиологического действия [7]. Так, было показано, что каррагинан, используемый в качестве компонента блюд филиппинской кухни, проявляет гипогликемический эффект у практически здоровых людей [12]. Анализ липидограмм волонтеров, также принимавших каррагинан в виде пищевого ингредиента, показал существенное снижение уровня холестерина и липидов в их крови [12]. Известно, что каррагинаны проявляют иммуномодулирующую, противовирусную, противоопухолевую и другую активность [15]. На уровне целостного организма нами впервые показано, что каррагинаны, выделенные из красных водорослей дальневосточных морей, повышают неспецифическую сопротивляемость организма экспериментальных животных в ответ на липополисахаридиндуцированную эндотоксемию [2]. Нами получены данные о корригирующем влиянии каррагинана на биохимические показатели гомеостаза, гемостаза и иммунной системы у больных с острыми кишечными инфекциями [1]. Анализ собственных и литературных данных позволяет надеяться на полифункциональный положительный эффект (многокомпонентное действие) каррагинана при включении его в комплексную терапию в качестве БАД.

На основании двух структурных типов каррагинанов, выделенных из дальневосточной красной водоросли *Chondrus armatus*, нами создана биологически активная добавка к пище «Каррагинан-ДВ», которая полностью соответствует требованиям, предъявляемым к пищевым добавкам и лекарственным средствам, используемым перорально, и предлагается в качестве дополнительного источника пищевых волокон.

Настоящее исследование посвящено влиянию БАД «Каррагинан-ДВ» на показатели липидного обмена и маркеры хронического воспаления пациентов с ишемической болезнью сердца (стенокардия напряжения II–III функционального класса, изолированная или в сочетании с артериальной гипертензией).

Материал и методы. Исследования проводились в Медицинском объединении ДВО РАН. Общее количество пациентов, принимавших БАД «Каррагинан-

ДВ», составило 32 человека (28 мужчин и 4 женщины) в возрасте от 44 до 64 лет. БАД давали в виде капсул по 250 мг в течение 20 суток. Все пациенты в течение многих лет находились на поддерживающей терапии (дезагреганты, липидоснижающие препараты). В исследовании также участвовали 10 практически здоровых доноров в возрасте от 46 до 60 лет. Протоколы исследования были утверждены этическим комитетом МО ДВО РАН.

БАД «Каррагинан-ДВ», разработанная в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН, зарегистрирована Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (свидетельство о государственной регистрации № 77.99.11.003.Т.000290.02.10 от 08.02.2010 г.).

Определение концентрации общего холестерина (ХС) было проведено с помощью наборов Fluitest 4241 фирмы «BIOCON» (Германия), триглицеридов и ХС липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) – наборами фирмы «Вектор-Бест» (Россия) на биохимическом анализаторе Analette, (Anti США). Концентрацию ХС липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) рассчитывают по формуле Фридляльда:

$$\text{ХС ЛПНП} = \text{общий ХС} - \text{ХС ЛПВП} + \text{триглицериды}/2,2.$$

Для оценки соотношения атерогенных и антиатерогенных липопротеидов рассчитывали коэффициент атерогенности (КА) на основании формулы:

$$\text{КА} = \text{общий ХС} - \text{ХС ЛПВП}/\text{ХС ЛПВП}.$$

Концентрацию аполипопротеина А и аполипопротеина В определяли с помощью тест-систем Apolipoprotein A1 FS с калибраторами TruCalApoA Apolipoprotein B FS и TruCalApoB соответственно («Диасис», Германия). Рассчитывали индекс массы тела. В качестве маркеров воспалительного процесса использовали уровень С-реактивного белка, общее количество лейкоцитов, количество фибриногена (определенное в плазме весовым методом по Р.А. Рутбергу).

Достоверность различий между показателями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых выборок.

Результаты исследования. Уровни общего ХС и ХС ЛПНП у пациентов, находившихся только на поддерживающей терапии, были достоверно выше, чем у здоровых лиц. После приема БАД «Каррагинан-ДВ» наблюдалось достоверное снижение содержания общего ХС (на 12,7%) и ХС ЛПНП (на 28,9%), достигавшего нормативных показателей. Уровень триглицеридов оставался в пределах нормы. Коэффициент атерогенности, который изначально был достаточно высоким, после приема БАД достоверно снижался на 24,2% (табл.).

Уровень белков аполипопротеина А, выполняющих роль простетической группы в ЛПВП после приема БАД

Таблица

Показатели липидного профиля и маркеров воспаления пациентов с ишемической болезнью сердца до и после приема БАД «Каррагинан-ДВ»

| Показатель | Контроль | До приема | После приема |
|--------------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| Общий ХС, ммоль/л | 4,70±0,13 | 5,40±0,25 | 4,80±0,20* |
| Триглицериды, ммоль/л | 1,55±0,06 | 1,04±0,14 | 1,23±0,15 |
| ХС ЛПНП, ммоль/л | 2,63±0,14 | 3,59±0,27 | 2,55±0,23* |
| ХС ЛПВП, ммоль/л | 1,16±0,04 | 1,41±0,08 | 1,45±0,07 |
| Коэф. атерогенности, ед. | 2,50±0,09 | 3,18±0,27 | 2,41±0,25* |
| Аполипопротеин А, мг/дл | 154,40±7,91 | 157,20±7,52 | 162,80±7,98 |
| Аполипопротеин В, мг/дл | 110,80±9,91 | 153,00±8,08 | 155,60±6,75 |
| Аполипопротеины: В/А | 0,76±0,11 | 1,01±0,07 | 1,00±0,06 |
| Общее кол-во лейкоцитов, Г/л | 5,51±1,24 | 6,71±0,33 | 5,79±0,23* |
| Фибриноген, г/л | 3,24±0,13 | 3,84±0,14 | 3,51±0,12* |
| С-реактивный белок, мг/л | 1,62±0,32 | 3,98±0,77 | 3,46±0,74 |
| Индекс массы тела, кг/м ² | 23,53±1,88 | 27,43±1,44 | 27,21±1,41 |

* Разница с показателем «До приема» статистически значима.

статистически достоверно не изменялся, однако отношение аполипопротеина В к аполипопротеину А продолжает оставаться на верхних границах нормы (табл.).

Уровень маркеров воспаления до приема БАД был несколько выше, чем у здоровых лиц. Применение «Каррагинана-ДВ» приводило к статистически достоверному снижению общего количества лейкоцитов (на 13,7%) и уровня фибриногена (на 8,6%). Отмечено также некоторое снижение уровня С-реактивного белка. Индекс массы тела пациентов не изменился (табл.). Ухудшения самочувствия за период наблюдения не отмечалось. Неблагоприятных явлений, связанных с приемом препарата, не выявлено. Значительных изменений показателей электрокардиограммы не зарегистрировано.

Обсуждение полученных данных. Сердечно-сосудистые нарушения относятся к хроническим заболеваниям и связаны с воспалительными процессами, обусловленными эффектами ХС и ЛПНП, что индуцирует воспаление эндотелия артерий, приводя к атеросклеротическим осложнениям [13, 14]. Известно, что высокое содержание в плазме крови общего ХС, триглицеридов и атерогенных ЛПНП, а также низкое содержание антиатерогенных ЛПВП считаются важными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний [10]. В связи с этим показатели липидограммы широко используются в медицинской практике в качестве биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний [4].

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что применение БАД «Каррагинан-ДВ» способствует улучшению показателей липидограммы пациентов с ишемической болезнью сердца. Об этом свидетельствует также коэффициент атерогенности, значение которого в процессе эксперимента существенно понизилось. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования L.N. Panlasigui et al. [12], посвященного влиянию каррагинана на показатели холестерина обмена у здоровых лиц. Авторы наблюдали достоверное понижение уровней

общего ХС и триглицеридов у волонтеров, в пищевой рацион которых был добавлен каррагинан. Однако в отличие от наших данных изменение уровня ХС ЛПНП у волонтеров отсутствовало, но наблюдалось достоверное повышение концентрации ХС ЛПВП. В то же время положительное влияние пищевых волокон на содержание общего ХС, ХС ЛПНП и триглицеридов и незначительный эффект на ХС ЛПВП отмечены в результатах обобщенных анализов эффектов пищевых волокон [3, 4], что коррелирует с данными, полученными нами в настоящем исследовании.

Известно несколько точек зрения на механизм действия пищевых волокон на показатели холестерина обмена. Предполагается, что некоторые растворимые пищевые волокна могут связывать желчные кислоты и холестерин в нижнем отделе тонкого кишечника, в котором пищевые волокна не перевариваются и не абсорбируются [4, 6, 12]. Итоговое понижение содержания ХС в клетках печени приводит к перегруппировке рецепторов ЛПНП и тем самым к понижению уровня ХС в кровяном русле. Растворимые пищевые волокна, обладающие высокой вязкостью, вызывают замедленную абсорбцию питательных веществ, приводящую к ограничению липогенезиса печени и секреции инсулина [4, 11]. Увеличение массы содержимого кишечника, за счет неперевариваемых пищевых волокон и их способности абсорбировать воду, приводит к замедлению диффузии ферментов, субстратов и нутриентов в абсорбционную фазу, что вызывает снижение уровня и ХС [12]. Хорошо известная способность каррагинанов повышать вязкость растворов и связывать воду могла обуславливать гипополипидимическое действие БАД в соответствии с этим механизмом.

Как показали результаты исследования, индекс массы тела у пациентов до и после приема БАД «Каррагинан-ДВ» не изменялся. Это может свидетельствовать о том, что понижение содержания общего ХС и ХС ЛПНП в плазме крови происходило за счет действия пищевой добавки, а не диеты, которой придерживались пациенты. Соотношение апополипротеинов, оставшееся на верхних границах нормы, могло свидетельствовать о неполном восстановлении липидного обмена на фоне приема БАД.

Как было показано ранее, прием пищевых волокон, способствующих восстановлению липидного состава, может приводить к снижению значений показателей хронического воспаления [9, 6]. Некоторые продукты воспаления, продуцируемые при ответной реакции на атеросклероз, могут быть потенциально полезными в качестве маркеров воспалительного процесса [9]. К таким показателям относятся общее количество белых кровяных клеток, количество лимфоцитов, уровень фибриногена, уровни цитокинов (интерлейкин-6, фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-10) и С-реактивного белка, наиболее информативным из которых считается последний [9, 10].

В настоящем исследовании благоприятное действие «Каррагинана-ДВ» выразилось в понижении

концентрации фибриногена, общего количества лейкоцитов и уровня С-реактивного белка. Механизмы, посредством которых пищевые волокна могут понижать концентрации С-реактивного белка, до сих пор не выяснены, тем не менее рассматриваются возможности того, что они замедляют абсорбцию глюкозы, благоприятствуя ответной реакции кишечной флоры и усиливая синтез противовоспалительных цитокинов [10]. Как было показано нами ранее, в экспериментах *in vitro* каррагинаны, выделенные из красных водорослей дальневосточных морей, обладают иммуномодулирующим действием и усиливают синтез противовоспалительного интерлейкина-10 [1]. Вполне возможно, что улучшение показателей липидограммы и маркеров хронического воспаления связано с иммуномодулирующим эффектом полисахаридов.

Проведение дальнейших исследований, связанных с изучением влияния БАД «Каррагинан-ДВ» на показатели иммунного статуса пациентов с ишемической болезнью сердца, позволит с определенной осторожностью приблизиться к пониманию молекулярных механизмов физиологического действия этих полисахаридов.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальная наука – медицине» и «Молекулярная и клеточная биология».

References

1. Ermak I.M., Aminin D.L., Davydova V.N. et al. Immunomodulatory activity of carrageenan from the red algae of the Far Eastern seas, *Pacific Medical Journal*. 2009. No. 3. P. 36–39.
2. Hasina E.I., Sgrebneva M.N., Ermak I.M., Maleev V.V. Effect of carrageenan on the mouse non-specific resistance with LPS-induced endotoxemia, *ZhMJeI*. 2007. No. 2. P. 57–60.
3. Brown L., Rosner B., Willett W., Sacks F. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis, *Am. J. Clin. Nutr.* 1999. Vol. 69. P. 30–42.
4. Castro I., Barroso L.P., Sinnecker P. Functional foods for coronary heart disease risk reduction: a meta-analysis using a multivariate approach, *Am. J. Clin. Nutr.* 2005. Vol. 82. P. 32–40.
5. Food and Drugs: food additives permitted for direct addition to food for human and consumption. 21 C.F.R. 172.620, 172.626, 172.655, 172.660. 2000.
6. Galisteo M., Duarte J., Zarzuelo A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome, *J. Nutr. Biochem.* 2008. Vol. 19. P. 71–84.
7. Holdt S.L., Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation, *J. Appl. Phycol.* 2011 in press.
8. Kilpatrick D.C. Immunological aspects of the potential role of dietary carbohydrates and lectins in human health. *Eur. J. Nutr.* 1999. Vol. 38, No. 1. P. 107–117.
9. King D. Dietary fiber, inflammation, and cardiovascular disease, *Mol. Nutr. Food Res.* 2005. Vol. 49. P. 594–600.
10. Lottenberg A.M.P., Fan P.L.T., Buonacorso V. Effects of dietary fiber intake on inflammation in chronic diseases, *Einstein*. 2010. Vol. 8, No. 2. P. 254–58.
11. McIntosh M., Miller C. A diet containing food rich in soluble and insoluble fibre improves glycemic control and reduces hyperlipidemia among patients with type 2 diabetes mellitus, *Nutr. Rev.* 2000. Vol. 59. P. 52–55.
12. Panlasigui L.N., Baello O.Q., Dimatangal J.M., Dumelod B.D. Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 2003. Vol. 12, No. 2. P. 209–214.
13. Stocker R., Keaney J.F. Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis, *Physiol. Rev.* 2004. Vol. 84. P. 1381–1478.

14. Wellen K., Hotamisligil G.S. Inflammation, stress, and diabetes, *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115, No. 5. P. 1111–1119.
15. Yermak I.M., Khotimchenko Yu.S. Chemical properties, biological activities and applications of carrageenan from red algae, *Recent Advances in Marine Biotechnology* (Fingerman M., Nagabhushanam R. eds). USA–UK: Sci. Publ. Inc., 2003. Vol. 9, P. 207–255.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

RED ALGAE POLYSACCHARIDE-BASED ADDITIVE AND LIPID EXCHANGE OF PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

E.V. Sokolova¹, T.B. Ivanova², S.P. Kryzhanovskiy², L.N. Bogdanovich², A.O. Barabanova¹, I.M. Ermak¹

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation),

²Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The paper provides results of examination of 32 patients aged from 44 to 64 years diagnosed with ischemic heart disease (stable angina of functional class II-III). The studies have been targeted to identify effects from bioactive food additive 'Carrageenan-DV' on the lipid exchange indices and chronic inflammation markers. The drug was prescribed in 250 mg capsules during 20 days. Upon completion of the bioactive additive intake, the total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol and atherogenic index have decreased in blood serum to normal ranges. There were decreased levels of C-reactive protein, total leukocytes and fibrinogen. The authors believe the bioactive additive 'Carrageenan-DV' may be used as additional source of dietary fibers in the integrated treatment of patients with cardiovascular diseases.

Key words: dietary fibers, Carrageenan, cholesterol, inflammation.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 26–29.

УДК 616.12-005.4-085.272.4:615.324:593.953

ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИЩЕ ИЗ ИКРЫ МОРСКИХ ЕЖЕЙ В МОНОТЕРАПИИ И КОМБИНАЦИИ С АТОРВАСТАТИНОМ

С.П. Крыжановский, М.А. Яцкова, В.Д. Головачева

¹Медицинское объединение ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 54)

Ключевые слова: гиперхолестеринемия, ишемическая болезнь сердца, маристим, статины.

На основании обследования 45 пациентов с диагнозом «ишемическая болезнь сердца: стабильная стенокардия напряжения 2–3 функционального класса» и гиперхолестеринемией впервые изучено влияние биологически активной добавки к пище из икры морских ежей «Маристим» на показатели липидного обмена. Установлена способность «Маристима» снижать уровень общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности и триглицеридов, а также увеличивать относительное содержание холестерина липопротеидов высокой плотности в крови как при монотерапии, так и в сочетании с уменьшенной вдвое рабочей дозой аторвастатина. Столь высокий аддитивный эффект комбинированного лечения привлекает внимание и будет изучаться дальше.

По данным ВОЗ (1992), сердечно-сосудистая патология, главным образом ишемическая болезнь сердца и цереброваскулярные заболевания, остается наиболее частой причиной смертности взрослого населения. В России вклад этих болезней в структуру смертности составляет 55,6%. Это является одной из причин низкой продолжительности жизни в нашей стране – 65,4 г. [1]. При этом рост смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, начавшийся в СССР еще до 1985 г., продолжается и до настоящего времени [2].

В первом крупном рандомизированном (скандинавском) исследовании была убедительно доказана роль гиперлипидемии как основного фактора риска ишемической болезни сердца и эффективность ингибиторов 3-гидрокси-3-метил-глутарил-коэнзим-А-редуктазы (статинов) при вторичной профилактике ишемической болезни сердца. При постоянном приеме симвастатина в дозе 20–40 мг в сутки в течение 5,4 г.

впервые удалось снизить общую смертность на 30%, смертность от сердечно-сосудистых заболеваний – на 42%, частоту коронарных событий – на 34%, потребность в реваскуляризации – на 37%. Последовавшие затем масштабные международные исследования подтвердили эффективность статинов в уменьшении риска смерти от основных сердечно-сосудистых заболеваний – инфаркта миокарда и ишемического инсульта. Создавались новые, более эффективные препараты, одновременно менялась и тактика лечения статинами, так как была отмечена прямая зависимость между частотой сердечно-сосудистых осложнений и смертностью и степенью снижения уровня холестерина (ХС) липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Это привело к постепенному изменению целевого уровня ХС ЛПНП, что требовало более интенсивной гиполипидемической терапии. К настоящему времени в американских, европейских и российских рекомендациях указывается на необходимость достижения более радикально низких уровней ХС ЛПНП (особенно при высоком риске сердечно-сосудистых осложнений) – 1,8 ммоль/л, что возможно при «агрессивной» гиполипидемической терапии [4, 9, 12].

В исследовании ASTEROID (A Study to Evaluate the Effect of Rosuvastatin on Intravascular Ultrasound-Derived Coronary Atheroma Burden) при «агрессивной» терапии крестором (40 мг/сутки) было достигнуто снижение уровня ХС ЛПНП в среднем до 1,6 ммоль/л, повышение концентрации ХС липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) на 14,7% и получены ангиографические данные о регрессе атеросклеротического поражения коронарных сосудов [10]. В исследовании

Крыжановский Сергей Петрович – канд. мед. наук, главный врач МО ДВО РАН; тел.: +7 (423) 231-09-10, e-mail: priemmodvoran@mail.ru

REVERSAL (REVERSing Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering) пересчет объема атеросклеротической бляшки был получен при «агрессивной» терапии аторвастатином (80 мг/сутки) [11]. Эффективность титрования дозы статинов оказалась более перспективна, чем применение стабильных доз [6].

Однако на высоких терапевтических дозах статинов не всегда удается достичь необходимого целевого уровня липидов, а частота побочных свойств препаратов увеличивается, и следующий этап в лечении гиперхолестеринемии связан с созданием эзетимиба (1998), что послужило причиной формулировки нового подхода в гиполипидемической терапии – использованию метода «двойного ингибирования» (применение двух препаратов, при комбинации которых достигался аддитивный эффект). В связи с этим целью настоящего исследования был анализ гиполипидемического эффекта маристима при монотерапии и в комбинации с аторвастатином.

Биологически активная добавка «Маристим» представляет собой 100 % натуральный продукт из икры морских ежей. В ее состав входят жиры (20%, в т.ч.: триглицериды – 60–75%, фосфолипиды – 22–36%; в составе фосфолипидов преобладает лецитин – 61–67%, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (более 20%), сиа-логликолипиды, каротиноиды, витамины (С, В₁, В₂, В₁₂, РР, К₁ и др.), макро- и микроэлементы (йод, железо, медь, кобальт и др.) в легкоусвояемой форме, незаменимые аминокислоты, нуклеиновые кислоты. «Маристим» рекомендован в качестве дополнительного источника антиоксидантов, имеет санитарно-эпидемиологическое заключение Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 77.99.20.916Б.000796.06.04 от 01.06.2004 г.

«Маристим» препятствует естественному старению организма, обеспечивает нормальный обмен жиров и холестерина (удерживает холестерин и триглицериды в жидком состоянии, препятствуя их отложению в стенках сосудов), ускоряет метаболизм жиров в печени, регулирует процессы тромбообразования. Витаминно-минеральный комплекс повышает физическую и психическую выносливость организма, принимает участие в процессах обмена веществ, в синтезе и обеспечении функций ферментов, нормализует водно-солевой обмен, оказывает выраженный стимулирующий эффект на процессы кроветворения.

Материал и методы. Под нашим наблюдением находились 45 пациентов (18 мужчин и 27 женщин) в возрасте от 45 до 70 лет (средний возраст 60,2±4,2 г.) с диагнозом «ишемическая болезнь сердца: стабильная стенокардия напряжения 2–3-го функционального класса» (табл. 1). Все обследуемые находились на стационарном лечении в терапевтическом отделении МО ДВО РАН. Диагноз устанавливали на основании

Таблица 1

Характеристика больных

| Показатель | 1-я группа | | 2-я группа | | 3-я группа | |
|---------------------------------------|------------|------|------------|-------|------------|-------|
| | абс. | % | абс. | % | абс. | % |
| Возраст, лет | 58,0±7,2 | | 62,0±5,5 | | 61,0±6,9 | |
| Пол, муж./жен. | 5/10 | | 4/11 | | 6/9 | |
| Сопутствующие болезни | абс. | % | абс. | % | абс. | % |
| Постинфарктный кардиосклероз | 3 | 20,0 | 2 | 13,3 | 4 | 26,6 |
| Артериальная гипертензия | 10 | 66,7 | 13 | 86,7 | 12 | 80,0 |
| Патология желудка и 12-перстной кишки | 4 | 26,6 | 4 | 26,6 | 5 | 33,3 |
| Сопутствующая терапия | абс. | % | абс. | % | абс. | % |
| Ингибиторы АПФ | 7 | 46,7 | 10 | 66,7 | 8 | 53,3 |
| Бета-блокаторы | 9 | 60,0 | 15 | 100,0 | 14 | 93,3 |
| Нитраты | 5 | 33,3 | 4 | 26,6 | 4 | 26,6 |
| Аспирин | 9 | 60,0 | 14 | 93,3 | 15 | 100,0 |
| Мочегонные | 2 | 13,3 | 3 | 20,0 | 3 | 20,0 |
| Антагонисты кальция | 2 | 13,3 | 2 | 13,3 | 3 | 20,0 |

критериев ВОЗ, функциональный класс стенокардии – по классификации Канадского кардиологического общества. В ходе исследования были сформированы следующие группы пациентов:

1-я группа – 15 больных, получавших базовую терапию, включавшую аторвастатин в дозе 20 мг в сутки;

2-я группа – 15 больных, получавших базовую терапию, включавшую маристим в дозе 4,5 мг в сутки;

3-я группа – 15 больных, получавших базовую терапию, включающую аторвастатин (10 мг в сутки) и маристим (4,5 мг в сутки).

Лечение проводили в течение 4 недель. Все группы были сопоставимы по полу, возрасту и функциональному классу стенокардии.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Липидоснижающий эффект отмечается во всех группах наблюдения. Гиполипидемическое действие маристима зарегистрировано и в условиях монотерапии. Так, снижение уровня общего ХС здесь было сопоставимо с эффектом монотерапии аторвастатином. Более значительное снижение общего ХС при комбинированной терапии определенно связано с маристимом, тем более что пациенты 3-й группы получали аторвастатин в половинной дозе. Действие маристима в дозе 10 мг (2-я группа) на содержание ХС ЛПНП уступало эффекту аторвастатина (в дозе 20 мг) почти вдвое, что указывает на недостаточный антиатерогенный эффект. Однако в комбинации даже с половинной дозой аторвастатина (10 мг) липидоснижающее действие было достоверно выше, чем при монотерапии большей дозой статина (табл. 2).

Наиболее значимым было действие маристима на уровень триглицеридов (ТГ). При монотерапии он оказался здесь почти в 3 раза эффективнее аторвастатина, а при комбинированной терапии – в 2 раза. Возможно, этот эффект был бы выше на соответствующих препаратах дозах (20/10 мг). Коэффициент атерогенности во всех группах наблюдения не различался. Известно, что кроме атерогенных липидов (ХС ЛПНП) установлена причинно-следственная связь между низким уровнем

Таблица 2

Липидный спектр сыворотки крови у пациентов со стенокардией до и после лечения

| Показатель | 1-я группа | | 2-я группа | | 3-я группа | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | до | после | до | после | до | после |
| Общий ХС, ммоль/л | 6,28±1,24 | 5,49±0,75* | 5,97±0,92 | 5,24±0,53* | 6,00±0,92 | 5,03±0,61* |
| ХС ЛПНП, ммоль/л | 4,48±1,35 | 3,61±0,80* | 3,49±0,86 | 3,14±0,44* | 3,64±0,70 | 2,78±0,81* |
| ХС ЛПВП, ммоль/л | 1,07±0,13 | 1,16±0,12* | 1,25±0,29 | 1,39±0,18* | 1,17±0,21 | 1,44±0,17* |
| ТГ, ммоль/л | 1,83±0,39 | 1,67±0,34* | 1,67±0,58 | 1,25±0,29* | 1,41±0,63 | 1,18±0,46* |
| Коэф. атерогенности | 5,00±1,30 | 4,08±1,20 | 4,10±1,70 | 3,70±1,90 | 4,20±1,20 | 3,10±1,00 |

* Разница с показателем до лечения статистически значима.

ХС ЛПВП и прогрессированием атеросклероза [3]. Отмечаются особые трудности в повышении уровня этого ХС, в то время как положительный эффект в этом направлении – путь к снижению смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Здесь особенно наглядно проявлялось действие маристима, который повышал содержание ХС ЛПВП в крови, что было отмечено как при монотерапии, так и при комбинированном лечении (табл. 2). Степень повышения концентрации ХС ЛПВП была в первую очередь связана с маристимом, так как аторвастатин в этой группе пациентов применялся в меньшей дозе, чем при монотерапии. Столь высокий аддитивный эффект комбинированного лечения привлекает внимание и будет изучаться дальше.

В методе «двойного ингибирования» при комбинированной терапии липидоснижающими препаратами чаще всего используются статины или фибраты с эзетимибом – ингибитором кишечной абсорбции ХС. При этом эзетимиб при монотерапии (10 мг в сутки) снижает уровень ХС ЛПНП на 18,5 %, вызывает минимальное уменьшение содержания ТГ (на 8–10 %) и почти не влияет на уровень ХС ЛПВП, повышая его всего на 1 % [7]. Однако при комбинированной терапии с аторвастатином выявляется аддитивный (синергический) эффект, но без заметного действия на концентрацию ХС ЛПВП [8]. При комбинации же эзетимиба с фенофибратом отмечен даже противоположный эффект – снижение уровня ХС ЛПВП. При «двойном ингибировании» эзетимибом (10 мг) и симвастатином (40 и 80 мг) даже при высоких дозах статина разница в снижении концентрации ТГ была сравнительно небольшой: при монотерапии симвастатином – 19 %, при комбинированной терапии – 26 %. Дополнительный эффект в повышении уровня ХС ЛПВП был позитивным, хотя и не столь существенным [5].

Таким образом, исследование маристима в монотерапии атеросклероза выявили у него липидокорректирующие свойства, проявляющиеся в понижении уровня общего ХС, ХС ЛПНП и ТГ и повышении уровня ХС ЛПВП. Сравнивая эффективность маристима и эзетимиба следует отметить несколько более выраженный эффект эзетимиба в отношении ХС ЛПНП при монотерапии (13,5–18,5 % и 10 % соответственно), но маристим оказался эффективен и в отношении ТГ

и значительно превосходил как эзетимиб, так и статины по влиянию на уровень ХС ЛПВП.

References

- Ageev F.T. The combination of high index cardiac risk and normal cholesterol levels: innovative approaches to patient of doctor-patient, *Consilium Medicum*, 2008. No. 3. P. 3–11.
- Aronov D.M., Lupanov V.P. Atherosclerosis and coronary heart disease. M.: Triada, 2009. 245 p.
- Dankovceva E.N., Zatejwikov D.A. The ways to increase high-density lipoprotein, *Serdce*. 2006. V. 5, no. 5. P. 239–241.
- Diagnosis and correction of the metabolic disorder for the prevention and treatment of atherosclerosis: Russian recommendations, *Kardiovask. terapija i profilakt.* 2007. Prim. 3. P. 1–26.
- Zatejwikov D.A., Talyzin P.A. A new approach to lipid-lowering therapy: the dual inhibition, *Farmateka*. 2006. no. 13. P. 1–10.
- Kulev B.D., Ageev F.T. The effect of different approaches statin therapy in patients at high risk in terms of vascular endothelial, *Kardiologija*. 2009. No. 5. P. 4–10.
- Susekov A.V. Dual inhibition of cholesterol: new perspectives in the treatment of patients with atherosclerosis, *Kardiologija*. 2006. No. 1. P. 24–27.
- Shljahto E.V., Panov A.V., Gordeev M.L. et al. Combination lipid-lowering therapy fluvastatin and ezetimibe in patients with coronary heart disease after coronary artery bypass grafting, *Aktualnye voprosy boleznej serdca i sosudov*. 2007. No. 4. P. 8–12.
- Grundy S.V., Cleman J.I., Bairey C.N. et al. Implication of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Programm Adult Treatment, Panel 3, Guidelines, *Circulation*. 2004. Vol. 110. P. 227–239.
- Nissen S.E., Stephen J.N., Sipahi I. et al., Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis. The ASTEROID trial, *JAMA*. 2006. Vol. 295. P. 1556–1565.
- Nissen S.E., Tuzcu E.M., Schoenhagen P. et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis. A randomized controlled trial, *JAMA*. 2004. Vol. 291. P. 1071–1080.
- Smith S., Alln J., Blairs S. et al. AHA/ACC guidelines for Secondary Prevontion for Patients with coronary and other atherosclerosis vascular disease: 200 update, *Circulation*. 2006. Vol. 113. P. 23–63.

Поступила в редакцию 19.04.2011.

HYPOLIPIDEMIC EFFECTS OF SEA URCHIN-DERIVED BIOACTIVE FOOD ADDITIVES IN MONOTHERAPY AND IN COMBINATION WITH ATORVASTATIN

S.P. Kryizhanovsk, M.A. Yatskova, V.D. Golovacheva
 Medical Association of Far East Branch of Russian Academy of Sciences (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – Examining 45 patients diagnosed with 'ischemic heart disease: stable angina of effort (functional class II-III)' and hypercholesterolemia, the authors have investigated the effects of sea urchin-derived bioactive food additive 'Maristim' on the lipid exchange indices and determined the capacity of 'Maristim' to decrease the level of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides, and to increase relative level of high-density lipoprotein cholesterol in blood during monotherapy and combined with halved efficient dose of atorvastatin. The high additive effects of the combined therapy appear to be a major focus of interest, thus, requiring further investigation.

Key words: hypercholesterolemia, ischemic heart disease, Maristim, statins.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 29–31.

УДК [616.91-002.151-06:616.61]-085.281:582.273

ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРРАГИНАНОВ ИЗ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

И.Г. Максема¹, Г.Г. Компанец¹, А.О. Барабанова², И.М. Ермак², Р.А. Слонова¹

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: каррагинаны, хантавирусная инфекция.

Изучена противовирусная активность каррагинанов двух структурных типов – каппа и лямбда, полученных из водорослей *Chondrus armatus*, в опытах *in vitro* при экспериментальной хантавирусной инфекции. Обнаружено выраженное вирусингибирующее действие при использовании высоких концентраций каррагинанов: 1000–2000 мкг/мл. Установлено, что при использовании более низких концентраций (500 мкг/мл) наблюдалась заметная разница в проявлении противовирусного действия. Отмечено, что даже в достаточно высоких концентрациях каррагинаны обладают низкой эффективностью подавления вирусной репродукции при предварительной обработке препаратами клеток Vero E6.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острая вирусная природно-очаговая зоонозная инфекция человека, представляющая серьезную проблему в связи с широким распространением, тяжестью болезни, отсутствием эффективных средств этиотропной терапии и специфической профилактики. В Дальневосточном регионе ГЛПС регистрируется ежегодно и характеризуется чередованием подъемов и спадов заболеваемости с преобладанием тяжелых и среднетяжелых форм болезней и высокой летальностью. При среднемноголетнем показателе заболеваемости 3,1 % в отдельные годы летальность достигала 15 % [4].

До настоящего времени для предупреждения заболеваний ГЛПС в нашей стране специфическая профилактика не осуществляется. Рекомендательный комплекс мер неспецифической профилактики не всегда является эффективным, поскольку широкий охват территорий, где регистрируется заболевание, для проведения истребления грызунов и дезинфекционных мероприятий является трудновыполнимой задачей.

С учетом важности проблемы как для Приморского края, так и в целом для России поиск препаратов, обладающих противовирусным действием, при отсутствии вакцинопрофилактики остается актуальной задачей. Перечень средств, которые используются при хантавирусной инфекции в профилактических и лечебных целях, пока невелик. В экспериментальных и клинических наблюдениях показана эффективность препарата виразола (рибавирина) для снижения тяжести и продолжительности заболевания [5, 7]. Действие виразола связано с нарушением репродукции вируса в чувствительных клетках за счет мутаций в геноме. Однако положительные результаты отмечаются при использовании виразола в ранние сроки заболевания, что при ГЛПС не всегда возможно из-за несвоевременной постановки

диагноза. Выявленные иммунные нарушения, во многом определяющие тяжесть инфекции, обуславливают возможность применения иммунокорректирующей терапии в комплексном лечении больных ГЛПС [3].

В последние годы проводятся исследования по использованию индукторов интерферона различного происхождения. По данным С.Я. Логиновой и др. [5], в культурах клеток КЛ-17 и СПЭВ ларифан и рифастин в незначительной концентрации практически полностью подавляли репродукцию вируса Хантаан. Известный и широко используемый при респираторных инфекциях препарат арбидол препятствовал контакту и проникновению хантавирусов в клетку *in vitro* и *in vivo* [9].

Результаты комплексных фундаментальных и прикладных исследований демонстрируют целесообразность дальнейшего поиска новых соединений, обладающих противовирусными свойствами. В этом плане большой интерес представляют препараты из морских гидробионтов, в частности полисахариды, благодаря их биосовместимости, биоразлагаемости и широкому спектру биологической активности. Исследования, проведенные нами ранее с использованием фукоиданов – сульфатированных полисахаридов бурых водорослей, показали их влияние на адсорбцию вируса Хантаан при экспериментальной инфекции [6].

Согласно литературным данным, высокую ингибирующую активность в отношении некоторых вирусов животных и человека проявляют сульфатированные полисахариды красных водорослей – каррагинаны [10, 13]. Каррагинаны представляют собой семейство линейных сульфатированных галактанов, построенных из остатков галактозы и ее производных, характеризуются разнообразием структурных типов и широким спектром биологической активности – иммуномодулирующей, антикоагулирующей, антиоксидантной и антивирусной [15]. Физиологический эффект каррагинанов определяется как структурой полисахарида, так и его молекулярной массой. Так, различные типы каррагинанов оказывают *in vitro* ингибирующее влияние на репликацию ряда ДНК- и РНК-вирусов: вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) 1-го типа, вируса желтой лихорадки, вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов, вирусов свинной и тропической лихорадки [10, 13, 15]. Обнаружено, что *in vitro* каррагинан с высокой степенью сульфатирования способен блокировать эпителиальную трансмиссию ВИЧ в дозах, в тысячу раз более низких, чем требуется для ингибирования клеточной адгезии [8]. Наиболее вероятно, что основной мишенью противовирусного

Максема Ирина Геннадьевна – канд. мед. наук, ст.н.с. лаборатории ГЛПС НИИЭМ СО РАМН: e-mail: irinaluna@inbox.ru

действия каррагинанов является адсорбция вирусов, а не вирусная интернализация и синтез внутриклеточных белков [10]. А. Reunov et al., впервые показали, что κ/β -каррагинан из дальневосточной красной водоросли *Tichocarpus crinitus* ингибирует накопление вируса табачной мозаики в листьях табака [12].

О влиянии каррагинанов на развитие хантавирусной инфекции не сообщалось. Поскольку важнейшим свойством противовирусных препаратов является их способность подавлять репродукцию вируса в клетке, нашей целью был анализ вирусингибирующей активности каррагинанов *in vitro* на культуре чувствительных клеток Vero E6.

Материал и методы. В экспериментах использовали штамм 76–118 вируса Хантаан, адаптированный к культуре клеток Vero E6, в титре 4,8 lg фокусобразующих единиц/мл. В качестве ростовой среды для выращивания клеток и размножения вируса использовали питательную среду «Игла MEM» с двойным набором аминокислот и витаминов, с добавлением 7 % фетальной сыворотки, 0,06 % L-глутамина и антибиотиков. Реакцию индикации инфекционных фокусов проводили согласно P.W. Lee. et al [11]. Вирусосодержащую жидкость предварительно обрабатывали каррагинанами в нижеперечисленных концентрациях. Контакт неразведенной вирусосодержащей жидкости с каррагинанами осуществляли в течение 1 часа при 37 °С. Затем смесь титровали с 10-кратными разведениями и наносили на монослой клеток Vero E6, выращенный на 24-луночных планшетах. Клетки культивировали под полужидким покрытием (0,6 % КМЦ) в инкубаторе с воздушной смесью, содержащей 5 % CO₂ при 37 °С. Результат учитывали на 10-е сутки после заражения.

Каррагинаны двух структурных типов – каппа и лямбда – были получены из водорослей *Chondrus armatus*, собранных в Японском море (залив Петра Великого, м. Фальшивый). Полисахариды выделяли, фракционировали, идентифицировали методами инфракрасной и ¹³C-ядерно-магнитно-резонансной спектроскопии, как описано ранее [14]. Общее содержание углеводов определяли фенол-сернокислотным методом, используя D-галактозу в качестве стандарта, а количество сульфатных групп определяли турбидиметрическим методом, согласно приведенным ранее методикам.

Для вычисления молекулярной массы использовали вискозиметрический метод. Вязкость измеряли в модифицированном вискозиметре Убеллоде (СКБ «Пушино», Россия) с диаметром капилляра 0,3 мм в диапазоне концентраций 0,5–2,0 мг/мл в 0,01М растворе NaCl при 25 °С. Значения характеристической вязкости вычисляли путем экстраполяции графика зависимости $(\ln \eta_{\text{отн}})/C$ от концентрации на нулевую концентрацию.

Молекулярные массы рассчитывали по уравнению Марка–Хаувинка–Куна: $[\eta] = KM^\alpha$, где $[\eta]$ – характеристическая вязкость, а K и α – эмпирические константы, значения которых были взяты для данной системы полимер–растворитель: K = 3×10^3 и $\alpha = 0,95$. В работе

Таблица 1

Характеристика каррагинанов

| Тип | Содержание, % | | | Молярная масса, кДа |
|--------------|---------------|----------------------|----------|---------------------|
| | моносахариды | 3,6-ангидрогалактоза | сульфаты | |
| Каррагинан-1 | 47 | 33,0 | 22,0 | 246 |
| Каррагинан-2 | 29 | 0,56 | 28,0 | 140 |

использовали препараты – каррагинан-1 (κ -тип) и каррагинан-2 (λ -тип), различающиеся степенью сульфатирования и молекулярной массой (табл. 1). Каррагинаны применяли в концентрациях 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 и 2000 мкг/мл. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Первичный скрининг препаратов проводили по двум направлениям: различными концентрациями каррагинанов обрабатывали вирус и неинфицированные клетки Vero E6. Наблюдения за культурой клеток при использовании всех концентраций препаратов не выявили цитодеструктивного эффекта. Результаты вирусингибирующей активности каррагинанов при предварительной обработке вируса представлены в табл. 2. Показано, что препараты в дозах 10–50 мкг/мл не снижали инфекционность вируса. При использовании каррагинанов в концентрациях 100–250 мкг/мл титр вируса снижался в пределах 1,0 lg.

Более выраженное вирусингибирующее действие было обнаружено при использовании высоких концентраций испытуемых препаратов. Каррагинан-1 снижал титр вируса в концентрации 1000–2000 мкг/мл на 1,9–3,8 lg. Выраженный антивирусный эффект каррагинана-2 также проявлялся при максимальной концентрации (2000 мкг/мл). Следует отметить, что при низких концентрациях каррагинанов, используемых для обработки вируса (500 и 1000 мкг/мл), регистрировалась заметная разница противовирусного действия. Так, антивирусная активность каррагинана-2 при концентрации 500 мкг/мл была в 1,5 раза выше, чем каррагинана-1 (табл. 2), что, вероятно, обусловлено структурными особенностями этих полисахаридов, в частности высокой степенью сульфатирования каррагинана-2 и незначительным содержанием 3,6-ангидрогалактозы (табл. 1). Согласно литературным данным, противовирусная активность сульфатированных полисахаридов повышается с увеличением степени сульфатирования, но важную роль при этом играют распределение сульфатных групп, конформационная гибкость и относительное количество 3,6-ангидрогалактозы [10, 13]. В то же время относительно высокая активность каррагинана-1 при использовании больших концентраций может проявляться благодаря его более высокой молекулярной массе (табл. 1) и способности этого типа полимера образовывать гели при высоких концентрациях [15], что, возможно, приводит к обволакиванию вируса и ингибированию его прикрепления к клеткам.

Таблица 2

Влияние различных концентраций каррагинанов на репродукцию вируса Хантаан в культуре клеток Vero

| Препарат | Доза, мкг/мл | Подавление репродукции вируса (Δ), lg |
|-----------------|------------------|--|
| Каррагинан-1 | 100 | 0,7±0,5 |
| | 250 | 1,3±0,5 |
| | 500 ¹ | 1,1±0,3 |
| | 1000 | 1,9±0,2 ² |
| | 1500 | 2,8±0,3 ² |
| | 2000 | 3,8±0,3 ² |
| Каррагинан-2 | 100 | 1,3±0,3 |
| | 250 | 1,3±0,3 |
| | 500 ¹ | 2,0±0,3 ² |
| | 1000 | 2,5±0,5 ² |
| | 1500 | 2,8±0,3 ² |
| | 2000 | 3,8±0,3 ² |
| Контроль вируса | – | 4,8±0,2 |

¹ Различие между препаратами статистически значимо.

² Различие с контролем статистически значимо.

Несколько иная картина отмечалась при предварительной обработке препаратами клеток Vero E6. Отмечено, что даже в достаточно высоких концентрациях (500–1000 мкг/мл) каррагинаны обладали низкой эффективностью в подавлении вирусной репродукции (1,0 lg). Использование более высоких концентраций (1500 и 2000 мкг/мл) снижало инфекционный титр на 1,5 lg.

Эффективность вирусингибирующего действия каррагинанов зависела от титра вируса. При невысоком титре (3,0 lg) отмечалось снижение инфекционности возбудителя, при предварительной обработке каррагинаном-1 в концентрации 100 и 200 мкг/мл, на 2,0 lg. Т.е. чем выше титр вируса, тем более высокие концентрации препаратов необходимы для его подавления.

Ранее было показано, что условная величина, позволяющая дифференцировать вирусингибирующие препараты, составляет 1,78 lg [2]. Другие авторы за истинную вирусингибирующую активность принимали разницу в титрах вируса в опытном и контрольных рядах не менее 2,0 lg [1]. Таким образом, снижение титра хантавируса под действием каррагинанов на 1,9–3,8 lg можно считать проявлением истинной вирусингибирующей активности. Суммирование результатов изучения антивирусной активности полисахаридов в отношении вируса Хантаан показало целесообразность дальнейшего анализа эффективности каррагинанов в отношении возбудителя ГЛПС *in vivo*, а также оценки возможности использования их в практической медицине.

References

- Bichurina M.A., Nikitina L.E., Sovetova M.G. et al. Virus inhibitory activity of the drug, made from mussel hydrolyzate, *Vopr. virusol.* 1994. No. 3. P. 134–136.
- Votjakov V.I., Boreko E.I. Approach to assessing the activity of chemical compounds against viruses propagated in material culture, *Metod. vopr. nauchnoj razrabotki protivovirusnyh vewestv: tez. dokl. Minsk*, 1977. P. 10–14.
- Ivanis V.A. Clinic, immunomodulating therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome in the region of different serotypes

of hantavirus circulation: synopsis, tethys, Vladivostok, 2004. 52 p.

- Ivanis V.A., Maksema I.G., Afanaseva V.I., Slonova R.A. Clinical and immunological features of hemorrhagic fever with renal syndrome in severe with lethal and favorable outcome in Primorye, *Pacific Medical Journal.* 2010. No. 3. P. 46–51.
- Loginova S.Ja., Borisevich S.V., Kovalchuk A.V. et al. Antiviral activity in vitro drug against the pathogen of hemorrhagic fever with renal syndrome, *Voprosy virusologii.* 2007. No. 6. P. 34–36.
- Maksema I.G., Makarenkova I.D. Antiviral activity of fucoidan natural origin in experimental infection with hantavirus, *Pacific Medical Journal.* 2008. No. 2. P. 86–89.
- Obrazcov Ju.G. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the military of the Primorsky Krai (clinical and epidemiological characteristics and capabilities of causal therapy): synopsis, dissertation. SPb., 2005. 20 p.
- Bourgougnon N. Anti-HIV Compound from Red Seaweeds, *Recent Advances in Marine Biotechnology* (Fingerman M, Nagabhusanam R. eds). Sci. Publ. Inc. USA–UK. 2003. Vol. 9. P. 165–206.
- Deng H.Y., Luo F., Shi L.Q. et al. Efficacy of arbidol on lethal hantaan virus infections in suckling mice and in vitro, *Pharmacologica Sinica.* 2009. No. 30. P. 1015–1024.
- Ghosh T., Chattopadhyay K., Marschall M. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation, *Glycobiology.* 2009. Vol. 19. No. 1. P. 2–15.
- Lee P.W., Gibbs C. Jr., Gajdusek D., Yanagihara R. Serotypic classification of hantaviruses by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests, *J. Clin. Microbiol.* 1985. No. 22. P. 940–944.
- Reunov A., Nagorskaya V., Lapshina L. et al. Effect of κ/λ -carrageenan from red a lga *Tichocarpus crinitus* (Tichocarpaceae) on infection of detached tobacco leaves with tobacco mosaic virus, *J. Plant Diseases and Protection.* 2004. Vol. 111. P. 165–172.
- Talarico L.B., Zibetti R.G., Faria P.C. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Crytonmia crenulata*, *Int. J. Biol. Macromol.* 2005. Vol. 34. P. 63–71.
- Yermak I.M., Kim Y.H., Titlyanov E.A. et al. Chemical structure and gel properties of carrageenan from a lga belonging to the Gigartinaceae and Tichocarpaceae, collected from the Russian Pacific coast, *J. Appl. Phycol.* 1999. Vol. 11. P. 41–48.
- Yermak I.M., Khotimchenko Yu.S. Chemical properties, biological activities and applications of carrageenan from red a lga, *Recent Advances in Marine Biotechnology* (Fingerman M, Nagabhusanam R. eds). Sci. Publ. Inc. USA–UK. 2003. Vol. 9. P. 207–255.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

ANTIVIRAL ACTION OF RED ALGAE-DERIVED CARRAGEENANS IN CASE OF EXPERIMENTAL HUNT VIRUS INFECTION

I.G. Maksema¹, G.G. Kompanets¹, A.O. Barabanova², I.M. Ermak², R.A. Slonova¹

¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ²Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The authors have studied antiviral action of Kappa type carrageenan and Lambda type carrageenan derived from *Chondrus armatus* algae *in vitro* during experimental Hunt virus infection and found out evident virus-inhibiting action, given the high concentrations of Carrageenan of up to 1000–2000 mkg/ml. Given the lower concentrations (500 mkg/ml), the antiviral effects varied very much. In case of high levels, the Carrageenans were of low efficiency to inhibit viral reproduction during preliminary treatment with Vero E6 cells.

Key words: Carrageenan, Hunt virus infection.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 32–34.

УДК 577.112:612.017.1:577.114

ВЛИЯНИЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ НА СПОНТАННУЮ И ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ *IN VITRO*

Н.В. Сергеева¹, Л.Н. Богданович¹, Ю.С. Хотимченко²

¹ Медицинское объединение ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95),

² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

Ключевые слова: альгинат натрия, моноклеарные клетки, цитокины.

Изучено влияние альгината натрия на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов (интерлейкинов 2 и 6 и фактора некроза опухоли- α) моноклеарами периферической крови 16 здоровых доноров. Показано, что альгинат натрия обладает существенной концентрационно-зависимой цитокин-индуцирующей активностью в отношении интерлейкина-2 и слабой – в отношении интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- α .

Цитокины – продуцируемые клетками белково-пептидные факторы, участвующие в регуляции межклеточных и межсистемных взаимодействий. Наряду с различиями в строении, биологической активности, происхождении и продолжительности существования цитокины обладают сходными характеристиками, объединяющими их в самостоятельную систему регуляции. Дисбаланс цитокинов приводит к дефектам иммунного ответа, нарушениям защитных и формированию патологических ответных реакций организма и является важнейшим фактором патогенеза широкого круга заболеваний человека [4–6]. В связи с этим растет интерес к изучению функциональной активности иммунокомпетентных клеток на основании определения показателей спонтанной и индуцированной продукции ими цитокинов. Результаты оценки спонтанной продукции цитокинов *ex vivo* позволяют оценить активацию клеток крови в организме обследуемого пациента, а индуцированная митогеном продукция – их потенциальную способность к секреции цитокинов.

В последние годы для восстановления функций иммунной системы все чаще стали использовать препараты природного происхождения. Среди веществ, способных восстанавливать функциональную активность иммунокомпетентных клеток, особое место отводится природным полисахаридам, которые могут не только модулировать различные свойства иммунной системы, но и обладают энтеросорбционными свойствами. К таким веществам относятся полисахариды бурых водорослей, в частности альгиновая кислота и ее соли [1, 2, 9–11]. Альгинаты состоят из остатков гулуруновой и мануруновой кислот, соединенных между собой 1→4 связью. В последние годы появились экспериментальные данные о наличии у этих соединений фармакологической активности [1, 7].

Целью работы явилась оценка влияния альгината натрия, выделенного из бурой водоросли *Laminaria japonica*, на спонтанную и индуцированную липополисахаридом (ЛПС) продукцию фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и интерлейкинов (ИЛ) 2 и 6 иммунокомпетентными клетками крови.

Материал и методы. Работа проводилась на базе Медицинского объединения ДВО РАН (г. Владивосток). Альгинат натрия с молекулярной массой 403 кДа получен в лаборатории фармакологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Материалом для исследования послужила гепаринизированная кровь 16 здоровых доноров. Способность альгината натрия индуцировать продукцию ФНО- α , ИЛ-2 и ИЛ-6 в опытах *in vitro* была определена на основе методики J. Bienvenu *et al.* [8]: кровь разводили (1:5) стерильной средой 199 с добавлением 2 мМ L-глутамин (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина. Для оценки спонтанной продукции цитокинов по 100 мкл разведенной крови в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл разведенной крови. Для оценки индуцированной продукции цитокинов кровь вносили в лунки планшетов, содержащих в различных концентрациях (от 1 нг/мл до 10 мкг/мл): 1) по 100 мкл раствора ЛПС *E. coli* (Sigma); 2) по 100 мкл раствора альгината натрия; 3) по 100 мкл раствора альгината натрия и ЛПС (50+50 мкл). Планшеты культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂, с использованием инкубатора Galaxy 14S (Германия), после чего отбирали супернатанты и определяли концентрацию цитокинов методом твердофазного иммуноферментного анализа коммерческими тест-системами «Протеиновый контур» – для ИЛ-2 и ИЛ-6 и «Цитокин» – для ФНО- α . Учет результатов проводили при длине волны 450 нм с использованием микропланшетного фотометра μ Quant BioTek (США).

Чтобы уточнить действие альгината натрия на intactные клетки, был проведен анализ расчетных коэффициентов продукции цитокинов в присутствии исследуемого вещества относительно их спонтанной продукции. Используя уровни спонтанной и индуцированной продукции, вычисляли ряд индексов. Индекс стимуляции митогенами рассчитывали как отношение показателей индуцированного ЛПС синтеза цитокинов к спонтанной продукции. Индекс влияния альгината натрия на продукцию цитокинов вычисляли как отношение синтеза под влиянием альгината натрия и индуцированной ЛПС секреции цитокина при инкубации

Таблица

Показатели индекса стимуляции (ИС) митогеном – ЛПС и индекса влияния (ИВ) альгината натрия на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов.

| Концентрация индуктора | ИС ИЛ-2 | | | ИС ИЛ-6 | | | ИС ФНО-α | | |
|------------------------|------------|------------|--------------|------------|-----------|--------------|------------|-----------|--------------|
| | ЛПС | альгинат | ЛПС+альгинат | ЛПС | альгинат | ЛПС+альгинат | ЛПС | альгинат | ЛПС+альгинат |
| 1 нг/мл | 9,85±0,16 | 6,85±0,18 | 7,16±0,14 | 17,73±0,80 | 2,65±0,09 | 22,55±1,03 | 27,71±0,57 | 2,74±0,24 | 27,36±0,56 |
| 10 нг/мл | 10,67±0,15 | 9,75±0,16 | 9,98±0,24 | 18,49±0,83 | 2,84±0,08 | 22,33±1,03 | 30,33±0,75 | 3,02±0,31 | 33,06±0,71 |
| 100 нг/мл | 11,59±0,16 | 10,62±0,14 | 11,56±0,17 | 19,32±0,85 | 3,34±0,11 | 23,19±1,06* | 31,48±0,65 | 3,17±0,29 | 37,42±0,64 |
| 1 мкг/мл | 12,77±0,14 | 13,48±0,16 | 15,13±0,14 | 23,93±1,09 | 4,16±0,14 | 24,50±1,10* | 36,43±0,87 | 3,57±0,31 | 40,77±0,93 |
| 10 мкг/мл | 15,43±0,15 | 14,09±0,16 | 15,54±0,13 | 25,23±1,08 | 4,65±0,14 | 27,15±1,24* | 44,04±0,85 | 4,01±0,29 | 46,13±1,10* |

* Увеличение индекса влияния альгината натрия статистически значимо по сравнению с индексом стимуляции ЛПС.

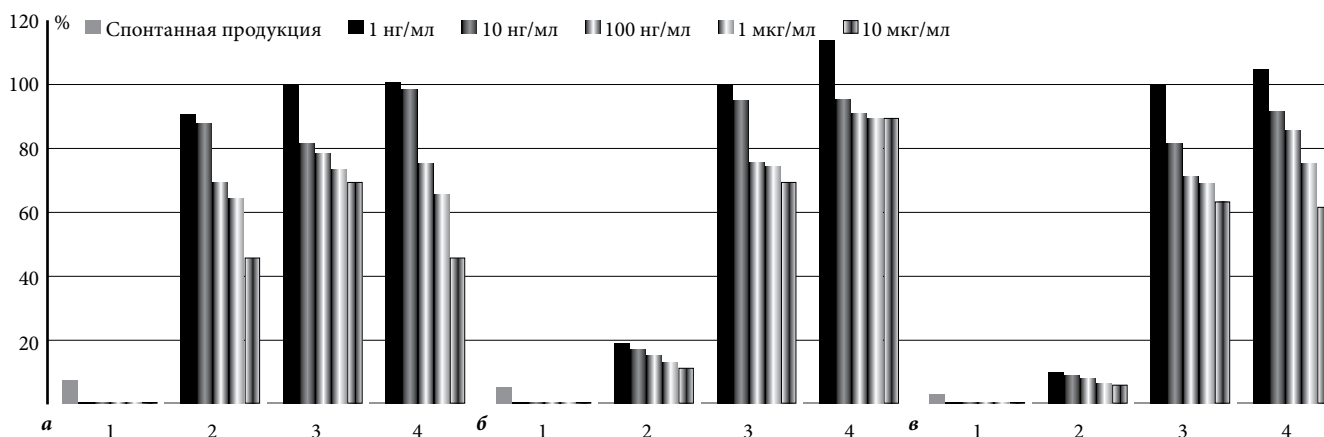


Рис. 1. Продукция цитокинов под влиянием альгината натрия, индуцированная ЛПС и ЛПС с добавлением альгината натрия: а – ИЛ-2, б – ИЛ-6, в – ФНО-α; 1 – контроль, 2 – альгинат натрия, 3 – ЛПС, 4 – ЛПС и альгинат натрия.

с альгинатом натрия к показателю спонтанной продукции цитокина без альгината натрия [3]. Для оценки способности альгината натрия активировать иммунокомпетентные клетки и вызывать синтез ими цитокинов в качестве контроля использовали известный митоген – ЛПС, цитокинпродуцирующая активность которого была принята за 100 %.

Результаты исследований представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 6.0 по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Альгинат натрия сам по себе обладал существенной способностью активировать синтез ИЛ-2 (спонтанная продукция для ИЛ-2 составила $31,75 \pm 0,44$ пг/мл, или 7 % от активности ЛПС). В то же время его активность в отношении синтеза ИЛ-6 и ФНО-α была менее значительна: для ИЛ-6 – $19,47 \pm 1,15$ пг/мл, 4 % от активности ЛПС; для ФНО-α – $24,31 \pm 0,65$ пг/мл, 2,3 % от активности ЛПС (рис.).

При взаимодействии с мононуклеарами периферической крови альгинат натрия инициировал синтез ИЛ-2 на уровне, соизмеримом с известным индуктором активации цитокинов – ЛПС. Достоверных различий между стимуляцией ЛПС и альгинатом натрия не выявлено. При высокой концентрации (1 мкг/мл) альгинат натрия усиливал синтез ИЛ-2, индуцированного ЛПС,

в то время как в низких дозах (1 нг/мл) незначительно ингибировал действие ЛПС (табл.).

Альгинат натрия оказался слабым индуктором ИЛ-6 по сравнению с ЛПС, однако при всех концентрациях просматривалась тенденция к усилению ЛПС-индуцированного синтеза ИЛ-6 (достоверно при концентрациях 100 нг/мл, 1 и 10 мкг/мл, табл.).

В отношении ФНО-α без индукторов альгинат натрия обладал незначительной цитокинпродуцирующей активностью, однако при всех концентрациях полисахарид усиливал его ЛПС-индуцированную продукцию (достоверно при концентрации 10 мкг/мл), при остальных же концентрациях наблюдалась лишь тенденция к увеличению продукции ФНО-α, кроме того, при концентрации 1 нг/мл происходило незначительное угнетение синтеза этого цитокина (табл.).

Таким образом, экспериментальные данные показали, что альгинат натрия обладает концентрационно-зависимым цитокинпродуцирующим действием, поскольку способен влиять на клетки моноцитарно-макрофагального звена, модулируя продукцию цитокинов. Так как развитие любого иммунного ответа начинается с клеток моноцитарно-макрофагальной системы и цитокины, продуцируемые моноцитами/макрофагами, обладают плеiotропным эффектом, можно предположить, что усиление под влиянием альгината натрия их функциональной активности ведет к активации и клеточного, и гуморального иммунитета.

Работа поддержана грантом ДВО РАН по проблеме «Фундаментальные и прикладные исследования в интересах медицины».

References

1. Vorobev V.V. Creation of bioactive pharmaceutical substances and drugs from marine aquatic, *Vestnik biotekhnol.* 2009. V. 4, no. 1. P. 33–38.
2. Ermak I.M., Davydova V.N., Aminin D.L. et al. Immunomodulatory activity of carrageenan from the red algae of the Far Eastern seas, *Pacific Medical Journal.* 2009. No. 3. P. 40–44.
3. Zurochka V.A., Dolgushin I.I., Simbircev A.S. Effect of immunomodulator «Bestim» in vitro on spontaneous and induced production of cytokines IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10 immune cells of blood of healthy individuals, *Citokiny i vospalenie.* 2007. Vol. 6. no.1. P. 31–35.
4. Cytokine and respiratory diseases / eds. B.I. Gelcera, E.V. Prosekoj. Vladivostok: Dalnauka, 2005. 256 p.
5. Totoljan A.A., Frejdlin I.S. The cells of the immune system, Vol. 1, 2. SPb.: Nauka, 2000.
6. Haitov R.M., Ignateva G.A., Sidorovich I.G. Immunology. M.: Medicina, 2002. 536 p.
7. Hotimchenko M.Ju., Sonina L.N. The effectiveness of calcium alginate in toxic liver damage of rats, *Pacific Medical Journal.* 2006. No. 4. P. 27–31.
8. Bienvenu J., Doche C., Gutowski M. et. al. Production of proinflammatory cytokines a cytokines involved in the TH1/TH2 balance is modulated by pentoxifylline, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995. Vol. 25. P. 80–84.
9. Kilpatric D.C. Immunological aspects of the potential role of dietary carbohydrates and lectins in human health, *Eur. J. Nutr.* 1999. Vol. 38. P. 107–117.
10. Lahaye M., Kaeffer B. Seaweed dietary fibres: structure, physicochemical and biological properties relevant to intestinal physiology, *Sciences and Aliments.* 1997. Vol. 17. P. 563–584.
11. Rosha de Souza M.C., Marques C.T., Guerra Dore C.M. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds, *Journal of Applied Physiology.* 2007. Vol. 19. P. 153–160.

Поступила в редакцию 25.03.2011.

EFFECT OF SODIUM ALGINATE ON SPONTANEOUS AND INDUCED CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS IN VITRO

N. V. Sergeeva¹, L.N. Bogdanovich¹, Yu.S. Khotimchenko²

¹Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russian Federation), ²Institute of Marine Biology (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation)

Summary – The paper describes effects of sodium alginate on the spontaneous and induced cytokine production (interleukin 2 and 6 and tumour necrosis factor- α) by peripheral blood mononuclear cells of 16 healthy donors. As reported, the sodium alginate appears to have considerable concentration-dependent cytokine-induced action on interleukin 2 and weak action on interleukin 6 and tumour necrosis factor- α .

Key words: sodium alginate, mononuclear cells, cytokines.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 35–37.

УДК 615.322:577.114:582.272

ПРЕБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS EVANESCENS* И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Т.А. Кузнецова¹, Т.С. Запорожец¹, И.Д. Макаренкова¹, Н.Ф. Тимченко¹, Н.Н. Беседнова¹, Т.Н. Звягинцева², Н.М. Шевченко², Н.В. Мандракова³, В.Г. Мельников⁴

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159), ³Владивостокский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

⁴Международный научно-технический центр (127473 г. Москва, ул. Краснопролетарская, 32–34, а/я 20)

Ключевые слова: пребиотики, продукты функционального питания, фукоидан, альгинат.

Проведено исследование пребиотического потенциала полисахаридов (ПС) из бурой водоросли *Fucus evanesens* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что сульфатированный полисахарид фукоидан и низкомолекулярная альгиновая кислота способствуют усилению роста и накопления биомассы бифидобактерий, т.е. проявляют пребиотическую активность. На модели экспериментального лекарственного дисбактериоза у мышей, получавших эти ПС в составе кисломолочного напитка с бифидобактериями, выявлено восстановление количественного и качественного состава кишечной микрофлоры. Наличие пребиотической активности открывает перспективы для включения исследуемых ПС в состав продуктов функционального питания, биологически активных добавок к пище и синбиотических препаратов для коррекции нарушений микробиотоза у человека.

Большой интерес при разработке лекарственных препаратов и продуктов функционального питания,

Кузнецова Татьяна Алексеевна – д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: +7 (423) 244-24-46; e-mail: takuznets@mail.ru

предназначенных для коррекции нарушений микробиотоза у человека, представляют биологически активные вещества, наделенные свойствами пребиотиков. Вещества могут быть классифицированы как пребиотики, если обладают следующими свойствами: не расщепляются пищеварительными ферментами в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, в неизменном виде достигают толстого кишечника, селективно ферментируются его микрофлорой, стимулируют активный рост бифидобактерий, лактобактерий и других полезных микроорганизмов [14, 15].

В качестве пребиотиков выступают растворимые пищевые волокна – углеводоподобные соединения (полисахариды, олигосахариды), обычно связанные с растительными веществами и составляющие клеточные стенки растений (съедобных злаков, корнеплодов, фруктов, водорослей). Значительный интерес представляют бурые водоросли, которые богаты пищевыми волокнами: 25–75 % от сухого веса, при этом

около 50–85 % приходится на растворимые пищевые волокна [7, 13].

В бурых водорослях содержатся ламинараны, альгинаты, фукоиданы, которые широко используются в качестве составляющих в продуктах функционального питания и лекарственных препаратах. Именно эти полисахариды (ПС) и их производные обладают огромным пребиотическим потенциалом [7, 13].

Объектом нашего исследования явились ПС фукоидан и альгиновая кислота, выделенные из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens*. Ранее нами показано, что фукоидан из этой водоросли обладает широким спектром биологической активности, включая антикоагулянтную, иммуномодулирующую, противоопухолевую, антибактериальную, антивирусную, липидемическую и др. [1].

Целью настоящей работы послужил анализ пребиотической активности фукоидана и альгиновой кислоты из бурой водоросли *Fucus evanescens* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы. Фукоидан (сульфатированный полисахарид) из бурой водоросли Охотского моря *F. evanescens* является 1→3;1→4- α -L-фуканом с молекулярной массой 20–40 кДа, его моносахаридный состав представлен фукозой, галактозой, ксилозой, глюкозой в соотношении 71:9:10:8. Низкомолекулярная альгиновая кислота является сополимером β -D-маннуроновой и α -L-гулууроновой кислот в соотношении 4:1. В качестве пробиотика использованы производственные штаммы *Bifidobacterium longum* V379M и *Bifidobacterium bifidum* 791.

Исследование пребиотических свойств биологически активных веществ проводили с использованием кинетических моделей роста микроорганизмов фотометрическим методом [2] путем оценки их влияния на динамику роста и размножения бифидобактерий при культивировании в гидролизатно-молочной (ГМ) среде *in vitro*. Эксперименты осуществляли в двух вариантах:

1) в качестве углеводной основы питательной среды ГМ для культивирования бифидобактерий использовали лактозу с известным составом редуцирующих сахаров, а также дополнительно вносили фукоидан или альгинат либо их композицию;

2) в качестве углеводной основы питательной среды для культивирования бифидобактерий вместо лактозы использовали фукоидан, альгинат либо их композицию.

В серии предварительных экспериментов были отработаны оптимальные для обогащения среды ГМ концентрации фукоидана и альгиновой кислоты, которые составили 2 и 1 мг/мл соответственно. Во втором варианте концентрация ПС составляла по 8 мг/мл, что соответствует количеству лактозы согласно прописи приготовления среды ГМ. Контролем служила среда с лактозой в качестве источника углеводов. Все среды стерилизовали и параллельно засеивали культурой бифидобактерий в количестве 10 % от общего объема среды.

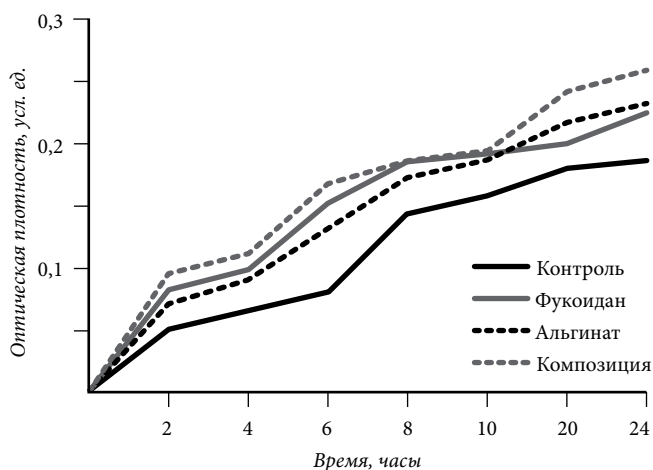


Рис. 1. Динамика роста штамма *B. bifidum* 791 на среде ГМ, обогащенной ПС из *F. evanescens*.

Пробы отбирали через 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 и 24 часа и анализировали по показателям оптической плотности, которую измеряли при 540 нм на Multiscan RC (Labsystems). Опыт ставили в триплетах. Вычисляли среднюю оптическую плотность для контроля и опыта. Количество живых бифидобактерий в КОЕ/г (lg) после культивирования в бифидум-среде определяли методом серийных разведений. Модель экспериментального лекарственного дисбактериоза воспроизводили путем внутрибрюшинного введения антибиотика гентамицина неинbredным белым мышам. С лечебной целью животные опытной группы получали двукратно перорально в течение 1 месяца (начиная с 1-го дня от введения антибиотика) кисломолочный напиток с бифидобактериями, обогащенный ПС из *F. evanescens*. У мышей проводили микробиологическое исследование кала с определением видового состава и количественного уровня основных микробных популяций в динамике.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 7. Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты исследования. Сравнительный анализ показателей оптической плотности, характеризующих процесс культивирования бифидобактерий на контрольной и опытной (обогащенной ПС) средах, свидетельствовал о том, что нарастание биомассы происходило пропорционально времени культивирования при отсутствии выраженной лаг-фазы – периода между посевом культуры бактерий и началом ее размножения (рис. 1). При внесении ПС показатели оптической плотности на сроках исследования от 4 часов и во все последующие сроки были значимо выше по сравнению с контролем. Также значительно возрастал конечный выход биомассы бифидобактерий. Через 24 часа культивирования на среде, обогащенной ПС, содержание бифидобактерий при внесении фукоидана составляло $8,5 \pm 0,3 \times 10^9$ КОЕ/г, альгината – $11,5 \pm 0,4 \times 10^9$ КОЕ/г;

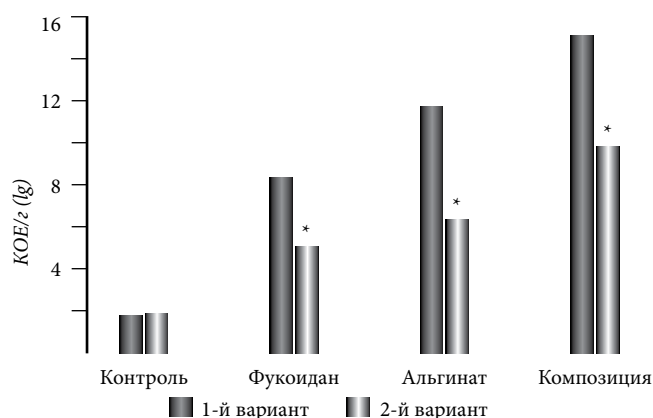


Рис. 2. Содержание бифидобактерий через 24 часа культивирования:

1-й вариант – обогащение ПС среды ГМ; 2-й вариант – использование ПС вместо лактозы. * Разница с 1-м вариантом статистически значима.

композиции – $15 \pm 0,8 \times 10^9$ КОЕ/г, что было значимо выше, чем в контроле, где содержание бифидобактерий составило $1,66 \pm 0,3 \times 10^9$ КОЕ/г (рис. 2).

На рис. 3 представлены кривые роста бифидобактерий на модифицированной среде ГМ, где вместо лактозы использовали фукоидан, альгинат либо их композицию. При внесении ПС динамика роста бифидобактерий несколько изменялась по сравнению с контролем: период постепенного (экспоненциального) роста сменялся значительным усилением роста (через 8 часов от начала культивирования), что проявлялось в виде скачка на кривой. Конечный выход биомассы бифидобактерий увеличивался в 3–5,8 раза. Так, на ГМ среде с лактозой этот показатель составил $1,75 \pm 0,25 \times 10^9$ КОЕ/г, на среде с фукоиданом возрастал до $5,3 \pm 0,3 \times 10^9$ КОЕ/г, а на среде с альгинатом – до $6,5 \pm 0,3 \times 10^9$ КОЕ/г, при использовании же их композиции он увеличивался до $9,75 \pm 0,85 \times 10^9$ КОЕ/г (рис. 2).

Таким образом, в экспериментах *in vitro* мы показали, что обогащение питательной среды фукоиданом и альгинатом стимулирует рост бифидобактерий. Выход биомассы при этом увеличивался в 5,3–9,4 раза. При использовании в качестве углеводной основы питательной среды для культивирования бифидобактерий фукоидана и альгината вместо лактозы выход биомассы увеличивался в 3,0–5,8 раза.

При экспериментальном дисбактериозе изменения состава кишечной микрофлоры у мышей соответствовали I–II степени дисбактериоза и сопровождалась значительным снижением количества бифидобактерий ($3,6 \pm 1,6 \times 10^6$ /г) по сравнению с исходным ($1,44 \pm 0,48 \times 10^8$ /г). Также отмечалось снижение количества лактобактерий ($5,2 \pm 3,4 \times 10^5$ /г, исходно – $3,8 \pm 1,5 \times 10^6$ /г) и энтерококков ($1,2 \pm 0,3 \times 10^6$ /г, исходно – $6,0 \pm 1,5 \times 10^6$ /г). Обращало на себя внимание увеличение содержания бактерий рода *Clostridium* ($3,9 \pm 0,4 \times 10^5$ /г, исходно – $1,3 \pm 0,3 \times 10^4$ /г) и рода *Proteus* ($7,8 \pm 0,3 \times 10^7$ /г, у интактных мышей – $2,1 \pm 0,3 \times 10^6$ /г).

У мышей, получавших с лечебной целью напиток, после месячного курса лечения выявлено

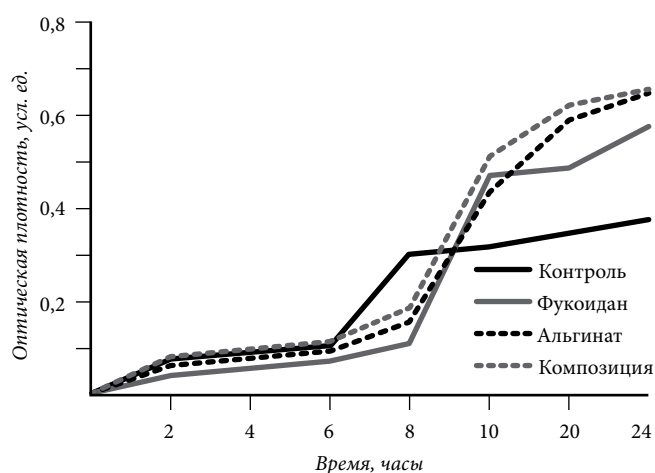


Рис. 3. Динамика роста штамма *B. bifidum* 791 на среде ГМ, содержащей разные источники углеводов.

статистически значимое повышение содержания бифидо- ($1,9 \pm 0,4 \times 10^{10}$ /г) и лактобактерий ($7,4 \pm 0,3 \times 10^8$ /г), а также снижение содержания условно-патогенной микрофлоры в кишечнике. В частности, наблюдалась элиминация *Staphylococcus saprophyticus*, исходно присутствующего в кишечнике, и бактерий рода *Proteus*, содержание которых в отсутствие лечения, наоборот, возрастало.

Обсуждение полученных данных. Основным компонентом питания бифидо- и лактобактерий являются углеводы (моно-, олиго-, полисахариды). Ферментация углеводов анаэробными микроорганизмами осуществляется с помощью набора гликозидаз (гликозилгидролаз) и лиаз с образованием короткоцепочечных жирных кислот (преимущественно уксусной и молочной и др). Подавляющее большинство бифидобактерий демонстрируют наличие галактозидаз, глюкозаминидаз, ксилозидаз, маннозидаз и др. Ключевым ферментом в метаболизме углеводов бифидобактериями является фруктозо-6-фосфатаза [4, 6]. У некоторых видов бифидобактерий (*B. bifidum*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. breve*) выявлена продукция фукозидазы – фермента, расщепляющего фукозу (структурного компонента фукоиданов) [3, 12]. Благодаря наличию этого фермента, олигосахариды фукоидана и альгината ферментируются кишечной микрофлорой *in vitro*, стимулируют рост бифидо- и лактобактерий, что свидетельствует об их пребиотических потенциях [8, 10, 11].

Что касается эффектов *in vivo* (полученных при кормлении животных препаратами или водорослевыми экстрактами, содержащими фукоидан, ламинаран, альгинат), то эти результаты варьируют. Это связано как со структурными характеристиками исследуемых ПС, так и с другими особенностями проведения экспериментов. Если отдельные авторы не выявили положительного эффекта, то в подавляющем большинстве работ показано нормализующее и стимулирующее действие диетических добавок или экстрактов водорослей, содержащих альгинат

или фукоидан, на состав кишечной микрофлоры [5, 8, 9]

Наши исследования показали, что фукоидан и альгинат из *F. evanescens* стимулируют рост и накопление биомассы бифидобактерий при их культивировании на питательной среде, обогащенной фукоиданом, альгинатом либо их композицией, а также на среде, где эти ПС использовали вместо лактозы. Данные, касающиеся второго варианта наших экспериментов, косвенно свидетельствуют об активном усвоении бифидобактериями исследуемых ПС. Последние, по всей вероятности, служат для них источником углерода и энергии. Таким образом, фукоидан и альгинат из *F. evanescens* проявляют пребиотическую активность, свойственную пищевым волокнам.

Примечательно, что эффект композиции «фукоидан–альгинат» на накопление биомассы бифидобактерий был значимо выше, чем при обогащении питательной среды только фукоиданом, что свидетельствует о синергизме пребиотического эффекта этих полисахаридов.

Пребиотический потенциал исследуемых ПС, проявляющийся нормализацией состава кишечной микрофлоры, подтвержден нами и в экспериментах *in vivo* на модели лекарственного дисбактериоза у мышей.

Наличие пребиотической активности у ПС из *F. evanescens* открывает перспективы для их включения в состав продуктов функционального питания, биологически активных добавок к пище и синбиотиков (препаратов, полученных в результате рациональной комбинации про- и пребиотиков) для коррекции нарушений микробиоценоза у человека.

*Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ №4000 от 01.05.2010 г. «Клинико-иммунологическая эффективность нового синбиотического продукта категории функционального питания (кисломолочный напиток с *V. bifidum*, обогащенный полисахаридами из бурой водоросли *Fucus evanescens*)», а также при поддержке гранта РФФИ 09-04-00761 и программы РАН «Клеточная и молекулярная биология».*

Литература

References

1. Zaporozhec T.S., Kuznecova T.A., Smolina T.P. et al. Immunotropic and anticoagulant properties of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens*: perspectives of approach in medicine, *Zhurn. mikrobiol.* 2006. No. 3. P. 54–58.
2. Skala L.Z., Nehorosheva A.G., Vinokurov A.E., Lukin I.N. Up-to-date technology in clinical microbiology and chemotherapy. Automated workplace of microbiologist, epidemiologist and chemotherapist, *Klin. lab. diagnostika.* 2001. no. 12. P. 25–32.
3. Ashida H., Miyake A., Kiyohara M. et al. Two distinct alpha-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates, *Glycobiology.* 2009. Vol. 19. P. 1010–1017.
4. Goderska K., Nowak J., Czarnecki Z. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplement with selected saccharides including prebiotics, *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2008. Vol. 7, No. 2. P. 5–20.
5. Janczyk P., Pieper R., Smidt H., Souffrant W.B. Effect of alginate and inulin on intestinal microbial ecology of weanling pigs reared under different husbandry conditions, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2010. Vol. 72. P. 132–142.

6. Jedrzejak M.J. Structural and functional comparison of polysaccharide-degrading enzymes, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2000. Vol.35, No. 3. P. 221–251.
7. Jimenez-Escrig A., Sanchez-Muniz F.J. Dietary fiber from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism, *Nut. Res.* 2000. Vol. 20. P. 585–598.
8. Kuda T., Yano T., Matsuda N., Nishizawa M. Inhibitory effects of laminaran and low molecular alginate against the putrefactive compounds produced by intestinal microflora *in vitro* and in rats, *Food Chem.* 2005. Vol. 91. P. 745–749.
9. Lynch M.B., Sweeney T., Callan J.J. et al. The effect of dietary Laminaria-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs, *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2010. Vol. 90, No. 3. P. 430–437.
10. Marzorati M., Verhelst A., Luta G. et al. *In vitro* modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements, *Int. J. Food Microbiol.* 2010. Vol. 139. P. 168–176.
11. Michel C., Benard C., Lahaye M. et al. Algal oligosaccharides as functional foods: *in vitro* study of their cellular and fermentative effects, *Food Sci.* 1999. Vol. 19. P. 311–332.
12. Nagae M., Tsuchiya A., Katayama T. et al. Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2-alpha-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*, *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. P. 18497–18509.
13. O'Sullivan L., Murphy B., McLoughlin P. et al. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications, *Mar. Drugs.* 2010. Vol. 8. P. 2038–2064.
14. Roberfroid M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition.* 2000. Vol. 71, No. 6. P. 1682–1687.
15. Tungland B.C., Meuer D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food, *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety.* 2002. Vol., No. 3. P. 73–92.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

PREBIOTIC PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES FROM BROWN SEAWEED *FUCUS EVANESCENS* AND PERSPECTIVES FOR CLINICAL USING

T.A. Kuznetsova¹, T.S. Zaporozhetz¹, N.N. Besednova¹, I.D. Makarenkova¹, N.F. Timchenko¹, T.N. Zvyagintseva², N.M. Shevchenko², N.V. Mandrakova³, V.G. Melnikov⁴

¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ²Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch of the Russian Academy of Science (159 100 Ann. of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia), ³Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), ⁴International Science and Technology Center (20 box 32–34 Krasnoproletarskaya St. Moscow 127473 Russia)

Summary – The prebiotic potential of polysaccharides (PS) from brown seaweed *Fucus evanescens* were studied *in vitro* and *in vivo* experiments. We established that fucoidan and alginic acid stimulate the growth and accumulation of bifidobacteria biomass, i.e. these PS possess prebiotic activity. We revealed the restoration of quantitative and qualitative composition of intestinal microflora (increasing content of bifido- and lactobacteria, typical *Escherichia coli* and reduction of opportunistic microflora) in mice with antibiotic-induced dysbiosis, treated with fermented by bifidobacteria and enriched with these PS milk. The presence of prebiotic activity opens the perspectives for inclusion of this PS to products of functional food, dietary supplements and sinbiotic preparations for the correction of human's microbiota disorders.

Key words: prebiotics, products of functional food, fucoidan, alginate.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 37–40.

УДК 616.36-003.826-085.244:615.322:582.272

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ФУКОИДАНА В КАЧЕСТВЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО СРЕДСТВА ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

Н.В. Бивалькевич, Ю.К. Караман

Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения (690105 г. Владивосток, ул. Русская, 73г)

Ключевые слова: фукоидан, жировая болезнь печени, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита.

Исследовано влияние фукоидана на гистологическое строение печени, липидный спектр крови, систему «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» у крыс с диетиндуцированной неалкогольной жировой болезнью печени. Выявлены гепатопротекторные, гиполипидемические и детоксикационные свойства фукоидана, что является обоснованием его применения при неалкогольной жировой болезни печени.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – диагноз, прочно занявший место в ряду наиболее частых поражений гепатобилиарной системы. Патогенетической основой этого заболевания являются алиментарные факторы (избыточное потребление жиров), окислительный стресс, инсулинорезистентность, хроническое воспаление [4, 5]. Терапия неалкогольной жировой болезни печени включает комплекс мероприятий, направленных на уменьшение выраженности жировой инфильтрации, воспаления и некроза гепатоцитов. Коррекция образа жизни, гипокалорийная диета и медикаментозная терапия – три основных направления лечения данной патологии [4, 8, 9].

При всем многообразии медикаментозных средств продолжается поиск новых препаратов и биологически активных добавок к пище с хорошей эффективностью и минимальными побочными эффектами. В этом отношении перспективным методом лечения НАЖБП может быть применение биологически активных веществ из морских гидробионтов. Многочисленные исследования последних 10–15 лет посвящены биологическому действию фукоиданов – натуральных полисахаридов из бурых водорослей. В литературе имеются данные о противоопухолевых, иммуномодулирующих, антибактериальных, антивирусных, противовоспалительных эффектах этих соединений [6, 7, 11]. Биологически активные вещества, входящие в состав фукоиданов, обладают антиоксидантными свойствами [10]. Поскольку основным патологическим звеном НАЖБП является окислительный стресс, предполагается использование препарата поли- и моносахаридов из бурой водоросли в коррекции данного заболевания.

Цель исследования – проанализировать влияние фукоиданов на гистологическое строение печени, липидный спектр крови, систему «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» на экспериментальной модели неалкогольной жировой болезни печени у крыс.

Бивалькевич Наталья Владимировна – м.н.с. лаборатории биомедицинских исследований НИИ МКВиВЛ; e-mail: lbmi@yandex.ru

Материал и методы. Предметом исследований явился биопрепарат «Фукоидан» из бурой водоросли *Laminaria japonica*, предоставленный ТИПРО-центром. По составу моносахаридов он относится к типу сульфатированных фукоиданов, содержит маннозу, фукозу, ксилозу, галактозу и комплекс макроэлементов (калий, кальций, натрий, магний).

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар, которые с целью моделирования неалкогольной жировой болезни печени в течение 30 суток получали высококалорийный рацион, содержащий 19 % говяжьего сала и 2 % холестерина от общей массы [2].

Было выделено 4 группы животных по 10 особей в каждой: контроль – интактные крысы, находившиеся на стандартном рационе вивария; опыт-1 – крысы с моделью неалкогольной жировой болезни печени; опыт-2 – крысы с неалкогольной жировой болезнью печени, переведенные на стандартный рацион питания в течение 30 суток; опыт-3 – крысы с неалкогольной жировой болезнью печени, получавшие фукоидан на фоне стандартного рациона. Фукоидан вводили интрагастрально в течение 30 дней, суточную дозу препарата рассчитывали по содержанию калия, исходя из средневзвешенных норм его физиологической потребности для человека средней массой 60 кг (МУК 2.3.2.721–98), которая составляла 5 г в сутки. В перерасчете на крысу средней массой 250 г вводимая доза равнялась 415 мг в сутки.

Животных выводили из опыта утром натощак путем декапитации под эфирным наркозом в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС. Материалом исследования явились кровь из шейной вены и ткань печени. Гистоструктуру ткани печени изучали на парафиновых срезах толщиной 7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином [3].

Исследовали липидный спектр сыворотки крови: уровень общего холестерина (ХС), триглицеридов, ХС липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности, индекс атерогенности. Функциональную активность печени изучали по уровню аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Определяли содержание общего белка в сыворотке крови.

Состояние системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» характеризовали по

интегральному показателю антиоксидантной активности в плазме крови, количеству образовавшихся продуктов липопероксидации в крови и печени (малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов) [1].

Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Гистологическое исследование печени крыс, содержащихся на высокожировом рационе (опыт-1), показало нарушение балочной структуры печеночных долек (рис., а). Гепатоциты плотно прилегали друг к другу, что приводило к сужению просветов синусоидных капилляров. В значительной части печеночных клеток имелись признаки дистрофии: увеличение размеров и изменение формы клеток, нарушение четкости границ ядра в сочетании со сниженной базофилией и крупнокапельной вакуолизацией цитоплазмы. Воздействие высокожирового рациона у крыс группы «опыт-1» способствовало формированию алиментарной дислипидемии, проявляющейся повышением уровня общего ХС, триглицеридов, ХС липопротеидов очень низкой плотности, снижением ХС липопротеидов высокой плотности (табл.). Нарушение функциональной активности печени характеризовалось повышением

активности трансаминаз, снижением уровня общего белка в плазме крови. Развитие неалкогольной жировой болезни печени сопровождалось накоплением в крови и тканях печени первичных и конечных продуктов липопероксидации. Установлено незначительное повышение активности антиоксидантной системы у крыс, содержащихся на высокожировом рационе.

Таким образом, высококалорийная нагрузка в течение 30 суток способствовала развитию стеатоза печени, формированию алиментарной дислипидемии и интенсификации процессов перекисного окисления, что характеризовало наличие неалкогольной жировой болезни печени.

Отмена высокожирового рациона (опыт-2) не способствовала самовосстановлению гистоструктуры печени. Архитектоника печеночных долек была нарушена, отмечалась гипертрофия гепатоцитов с крупнокапельной вакуолизацией (рис., б). Изучение липидного спектра сыворотки крови у крыс этой группы показало сохранение гиперлипидемии: отмечалось повышенное содержание общего ХС, триглицеридов, ХС липопротеидов низкой и очень низкой плотности и снижение количества ХС липопротеидов высокой плотности, при этом индекс атерогенности увеличился более чем в 4 раза по сравнению с показателем контроля. Активность трансаминаз была повышена. Уровень общего белка в крови сохранялся на уровне

Таблица

Влияние фукоидана на метаболические параметры крови и печени при НАЖБП ($M \pm m$)

| Показатель ¹ | Контроль | Опыт-1 | Опыт-2 | Опыт-3 |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| ОХС, ммоль/л | 1,57±0,04 | 3,34±0,04 ² | 2,49±0,23 ² | 1,65±0,08 ³ |
| ТГ, ммоль/л | 1,12±0,04 | 1,95±0,06 ² | 2,36±0,12 ² | 0,74±0,06 ^{2, 3} |
| ХС ЛПВП, ммоль/л | 0,67±0,04 | 0,26±0,02 ² | 0,42±0,03 ^{2, 3} | 0,77±0,03 ^{2, 3} |
| ХС ЛПНП, ммоль/л | 0,70±0,06 | 0,84±0,09 ² | 0,99±0,04 ² | 0,50±0,02 ³ |
| ХС ЛПОНП, ммоль/л | 0,65±0,09 | 1,14±0,09 ² | 1,07±0,05 ² | 0,33±0,03 ^{2, 3} |
| ИА | 1,34±0,15 | 11,87±1,55 ² | 4,92±0,55 ² | 1,14±0,11 ^{2, 3} |
| Общий белок, г/л | 67,66±1,56 | 57,82±0,68 ² | 58,34±1,16 | 63,83±1,29 ³ |
| АЛТ, ммоль/л | 52,20±3,50 | 108,90±3,50 ² | 85,20±2,85 ^{2, 3} | 61,00±7,62 ³ |
| АСТ, ммоль/л | 118,68±6,10 | 243,16±9,10 ² | 156,25±36,89 ³ | 126,00±7,91 ³ |
| АСТ/АЛТ | 2,27±0,10 | 2,23±0,09 | 1,83±0,05 ^{2, 3} | 2,06±0,11 |
| АОА, % | 57,30±4,52 | 58,30±4,23 | 56,61±1,74 | 55,2±10,96 |
| МДА (эритроциты), мкмоль/г | 5,50±0,28 | 9,50±2,75 ² | 6,88±0,32 ³ | 7,34±0,27 ³ |
| МДА/АОА | 0,16±0,04 | 0,16±0,19 | 0,12±0,01 | 0,13±0,04 |
| ГПЛ, усл. ед. | 0,55±0,02 | 1,12±0,48 ² | 1,18±0,01 ² | 0,82±0,05 ^{2, 3} |
| МДА (печень), нмоль/г | 0,74±0,18 | 2,43±0,33 ² | 2,68±0,16 ² | 1,77±0,43 ^{2, 3} |
| ГПЛ (печень), ЕОП/г | 0,41±0,04 | 0,25±0,05 ² | 0,65±0,04 ^{2, 3} | 0,13±0,01 ^{2, 3} |
| ДК (печень), ЕОП/мг липидов | 1,33±0,11 | 1,85±0,16 ² | 3,66±0,18 ^{2, 3} | 1,68±0,14 ² |

¹ ОХС – общий ХС; ТГ – триглицериды; ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП – липопротеиды высокой, низкой и очень низкой плотности соответственно; ИА – индекс атерогенности: (ОХС–ХС ЛПВП)/ХС ЛПВП; АОА – антиоксидантная активность; МДА – малоновый диальдегид; ГПЛ – гидроперекиси липидов (плазма крови); ДК – диеновые конъюгаты.

² Разница с контролем статистически значима.

³ Разница с группой «опыт-1» статистически значима.

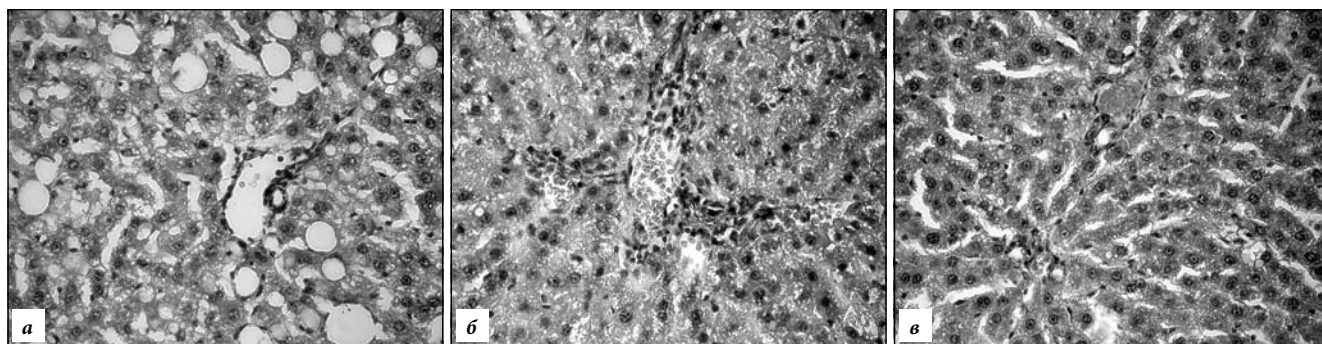


Рис. Патоморфология печени при неалкогольной жировой болезни:

а – нарушение балочной структуры долек, сужение синусоидов, дистрофические изменения гепатоцитов (опыт-1); б – нарушение архитектоники органа, дистрофические изменения гепатоцитов (опыт-2); в – восстановление трабекулярной структуры органа, нечеткость границ и грубозернистость цитоплазмы гепатоцитов (опыт-3). Окр. гематоксилином и эозином, $\times 150$.

показателей группы «опыт-1». Оценка состояния системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» выявила сохранение высокого содержания продуктов перекисидации жиров в крови и печени (табл.). Таким образом, восстановления структуры и функциональных показателей органа через 30 суток после отмены высокожировой нагрузки и нахождении крыс на стандартном рационе не происходило, что обосновывает необходимость применения препаратов гепатопротекторного действия.

Гистологическое исследование печени животных с моделью неалкогольной жировой болезни, получавших фукоидан (опыт-3), показало восстановление трабекулярного строения долек, однако трабекулы зачастую имели неправильную форму, с разрывами и со спавшимися участками (рис., в). Гипертрофия клеток не регистрировалась. Гепатоциты имели рыхлую структуру с нечеткими границами и грубозернистой цитоплазмой. Отмечено увеличение числа двуядерных клеток, что свидетельствовало об активации процессов регенерации. Исследование липидного спектра показало снижение уровня атерогенных фракций в крови. Выявлена нормализация активности трансаминаз и повышение до уровня интактных крыс количества белка в сыворотке крови (табл.). Результаты исследования системы процессов перекисного окисления липидов в этой группе продемонстрировали способность фукоидана снижать уровень гидроперекиси липидов, малонового диальдегида и диеновых конъюгат в печени животных.

Таким образом, фукоидан способствует восстановлению архитектоники органа, снижению уровня атерогенных фракций липопротеидов и продуктов перекисного окисления липидов. Выявленные эффекты свидетельствуют о гепатопротекторных, гиполлипидемических и детоксикационных свойствах сульфатированных полисахаридов, что обосновывает применение фукоидана при неалкогольной жировой болезни печени.

References

1. Novgorodceva T.P., Jendakova Je.A., Jankova V.I. The manual of the methods research for parameters of the «lipid peroxidation-antioxidant protection» system in biological fluids. Vladivostok:

Izd-vo Dalnevost. un-ta, 2003. 80 p.

2. Patent no. 2394281 The method of modeling for non-alcoholic steatohepatitis. Karaman Ju.K., Novgorodceva T.P., Bivalkevich N.V., Lobanova E.G. Published 10.07.2010. Bjulleten No. 19.
3. Pirs Je. Histochemistry [Gistohimija]. M.: Inostr. literatura, 1962. 967 p.
4. Shulpekova U.O. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis, diagnosis, treatment, *Farmateka*. 2007. Vol. 141, No. 6. P. 48–53.
5. Wekina M.I. Nonalcoholic fatty liver disease, *Consilium medicum*. 2009. Vol. 11, No. 8, P. 37–39.
6. Choi E., Kim A., Kim Y., Hwang J. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan in vitro, *J. Med. Food*. 2005. Vol. 4, No. 8. P. 446–453.
7. Matsumoto S., Nagaoka M., Hara T. et al. Fucoidan derived from *Cladophora okamuranus* Tokida ameliorates murine chronic colitis through the down-regulation of interleukin-6 production on colonic epithelial cells, *Clin. Exp. Immunol*. 2004. Vol. 3, No. 136. P. 432–439.
8. Perez-Aguilar F. Etiopathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis, *Gastroenterol. Hepatol*. 2005. Vol. 7, No. 28. P. 396–406.
9. Trappoliere M. The treatment of NAFLD, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2005. Vol. 5, No. 9. P. 299–304.
10. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Li Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*, *J. Biol. Macromol*. 2008 Vol. 2, No. 42. P. 127–132.
11. Zaporozhets, T.S., Kuznetsova, T.A., Smolina, T.P., Shevchenko N.M. Immunotropic and anticoagulant activity of fucoidan from brown seaweed *Fucus evanescens*: prospects of application in medicine, *J. Microbiol*. 2006. No. 3. P. 54–58.

Поступила в редакцию 27.04.2011.

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF FUCOIDAN USED AS HEPATOPROTECTIVE DRUG IN CASE OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

N.V. Bivalkevich, Yu.K. Karaman

Vladivostok Branch of the Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Breathing of the Siberian Branch of RAMS – Research Institute of Medical Climatology and Restorative Treatment (73g Russkaya St. Vladivostok, 690105 Russian Federation)

Summary – The paper describes effect from fucoidan on the histological liver structure, lipid blood spectrum, 'lipid peroxidation-antioxidant defence' system in rats with diet-induced non-alcoholic fat-ty liver disease, and identifies hepatoprotective, hypolipidemic and detoxication properties of fu-coidan that appear to be substantiated for applying in case of non-alcoholic fatty liver disease.

Key words: fucoidan, fatty liver disease, lipid peroxidation, antioxidant defence.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 41–43.

УДК 616.831-002-085.281.8:577.144:582.272

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ: СВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

И.Д. Макаренкова¹, Г.Н. Леонова¹, О.С. Майстровская¹, Т.Н. Звягинцева², Т.И. Имбс², С.П. Ермакова², Н.Н. Беседнова¹

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, фукоиданы, эксперимент.

Проведено сравнительное изучение противовирусной активности сульфатированных полисахаридов – фукоиданов из бурых водорослей *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides*, *Fucus evanescens* и *Costaria costata* на культуре клеток СПЭВ, инфицированных вирусом клещевого энцефалита. Установлено, что фукоиданы обладают вирулицидным действием в отношении высокопатогенного штамма вируса клещевого энцефалита, а также способностью подавлять адсорбцию и репликацию вируса на ранних стадиях развития инфекции *in vitro*.

Невысокая эффективность традиционных методов терапии клещевого энцефалита (КЭ) и способность вируса длительное время сохраняться в клетках центральной нервной системы даже после адекватного лечения острых форм заболевания диктует необходимость поиска новых препаратов, не только способствующих регуляции функций иммунной системы, но и избирательно воздействующих на процессы репликации вируса.

В настоящее время ведется интенсивная работа по созданию и изучению нового класса иммунобиологических препаратов – модификаторов функций врожденного иммунитета при инфекционных заболеваниях [7, 11]. Большой интерес в рамках этого направления представляют сульфатированные полисахариды – фукоиданы из бурых водорослей, содержащие уникальные химические соединения и обладающие выраженной иммуномодулирующей, противовирусной, антикоагулянтной, противовоспалительной, противоопухолевой и антибактериальной активностью [1–3, 9, 14].

Согласно данным литературы и нашим исследованиям, фукоиданы являются агонистами системы врожденного иммунитета, а также обладают выраженной противовирусной активностью в отношении возбудителей иммунодефицита человека, простого герпеса, цитомегалии, гриппа птиц и геморрагической лихорадки с почечным синдромом [1, 3, 4, 10, 12, 13]. Кроме того, в ряде работ установлено, что противовирусное действие фукоиданов зависит от метода экстрагирования, структуры, молекулярной массы, степени сульфатирования и моносахаридного состава [9, 12].

Цель настоящей работы – сравнительный анализ противовирусной активности сульфатированных полисахаридов из различных видов бурых водорослей в отношении вируса клещевого энцефалита *in vitro*.

Макаренкова Илона Дамировна – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; e-mail: ilona_m@mail.ru

Материал и методы. В работе использовали штамм Primorye-73 вируса КЭ дальневосточного субтипа, выделенный из мозга пациента, умершего от очаговой формы инфекции (инфекционный титр 10^7 ТЦИД₅₀/0,2 мл). Клетки культивировали на перевиваемой культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) в 24-луночных пластиковых панелях с ростовой средой (равное соотношение сред 199 и RPMI), с добавлением 10 % сыворотки эмбрионов коров и 100 ЕД/мл гентамицина. Поддерживающая среда содержала 1 % эмбриональной сыворотки.

Выделение и изучение химического состава и структуры фукоиданов из бурых водорослей проведено в ТИБОХ ДВО РАН:

1. Фукоидан из *Laminaria japonica* – частично ацетилированный галактофукан (Fuc:Gal:Man:Rha – 1:0,3:0,1:0,06), сульфатированный преимущественно по положению С-4 остатков фукозы [14];

2. Фукоидан из *Laminaria cichorioides* – высокосульфатированный 1→3-а-L-фукан (Fuc:Gal:Man – 1:0,09:0,08); соотношение фукозы и сульфатов – 1:1,7 [14];

3. Фукоидан из *Fucus evanescens* – частично ацетилированный 1→3;1→4-а-L-фукан (Fuc:Gal:Xyl:Man – 1:0,12:0,14:0,11), сульфатированный преимущественно по С-2 положению остатков фукозы; соотношение фукозы и сульфатов – 1:0,9 [8, 14].

4. Фукоидан из *Costaria costata* – частично ацетилированный галактофукан (Fuc:Gal:Man:Rha – 1:0,29:0,08:0,06), сульфатированный преимущественно по С-4 положению остатков фукозы и, в меньшей степени, по С-2 положению остатков фукозы и галактозы [2].

Для анализа вирулицидного действия фукоиданы в концентрации 100, 500 и 1000 мкг/мл соединяли с вирусосодержащим материалом (в соотношении 1:1) и инкубировали в течение 1 часа при температуре 23–25 °С. Далее 10-кратными разведениями экспериментальных проб заражали монослой культуры клеток СПЭВ и инкубировали 1 час в термостате при 37 °С. Затем инокулят сливали, клетки однократно отмывали, добавляли поддерживающую среду и инкубировали в течение 5 суток при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

Протективное действие препаратов изучали на культуре клеток СПЭВ, в которую вносили фукоиданы (в концентрации 100, 500 и 1000 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С. Затем клеточный монослой однократно отмывали, вносили 10-кратные разведения вируса КЭ и для контакта

Таблица 1
Вирулицидное действие фукоиданов

| Фукоиданы | Концентрация препарата, мкг/мл | Титр вируса КЭ (Δ , lg ТЦИД ₅₀ /мл) ¹ | |
|------------------------|--------------------------------|---|----------------------|
| | | M±m | Me±SD |
| <i>L. japonica</i> | 1000 | 0,6±0,3 | 1,0±0,5 |
| | 500 | 1,6±0,3 | 2,0±0,5 |
| | 100 | 3,3±0,3 | 3,0±0,5 |
| <i>L. cichorioides</i> | 1000 | 3,0±0,6 | 3,0±1,0 |
| | 500 | 3,3±0,3 | 3,0±0,5 |
| | 100 | 5,3±0,3 ² | 5,0±0,5 ² |
| <i>F. evanescens</i> | 1000 | 2,0±0,6 | 2,0±1,0 |
| | 500 | 1,6±0,3 | 2,0±0,5 |
| | 100 | 2,3±0,3 | 2,0±0,5 |
| <i>C. costata</i> | 1000 | 2,0±0,6 | 2,0±1,0 |
| | 500 | 2,3±0,3 | 2,0±0,5 |
| | 100 | 2,3±0,3 | 2,0±0,5 |
| Контроль | – | 6,3±0,3 | 6,0±0,5 |

¹Здесь и в табл. 2: M±m – средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической; Me±SD – медиана и среднее квадратичное отклонение от средней арифметической.

²Только по данной концентрации статистически значимой разницы по сравнению с контролем не получено.

Таблица 2
Протективное действие фукоиданов

| Фукоиданы | Концентрация препарата, мкг/мл | Титр вируса КЭ (Δ , lg ТЦИД ₅₀ /мл) ¹ | |
|------------------------|--------------------------------|---|---------|
| | | M±m | Me±SD |
| <i>L. japonica</i> | 1000 | 2,0±0,5 | 2,0±1,0 |
| | 500 | 2,3±0,3 | 2,0±0,5 |
| | 100 | 4,0±0,5 | 4,0±1,0 |
| <i>L. cichorioides</i> | 1000 | 3,3±0,3 | 3,0±0,5 |
| | 500 | 3,3±0,3 | 3,0±0,5 |
| | 100 | 4,0±0,5 | 4,0±1,0 |
| <i>F. evanescens</i> | 1000 | 3,3±0,3 | 3,0±0,5 |
| | 500 | 2,0±0,0 | 2,0±0,0 |
| | 100 | 3,3±0,3 | 3,0±0,5 |
| <i>C. costata</i> | 1000 | 3,6±0,3 | 4,0±0,5 |
| | 500 | 4,0±0,0 | 4,0±0,0 |
| | 100 | 4,3±0,3 | 4,0±0,5 |
| Контроль | – | 6,3±0,3 | 6,0±0,5 |

¹Разница с контролем по всем концентрациям фукоиданов статистически значима.

помещали на 1 час в термостат при температуре 37 °С. После инкубации инокулят сливали, клетки однократно отмывали от вируса, вносили поддерживающую среду. Планшеты с экспериментальными пробами помещали в 5% CO₂-инкубатор на 5 суток.

При проведении экспериментов параллельно заражали монослой клеток СПЭВ 10-кратным разведением вируса (контроль опыта). Противовирусный эффект препаратов рассчитывали по соотношению инфекционной активности возбудителя в опытных и контрольных образцах. Для получения статистически достоверных результатов эксперименты проводили трижды. Критерием оценки эффективности

вирусингибирующего действия препаратов *in vitro*, согласно требованиям Фармгоскомитета РФ, являлся показатель снижения инфекционного титра вируса (Δ), который должен составлять не менее 1,78 lg [6].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием прикладного пакета Statistica 7.

Результаты исследования. Сравнительное изучение эффективности показало, что все образцы обладали противовирусной активностью, но в разной степени подавляли цитопатогенное действие вируса КЭ. При предварительной экспозиции с фукоиданом из *L. japonica* во всех концентрациях и из *L. cichorioides* в концентрациях 1000 и 500 мкг/мл титр вируса снижался (фукоидан из *L. cichorioides* в концентрации 100 мкг/мл практически не оказывал вирусингибирующего действия). При предварительной экспозиции вируса с фукоиданами из *F. evanescens* и *C. costata* было установлено, что препараты во всех концентрациях способствовали снижению титра вируса в среднем на 4 lg (табл. 1).

Применение фукоиданов в разных концентрациях также вело к статистически и биологически ($\Delta > 2$ lg) значимому подавлению цитопатического действия и накопления вируса, но в меньшей степени, чем при изучении вирулицидного эффекта препаратов. Так, предварительная обработка клеток СПЭВ фукоиданом из *L. japonica* в концентрации 1000 и 500 мкг/мл способствовала их защите от цитодеструктивного действия, снижая титр вируса в среднем на 4 lg, а в концентрации 100 мкг/мл – на 2 lg по сравнению с контролем. Предварительная обработка клеток фукоиданом из *L. cichorioides* в концентрации 1000 и 500 мкг/мл способствовала снижению титра вируса на 3 lg, а в концентрации 100 мкг/мл – на 2 lg, тогда как предварительная экспозиция клеток СПЭВ с фукоиданом из *F. evanescens* в концентрации 1000 и 100 мкг/мл снижала титр вируса на 3 lg, а в дозе 500 мкг/мл – на 4 lg. При исследовании протективного действия фукоидана из водоросли *C. costata* установлено, что препарат во всех исследуемых концентрациях подавлял цитопатическое действие вируса КЭ на 2 lg (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Изучение противовирусного действия сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей *L. japonica*, *L. cichorioides*, *F. evanescens* и *C. costata* на культуре клеток СПЭВ, инфицированных высокопатогенным штаммом вируса КЭ, показало, что фукоиданы обладают вирулицидным и протективным действием при использовании этой чувствительной к вирусу модели. Тем не менее следует отметить, что наибольшим противовирусным действием в отношении вируса КЭ обладают частично ацетилированные, с низким содержанием сульфатов фукоиданы из *F. evanescens*, *L. japonica* и *C. costata*, тогда как высокосульфатированный фукоидан из *L. cichorioides* обладал менее выраженной противовирусной активностью. По-видимому, проявление биологической активности фукоиданов определяется не только степенью сульфатирования, но может зависеть и от содержания фрагментов определенной структуры. Так,

фукоиданы из *L. japonica* и *C. costata* являются галактофукуканами [2, 14]. Фукоиданы из *F. evanescens* и *L. cichorioides* представляют собой практически чистые α -L-фукуаны, но различаются по содержанию моносахаридов и структуре главной цепи молекул. Основным элементом молекулы частично ацетилированного фукоидана из *F. evanescens* является последовательность, построенная из чередующихся 1 \rightarrow 3- и 1 \rightarrow 4-связанных остатков α -L-фукопиранозы, а главная цепь фукоидана из *L. cichorioides* построена только из 1 \rightarrow 3 связанных остатков α -L-фукопиранозы [8, 14]. Возможно, высокая степень сульфатирования, отсутствие ацетатов и 1 \rightarrow 4-связанных остатков α -L-фукопиранозы уменьшают антивирусное действие фукоидана из *L. cichorioides*.

Известно, что клеточными рецепторами для вируса КЭ являются гликопротеины, гепарансульфаты и ламининсвязывающий белок, а за адсорбцию и последующую репликацию вируса отвечает экспонированный на поверхности вирионов гликопротеин E [5]. Одним из важнейших требований к противовирусным препаратам является создание защиты от цитодеструктивного действия. Мы предполагаем, что сульфатированные полисахариды, так же как и гепарансульфаты, могут являться одними из ко-рецепторов для вируса КЭ, в связи с чем противовирусная активность фукоиданов может быть обусловлена ингибированием адсорбции и последующей репликации вирусов в клетках за счет конкурентного лиганд-рецепторного взаимодействия с гликопротеином вируса, что препятствует слиянию клеточной и вирусной мембран и способствует созданию защиты клеток.

Кроме того, ранее нами было показано, что сульфатированные полисахариды являются активаторами системы врожденного иммунитета, о чем свидетельствует увеличение экспрессии поверхностных адгезивных, антигенпредставляющих, костимулирующих молекул и толл-подобных рецепторов на дендритных клетках. В свою очередь повышение синтеза и секреции провоспалительных и регуляторного цитокинов способствует активации нейтрофилов, макрофагов и натуральных киллеров, усилению фагоцитоза, пролиферации лимфоцитов и увеличению синтеза интерферона- γ натуральными киллерами, тем самым обеспечивая их участие в антиинфекционной защите организма [1, 3].

Таким образом, широкий биологический спектр действия сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей, а также полученные нами результаты открывают перспективу для изучения фукоиданов в качестве потенциальных модификаторов биологического ответа при вирусных инфекциях и для дальнейшего их применения в комплексном лечении наряду с официальными препаратами.

References

1. Zaporozhec T.S. Cellular and molecular mechanisms of immunomodulatory activity of biopolymers for marine aquatic: dissertation. Vladivostok, 2006. 352 p.
2. Imbs T.I., Shevchenko N.M., Suhoverhov S.V. et al. Effect of harvest season on the composition and structural characteristics of the polysaccharides for the brown alga *Costaria costata*, *Himi-*

- japrirodnih soedinenij*. 2009. No. 6. P. 661–665.
3. Makarenkova I.D., Ahmatova N.K., Semenova I.B. et al. Cytokine production by dendritic cells in the bone marrow of mice under exposed to sulfated polysaccharides from the marine brown algae, *GMEI*. 2010. No. 5. P. 34–39.
4. Makarenkova I. D., Derjabin P. G., Lvov D. K. et al. Antiviral activity of sulfated polysaccharide from the brown alga *Laminaria japonica* to infection of cell cultures by the virus influenza A avian (H5N1), *Vopr. virusol.* 2010. No. 1. P. 41–45.
5. Romanova L.Ju., Gmyl L.V. Loktev V.B. et al. The change of the antigenic structure of the surface glycoprotein E virus of tick-borne encephalitis and their adaptation to ticks and mammals, *Vopr. virusol.* 2006. No. 6. P. 31–34.
6. The manual for experimental (preclinical) studies of new pharmacological substance / ed. R.U. Habrieva. M.: Medicina, 2005. 832 p.
7. Semenov B.F. Zverev V.V. The concept of a rapid immunological protection from pathogens, *Zhurn. mikrobiol.* 2007. No. 4. P.93–100.
8. Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. et al. Structural analysis of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* by MALDI-TOF and tandem ESI mass-spectrometry, *Carbohydr. Res.* 2009. Vol. 344. P. 779–787.
9. Berteau O., Mullou B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide, *Glycobiology*. 2003. Vol. 13, No. 6. P. 29–40.
10. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, anti-angiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiology*. 2007. Vol. 17, No. 5. P. 541–552.
11. Gearing A.J. Targeting toll-like receptors for drug development: a summary of commercial approaches, *Immunol. Cell. Biol.* 2007. Vol. 85, No. 6. P. 490–494.
12. Mandal P., Mateu C.G., Chattopadhyay K. et al. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*, *Antivir. Chem. Chemother.* 2007. Vol. 18, No. 3. P. 153–162.
13. Zhu W., Chiu L.C., Ooi V.E. et al. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2004. Vol. 24, No. 3. P. 279–283.
14. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions, *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 2003. Vol. 294, No. 1. P. 1–13.

Поступила в редакцию 23.03.2011.

ANTIVIRAL EFFECT OF BROWN ALGAE-DERIVED SULPHATED POLYSACCHARIDES IN CASE OF EXPERIMENTAL TICK-BORNE ENCEPHALITIS: TYING STRUCTURE AND FUNCTION

I.D. Makarenkova¹, G.N. Leonova¹, O.S. Maistrovskaya¹, T.N. Zvyagintseva², T.I. Imbs², S.P. Ermakova², N.N. Besednova¹
¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ²Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The authors have conducted comparable studies of antiviral effect of sulphated polysaccharides – fucoidans derived from brown algae *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides*, *Fucus evanescens* and *Costaria costata* on the SPEV biocytoculture infected with tick-borne encephalitis virus. As reported, the fucoidans are known for virucidal effect against the high pathogenic strain of tick-borne encephalitis virus and capacity of suppressing virus adsorption and replication at early disease stages *in vitro*.

Key words: tick-borne encephalitis virus, fucoidans, experiment.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 44–46.

УДК 615.262.1:577.114:594.124

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОГЛИКАНОВ ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ МИДИИ *CRENOMYTILUS GRAYANUS*

В.И. Молчанова, И.В. Чикаловец, О.В. Черников, А.М. Попов, О.Н. Кривошапко, П.А. Лукьянов

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: митилан, неомитилан, противовоспалительная активность, ранозаживляющая активность.

В эксперименте на мышах установлено, что биогликаны из дальневосточной мидии – митилан и неомитилан – при внутривнутрибрюшинном введении обеспечивают уменьшение отека на каррагинановой модели воспаления. Кроме того, при наружном применении (в составе мази) на экспериментальных моделях термических ожогов и лоскутных ран они обладают ранозаживляющим действием. На экспериментальной модели ожоговых ран этот эффект был выражен значительно.

В последние годы морские биологические ресурсы все чаще используются в качестве источников получения новых биологически активных веществ и как объекты для фундаментальных и прикладных медико-биологических исследований. Работы последних лет показали, что биогликаны, выделенные из ряда морских моллюсков, представляют собой комплексы α -D-глюкана с белковым компонентом с прочной нековалентной связью и проявляют выраженное иммуностимулирующее действие в отношении различных заболеваний [9, 11–13, 15].

Анализ литературных данных по противовоспалительной и ранозаживляющей активности полисахаридов дает основания полагать, что наиболее изученными в этом отношении являются полисахариды, выделенные из грибов и водорослей [2, 6–8]. В связи с этим поиск новых высокоэффективных малотоксичных биологически активных веществ морского происхождения как потенциальных компонентов косметических средств, биологически активных добавок к пище и активных субстанций лекарств является актуальной задачей.

Ранее из мидии *Crenomytilus grayanus* нами выделен митилан – биогликан, который долгое время применялся в качестве компонента косметических кремов, выпускаемых рядом предприятий России. Однако недостатком этого препарата является сравнительно высокое содержание (до 8%) в нем потенциально аллергенных белков. Ранее было показано, что неомитилан – полисахарид из мидии *Crenomytilus grayanus*, отличающийся от митилана низким содержанием белка (не более 1,5%), не токсичен *in vivo* и не проявляет цитотоксической активности *in vitro*. Достоверно установлено, что он обладает иммуномодулирующим действием: это выражается в увеличении лизосомальной активности перитонеальных макрофагов и в усилении формирования в них активных форм кислорода. Неомитилан не вызывает аллергической

реакции замедленного типа, таким образом, не обладает провоспалительным действием, что уменьшает выраженность побочных эффектов [5].

Целью настоящей работы явился сравнительный анализ противовоспалительной и ранозаживляющей активности неомитилана и митилана.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на мышах линий CD-1 (весом 19–21 г) и СВА (самки весом 19–21 г). Животные содержались в стандартных условиях вивария ТИБОХ ДВО РАН с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей. Условия эксперимента и методы исследования выбирали в соответствии с рекомендациями методического руководства Р.У. Хабриева [4].

Группы из пяти животных (беспатогенные мыши СВА) получали интраперитонеально по 5, 10 и 20 мг/кг неомитилана и митилана в физиологическом растворе. В качестве препарата сравнения использовали раствор нестероидного противовоспалительного средства «Ортофен» (ОАО «Биохимик», Россия), который вводили в концентрации 5 мг/кг. В контрольной группе животные не получали лечебных препаратов. Через 1 час после инокуляции биогликанов индуцировали неспецифическое локальное воспаление введением 25 мкл (0,5 мг) свежеприготовленного раствора δ -каррагинана (тип IV, Sigma, USA) в физиологическом растворе в подподошвенную область задней правой лапы животного. В заднюю левую лапу вводили 25 мкл физиологического раствора. Через 5 часов мышей выводили из опыта, лапки отрезали по выступу кости ниже сочленения мало- и большеберцовой костей и взвешивали на аналитических весах с точностью до 4-го знака. Выраженность воспалительной реакции оценивали по изменению веса. Противовоспалительный эффект рассчитывали по замедлению роста ткани гранулемы и выражали в процентах к контролю. Средние значения для группы, получившей лечение, сравнивали со средними значениями контрольной группы и анализировали статистическими методами.

Изучение ранозаживляющей активности биогликанов проводили на моделях термической и лоскутной ран. Термический ожог наносили на предварительно выбритую боковую часть тела между позвоночником и бедром с помощью специального приспособления (медный стержень с плоским торцом диаметром около 6 мм) при 100 °С в течение 5–6 с. Для воспроизведения

лоскутной раны на боковой поверхности тела мыши удаляли шерстный покров и участок кожи площадью 0,25 см².

Для приготовления мазей смешивали ланолин и вазелин в соотношении 1:3, доводили смесь до кремообразного состояния на водяной бане при 37 °С и добавляли митилан или неомитилан в водном растворе из расчета 1 г биогликана на 100 г мазевой основы.

Лечение начинали на следующий день после моделирования раны, предварительно определив ее размер. На поверхность раны наносили 0,12 г/см² ланолиново-зелиновой мази, содержащей 1 % исследуемого препарата. В качестве препарата сравнения использовали 10 %-ную метилурациловую мазь (ОАО «Нижфарм», Россия). Мази наносили с помощью металлического шпателя в достаточном количестве для полного закрытия раны. Краткий курс лечения заканчивался на 4-й день. В качестве контроля использовали животных с ранами, не получавших мазь. Каждая экспериментальная и контрольная группы включала по 5 животных. Спустя 5 и 10 дней рассчитывали процент заживления раны. Характер течения репаративного процесса оценивали, измеряя площади раневой поверхности в различные сроки эксперимента. Для этого к ране прикладывали покровное стекло и переносили (срисовывали) на него контуры дефектов. Стекла с нанесенными контурами оцифровывали с помощью сканера, изображения обрабатывали с помощью программы Adobe Photoshop CS: устанавливали экранную решетку со стороной квадрата 0,25 мм, а затем подсчитывали количество квадратов, охватываемых контуром раны.

Ранозаживляющую эффективность (X) рассчитывали в процентах по формуле:

$$X=100-(S_K \times 100/S_{ИС}),$$

где S_к – конечная площадь раны, S_{ис} – исходная площадь раны.

Также выполняли ежедневную оценку состояния раны: формирования и состояния струпа, наличия периферической эпителизации, отека и гиперемии краев, заживления и степени восстановления кожного покрова. Животные были маркированы пикриновой кислотой, поэтому измерение площадей поверхностей и оценку состояния ран проводили индивидуально для каждой особи.

Результаты исследования анализировали с помощью программного обеспечения SigmaPlot 3.02 (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

Результаты исследования. При внутрибрюшинном введении растворов биогликанов интенсивность отека воспаленной конечности уменьшалась по сравнению с контролем. Неомитилан проявлял дозозависимое действие, и в концентрации 10 мг/кг его противовоспалительная активность была сопоставима с действием ортофена, который использовали в качестве препарата сравнения в дозе 5 мг/кг. Митилан также проявлял наилучшую активность в концентрации 10 мг/кг, но

Таблица

Влияние биогликанов на выраженность каррагинанового отека лапы мышей при внутрибрюшинном введении

| Группа животных | препарат | доза | Вес левой лапы, г | Вес правой лапы, г | Прирост веса, % |
|-----------------|----------|------|-------------------|--------------------|-----------------|
| | | | Контроль | – | 0,125±0,013 |
| Ортофен | 5 | 20 | 0,120±0,010 | 0,183±0,021 | 52,50±2,70 |
| | | 10 | 0,115±0,006 | 0,203±0,025 | 76,52±9,23 |
| | | 5 | 0,120±0,008 | 0,188±0,013 | 56,66±2,83 |
| Неомитилан | 5 | 20 | 0,112±0,017 | 0,188±0,013 | 67,86±7,67 |
| | | 10 | 0,134±0,013 | 0,225±0,022 | 67,91±6,65 |
| | | 5 | 0,133±0,014 | 0,220±0,027 | 65,41±2,52 |
| Митилан | 5 | 20 | 0,143±0,004 | 0,252±0,006 | 76,22±4,88 |
| | | 10 | | | |

он уменьшал отек лапы всего на 35 %, в то время как неомитилан – почти на 44 % (табл.).

Оценка ранозаживляющей активности исследуемых мазей была проведена на беспатогенных мышах линии CD1, которым наносили термические и лоскутные раны согласно Г.Л. Билич и В.Э. Колла [1]. Как показал эксперимент, оба препарата обладали умеренным ранозаживляющим действием: эффективность исследуемых мазевых препаратов падает в ряду: неомитилан, митилан, метилурацил. Наибольшая ранозаживляющая активность наблюдалась при лечебном применении 1 %-ной мази неомитилана на ранней стадии раневого процесса на модели термических ран. Уже на 5-е сутки эксперимента площадь ожоговой ран сокращалась на 11,8 %, в то время как в группах животных, леченных 1 %-ными мазями с митиланом и метилурацилом, заживления не наблюдалось. Эффективность лечебного курса митилановой мази на модели ожоговых ран была несколько ниже неомитилановой на 10-е сутки наблюдения (рис., а). На моделях лоскутных ран показано, что на 5-й день ранозаживляющая активность неомитилана и митилана была несколько выше, а на 10-й день – сравнима с активностью метилурациловой мази (рис., б).

Обсуждение полученных данных. Хотя критерием эффективности противовоспалительного действия на модели отека задней лапы считают его достоверное уменьшение не менее чем на 30 % по сравнению с контролем [4], очевидно, что неомитилан оказался более эффективным противовоспалительным агентом по сравнению с митиланом в концентрации 5 и, особенно, 10 мг/кг. Таким образом, уменьшение доли белковой составляющей в неомитилане по сравнению с митиланом приводит к увеличению противовоспалительной активности. Вероятно, присутствие белка в данном случае не играет существенной роли, а уменьшение лечебного действия митилана может быть обусловлено его алергизирующими свойствами, которые, как известно, сами могут вызывать воспалительный ответ [5]. Противоположные результаты были получены Т.Е. Miller et al. [10]. Гликогенподобный полисахарид, выделенный из мидии *Perna canaliculus* (NZ green-lipped

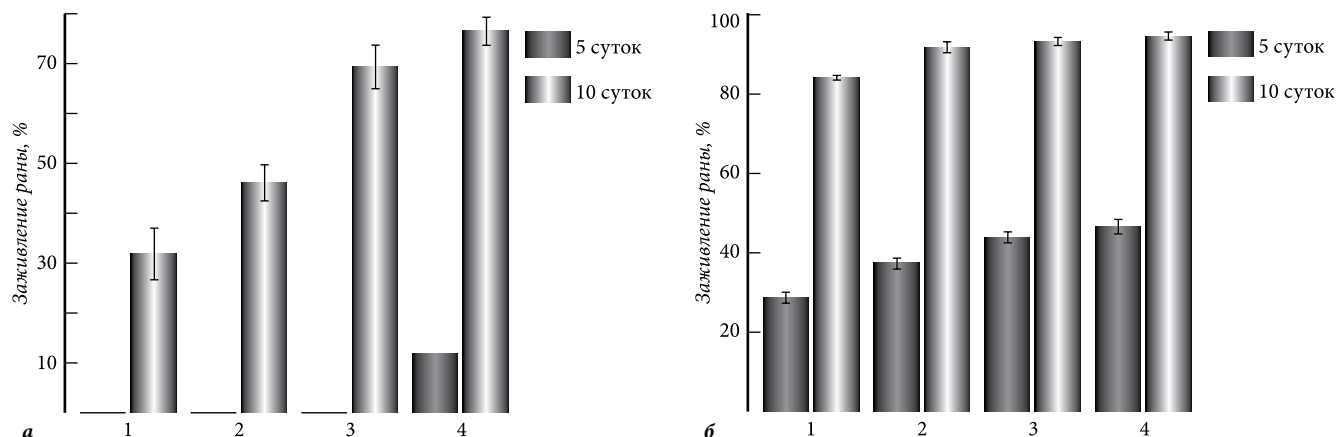


Рис. Сравнительная оценка лечебного действия ланолиновазелиновой мази на основе неомитилана и митилана на скорость заживления термических (а) и лоскутных (б) ран:

группы животных: 1 – контроль; 2 – метилурациловая мазь; 3 – мазь на основе митилана; 4 – мазь на основе неомитилана.

mussel), проявлял дозозависимый противовоспалительный эффект в отношении отека, вызванного каррагинаном у крыс. Полагают, что противовоспалительные свойства здесь были обусловлены наличием белкового компонента, ассоциированного с полисахаридом, поскольку активность исчезала, если экстракт гликогена обрабатывали КОН или протеиназой К. Каррагинановая модель воспаления была использована также при изучении противовоспалительной активности гетерополисахарида, выделенного из китайского гриба *Pholiota nameko*. Этот полисахарид вызывал 30%-ное уменьшение отека по сравнению с контролем [2]. Гетерополисахарид из бурой водоросли *Turbinaria ornata* также обладал противовоспалительным потенциалом [7]. Два водорастворимых полисахарида, выделенные из *Bellamyia purificata*, проявляли противовоспалительную активность на экспериментальной модели воспаления, вызванного введением ксилыла, на 57,56 и 56,46% в дозе 1 мг/мл соответственно [14]. Некоторые полисахариды, обладающие противовоспалительным действием, так же как и исследуемые нами биогликаны, были ассоциированы с белком [7, 15].

При создании новых эффективных ранозаживляющих средств, особенно для лоскутных и ожоговых ран, остается актуальным использование препаратов, обладающих выраженным ранозаживляющим, противовоспалительным и регенерирующим действием. Местное медикаментозное лечение можно считать обоснованным, когда оно проводится строго в соответствии с патогенезом раневого процесса, т.е. с учетом фазы его течения. Под местным медикаментозным лечением понимается использование лекарственных препаратов, наносимых на рану в виде мазей, кремов, растворов, паст и другими способами.

При оценке течения раневого процесса большое значение имеет объективная классификация как стадии заживления, так и характера самой раны. При анализе раневого процесса мы придерживались классификации, предложенной М.И. Кузиным [3], согласно которой этот процесс можно разделить на три фазы: I – фаза воспаления (которая делится на период

сосудистых изменений и период очищения раны от погибших тканей; II – фаза регенерации, образования и созревания грануляционной ткани; III – фаза реорганизации рубца и эпителизации.

Полученные нами результаты на моделях лоскутных ран и термического ожога свидетельствуют об умеренной ранозаживляющей активности 1%-ной мази неомитилана на ранних стадиях раневого процесса. Наибольшая ранозаживляющая активность наблюдалась при лечебном применении мази неомитилана в III фазе раневого процесса как на модели термических, так и послойных лоскутных ран. Причем этот эффект более выражен на экспериментальных моделях термического ожога. После нанесения раны образование струпа в ранах у животных, которым выполняли аппликации неомитилановой мази, происходило заметно быстрее (уже на 5-й день) по сравнению с митилановой и метилурациловой мазью. В дальнейшем в группе животных, проходивших лечение неомитилановой мазью, регистрировали четкое ускорение эпителизации раневой поверхности и восстановления кожного покрова. В ходе экспериментов выявлено, что неомитилан и митилан в составе мазей оказывают сопоставимое с метилурациловой мазью ранозаживляющее действие на экспериментальных моделях лоскутных ран.

Анализ литературных данных показал, что полисахариды, проявляющие ранозаживляющую активность, как правило, несут на себе различные функциональные группы: карбоксильные, ацетамидные, амидные и т.д. Так, альгинат – полисахарид, состоящий из остатков гулуруновой и маннуруновой кислот, проявлял высокую ранозаживляющую активность на экспериментальных моделях лоскутных ран у крыс [8]. При исследовании препаратов хитозана – природного полисахарида, состоящего из остатков глюкозамина, связанных гликозидной связью, с различным молекулярным весом и степенью ацетилирования, показано, что наибольшей ранозаживляющей активностью в отношении ожоговых ран обладал дезацетилированный высокомолекулярный хитозан [6].

Таким образом, неомитилан, обладая иммуномодулирующими, противовоспалительными свойствами и ранозаживляющим действием, может служить основой для получения лекарственных мазей, т.к. в отличие от митилана, благодаря низкому содержанию белковой составляющей, не оказывает провоспалительного действия.

References

1. Bilich G.L., Kolla V.Je. Regulation of regeneration - a cell, material, organism, *Farmakologicheskaja reguljacija regeneratorynyh processov v jeksperimente i klinike: mezhvuzovskij sbornik* GGU. Gorkij, 1978. P. 10–20.
2. Li H., Lu S., Chzhan Sh. et.al. Anti-inflammatory activity of polysaccharide from *Pholiota nameko*, *Biohimija*. 2008. V. 73, no. 6. P. 833–840.
3. Wounds and wound infection: a manual for doctors / eds. M.I. Kuzina, B.M. Kostjuchenok. M.: Medicina, 1990. 592 p.
4. Guidelines for experimental (preclinical) studies of new pharmacological means / ed. R.U. Habrieva. M.: Medicina, 2005. 832 p.
5. Chikalovec I.V., Molchanova V.I., Aminin D.L. et.al. Neomitilane – new immunomodulator from *Crenomytilus grayanus* mussels, *Pacific Medical Journal*. 2009. No. 3. P. 32–35.
6. Alsarra I.A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds, *Intern. J. Biol. Macromolecules*. 2009. Vol. 45, No. 1. P. 16–21.
7. Ananthi S., Raghavendran H.R., Sunil A.G. et al. In vitro anti-oxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga), *Food Chemistry and Toxicology*. 2010. Vol. 48. P. 187–192.
8. Lee W.R., Park J.H., Kim K.H. et al. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing, *Wound Repair and Regeneration*. 2009. Vol. 17, No. 4. P. 505–510.
9. Liu C., Lin Q., Gao, Y. et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs, *Carbohydrate Polymers*. 2007. Vol. 67, No. 3. P. 313–318.
10. Miller T.E., Dodd J., Ormrod D.J., Geddes R. Anti-inflammatory

- activity of glycogen extracted from *Perna canaliculus* (NZ green-lipped mussel), *Agents Actions*. 1993. Vol. 38, No. 2. P. 139–142.
11. Takaya Y., Uchisawa H., Ichinohe H. et al. Antitumor glycogen from scallops and the interrelationship of structure and antitumor activity, *J. Mar. Biotech.* 1998. Vol. 6. P. 208–213.
 12. Xu H., Guo T., Guo Y.F. et.al. Characterization and protection on acute liver injury of a polysaccharide MP-I from *Mytilus coruscus*, *Glycobiology*. 2008. Vol. 18. P. 97–103.
 13. Yao Y., Wei J.Z., Wang J., Zhang J.P. Extraction of *Mytilus coruscus* polysaccharides and study on their immunoactivities, *Acad. J. Sec. Mil. Med. Univ.* 2005. Vol. 26. P. 896–899.
 14. Zhang H., Lin Ye L., Wang K. Structural characterization and anti-inflammatory activity of two water-soluble polysaccharides from *Bellamyia purificata*, *Carbohydrate Polymers*. 2010. Vol. 81, No. 4. P. 953–960.
 15. Zhang L., Liu W., Han B. et al. Isolation and characterization of antitumor polysaccharides from the marine mollusk *Ruditapes philippinarum*, *Eur. Food Res. Technol.* 2008. Vol. 227. P. 103–110.

Поступила в редакцию 18.03.2011.

COMPARABLE STUDY OF BIOLOGICAL EFFECTS FROM FAR-EASTERN MUSSEL *CRENOMYTILUS GRAYANUS*-DERIVED BIOGLICANES

V.I. Molchanova, I.V. Chikalovets, O.V. Chernikov, A.M. Popov, O.N. Krivoschapko, P.A. Lukianov
Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the FEBRAS (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The mice experiment allowed to found out that the Far-Eastern mussel-derived bioglicanes – mitilane and neomitilane – ensured decreasing edema during Carrageenan-induced inflammation in case of intraperitoneal introduction. Besides, in case of external use (cream) at experimental models of thermal burns and scabby wounds they have had vulnerary effect. During experiment, these effects were more considerable.

Key words: mitilane, neomitilane, anti-inflammatory activity, vulnerary effect.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 47–50.

УДК 615.277.3.06:615.275.2:574.5

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ АСЦИДИИ *HALOCYNTHIA AURANTIUM* НА КРОВЕТВОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ В УСЛОВИЯХ МИЕЛОСУПРЕССИИ, ВЫЗВАННОЙ ЦИТОСТАТИКОМ

Т.И. Пономарева¹, Ю.И. Добряков¹, Е.Ю. Добряков²

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690021 г. Владивосток, ул. Балтийская, 43),

²Медицинское объединение ДВО РАН (690021 г. Владивосток, ул. Кирова, 95)

Ключевые слова: миелосупрессия, хаурантин, кроветворные клетки.

В опытах на мышах СВА изучена возможность коррекции хаурантином (экстрактом из морского гидробионта *Halocynthia aurantium*) миелосупрессивного синдрома, вызванного цитостатиком. Показано, что хаурантин стимулирует процессы костномозгового кроветворения в условиях гипоплазии костного мозга, развивающейся под действием циклофосфана (250 мг/кг). Стимуляция процессов регенерации кроветворения под действием хаурантина сопровождается развитием гиперплазии гранулоцитарного и эритроидного ростков, ускоренным восстановлением числа полиморфно-ядерных лейкоцитов и моноцитов с последующим развитием нейтрофилии и моноцитоза в периферической крови. В основе активирующего влияния хаурантина на гемопоэз лежит стимуляция пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников гемопоэза.

Пономарева Татьяна Ивановна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биофизики Тихоокеанского океанологического института; e-mail: pti@poi.dvo.ru

Известно, что при заболеваниях системы крови и целом ряде других патологических процессов может развиваться гемодепрессия. Несмотря на различия в этиологии и патогенезе миелосупрессивного синдрома, в основе подавления кроветворения в большинстве случаев лежат однотипные процессы [6]. Удобной моделью для изучения общих закономерностей развития миелосупрессивного синдрома и разработки методов стимуляции кроветворения являются цитостатические и лучевые гемодепрессии. Согласно современным представлениям, опустошение костного мозга в данных условиях вызывается прямым повреждающим действием радиации или цитостатика на кроветворные клетки-предшественники [4, 6]. При этом установлено, что, кроме поражения родоначальных клеток крови, наблюдаются структурно-

Таблица

Динамика клеточности костного мозга мышц и формирование КОЕс после введения ЦФ и хаурантина

| Сутки | Группа | Кол-во клеток, абс. (10 ⁶) | | | | Кол-во КОЕс, абс. |
|-------|--------------|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Миелокариоциты | Незрелые нейтрофилы | Зрелые нейтрофилы | Эритрокариоциты | |
| 2-е | ЦФ | 3,70±0,22 ¹ | 0,30±0,02 ¹ | 1,00±0,17 ¹ | 0,20±0,02 ¹ | – |
| | ЦФ+хаурантин | 3,40±0,22 | 0,30±0,03 | 1,10±0,15 | 0,20±0,02 | – |
| 5-е | ЦФ | 5,10±0,40 ¹ | 2,20±0,07 | 2,00±0,30 ¹ | 0,30±0,02 ¹ | – |
| | ЦФ+хаурантин | 8,60±0,81 ² | 4,20±0,08 ² | 3,00±0,27 ² | 0,60±0,04 ² | – |
| 7-е | ЦФ | 8,80±0,67 ¹ | 2,40±0,16 ¹ | 3,00±0,29 ¹ | 0,80±0,04 ¹ | – |
| | ЦФ+хаурантин | 15,00±0,79 ² | 5,00±0,29 ² | 6,00±0,38 ² | 1,80±0,20 ² | – |
| 9-е | ЦФ | 12,20±0,77 ¹ | 3,80±0,21 ¹ | 6,10±0,22 ¹ | 2,70±0,22 | 2,50±0,01 |
| | ЦФ+хаурантин | 21,40±0,51 ² | 7,50±0,27 ² | 8,30±0,51 ² | 3,80±0,50 | 5,50±0,03 ² |
| 12-е | ЦФ | 16,00±1,10 ¹ | 3,70±0,70 | 6,80±0,27 | 3,00±0,40 | – |
| | ЦФ+хаурантин | 19,30±2,01 ² | 5,80±0,29 ² | 8,40±0,16 ² | 4,80±0,80 ² | – |
| 12-е | Контроль | 17,50±0,73 | 2,70±0,21 | 7,50±0,23 | 2,60±0,20 | – |

¹ Разница с контролем статистически значима.² Разница с группой ЦФ статистически значима.

функциональные нарушения со стороны элементов, составляющих гемопоэз индуцирующее микроокружение. Эти нарушения, очевидно, еще больше дезорганизуют процессы пролиферации и дифференцировки миелоидных клеток-предшественников.

Использование естественных биологически активных веществ в качестве регуляторов кроветворения можно считать одним из перспективных направлений в фармакологии [1, 4]. В последние годы пришло понимание необходимости расширения сырьевой базы для получения лекарственных препаратов за счет богатейшего разнообразия флоры и фауны моря. В работе представлены результаты исследования гемостимулирующих свойств хаурантина (водно-спиртового экстракта из асцидии пурпурной *Halocynthia aurantium*, патент RU № 1522487, ТУ 9169-007-20783642-06, свидетельства на товарный знак «хаурантин» № 236689 и Naurantium № 236690). Хаурантин – это комплекс биологически активных веществ, включающий фосфолипиды, свободные аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты семейства n-3, n-6, каротиноиды, макро- и микроэлементы [5]. В исследованиях на лабораторных животных при использовании разных моделей поражения печени (стресс, этиловый спирт, четыреххлористый углерод) показана эффективность профилактического применения хаурантина, и этот эффект связывают с его способностью влиять на метаболические процессы. Показано также, что хаурантин усиливает активность глутатионзависимых механизмов антиоксидантной защиты, проявляет высокую стресс-протективную и иммуномодулирующую активность [2, 3, 7],

Целью исследования явился анализ влияния хаурантина на кроветворные процессы в условиях гипоплазии костного мозга, вызванной цитостатиком.

Материал и методы. Исследования проводили на мышцах-гибридах СВА (60 особей весом 20–22 г). Цитостатическая гемодепрессия воспроизводилась введением циклофосфана (ЦФ, ОАО «Биохимик», Саранск), 250 мг/кг массы внутривенно однократно. Хаурантин перед введением деалкоголизировали в

вакууме и вводили ежедневно внутрижелудочно в дозе 0,4 мл/кг (из расчета 28 мг/кг сухого остатка) в течение всего эксперимента, начиная со дня введения ЦФ. Контрольные (интактные, 10 особей) животные получали эквивалентное количество дистиллированной воды. Животных по 5 особей из каждой группы выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом на 2, 5, 7, 9 и 12-е сутки после введения ЦФ. Контрольных животных выводили из эксперимента на 12-е сутки. Для оценки состояния гемопоэза подсчитывали общее количество клеток и анализировали морфологический состав костного мозга в бедренной кости, изучали гематологические показатели периферической крови и ее морфологический состав [6]. Пролиферативную активность стволовых кроветворных клеток оценивали по формированию колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) на 9-е сутки после введения циклофосфана [8]. Опыты проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС). Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. В ранние сроки после введения ЦФ в костном мозге мышечной резко (на 79%) уменьшилось количество ядродержащих клеток. На 2-е сутки здесь основную массу составляли клетки лимфоидного ряда, введение на этом фоне хаурантина способствовало ускорению процессов репарации (табл.).

Изменениям в картине костномозгового кроветворения под влиянием хаурантина в целом соответствовала динамика абсолютного содержания лейкоцитов и их отдельных форм в периферической крови (данные не приводятся). Позитивная динамика общего количества лейкоцитов регистрировалась с 5-х суток, на 7–12-е сутки различия между этими показателями в группах были статистически достоверны, и начиная с 7-х суток содержание лейкоцитов у мышечной группы «ЦФ+хаурантин» приближалось к значениям контроля. Содержание нейтрофильных гранулоцитов в этой группе к 7-м суткам

также было достоверно повышено, а количество моноцитов на 5-е сутки достигало контрольных значений, с последующим гипертрофированием (до 300%) на 7-е сутки и снижалось до исходных значений к 12-м суткам (табл.). Также в периферической крови зарегистрирована ретикулоцитопения, которая сохранялась в обеих группах до 9-х суток эксперимента.

Обсуждение полученных данных. Однократное введение ЦФ в максимально переносимой дозе закономерно приводило к развитию выраженной гипоплазии костного мозга. Максимальная депрессия общего числа миелокарицитов зарегистрирована на 2-е сутки после введения цитостатика. В указанный период имело место значительное подавление, как гранулоцитопоэза, так и эритропоэза. Известно, что вызванная действием цитостатика гибель кроветворных пролиферирующих клеток приводит к прерыванию пополнения пула не пролиферирующих короткоживущих зрелых элементов. Регенерация обеспечивается за счет стволовых клеток, которые в момент введения ЦФ находились вне клеточного цикла [1, 6]. В норме доля пролиферирующих стволовых кроветворных клеток весьма невелика – около 10%. Однако этого достаточно для поддержания стабильного кроветворения. Особенностью стволовых кроветворных клеток является их способность к дифференцировке и самоподдержанию [6, 8]. При достаточно глубоком поражении кроветворной ткани, когда погибает значительное количество пролиферирующих клеток, стволовые клетки теряют чувствительность к дифференцировочным стимулам, начинается активная пролиферация, увеличивающая их общее содержание. Блок дифференцировки сохраняется до достижения стволовыми клетками определенного критического уровня, и лишь затем включаются дифференцировочные механизмы. На этом основан метод эндогенных колоний, который позволяет оценить пролиферативную активность кроветворной ткани [6]. Стволовые клетки миелоидного ряда, мигрируя из костного мозга в селезенку и прорывав более 20 митозов за 8–9 суток после поступления «запроса» на активное кроветворение, образуют КОЕс, состоящие из развивающихся кроветворных клеток (табл.). Хаурантин оказывал положительное влияние на формирование КОЕс у мышей: на 9-е сутки количество эндогенных колоний в селезенке животных, получающих хаурантин после воздействия цитостатика, в 2,2 раза превышало показатели группы ЦФ. Под влиянием хаурантина ускорение процессов репарации также наблюдалось в костном мозге. Общая клеточность костного мозга приближалась к исходным значениям на 9-е сутки, превышая в 1,7 раза группу ЦФ. При этом количество незрелых форм гранулоцитарных нейтрофилов почти в 2 раза превышало значения группы ЦФ и в 2,7 раза – контрольных животных. Процессы восстановления эритропоэза под влиянием хаурантина также начались раньше в группе животных, получающих хаурантин. О темпах регенерации кроветворения можно

судить и по времени увеличения и нормализации числа лейкоцитов в периферической крови.

Таким образом, введение хаурантина животным при гемодепрессии способствует ускоренной пролиферации кроветворных клеток-предшественников и увеличению интенсивности их дифференцировки, что приводит к последовательному возрастанию морфологически дифференцирующихся и зрелых элементов костного мозга и их выходу в периферическое русло. Стимулирующий эффект препарата проявляется в первую очередь на клетках гранулоцитарно-макрофагального ряда и может быть связан как с прямым действием на гемопоэтические клетки, так и опосредован влиянием на метаболические процессы, активируя таким образом функции гемопоэз-индуцирующего микроокружения.

References

1. Goldberg E.D., Dygaj A.M., Agafonov V.I. et al. The creation principles for natural stimulant drugs of hematopoiesis, *Jeksperim. i klin. farmakol.* 1995. Vol. 58, No. 1. P. 3–7.
2. Dobryakov U.I., Dobryakov E.U., Ponomareva T.I. The research of the pharmacological properties the extract from the sea hydrobiolites – purple ascidian (*Halocynthia aurantium*). *Dalnevostochnye morja Rossii*. Vol. 2. M.: Nauka, 2007. p. 637–659.
3. Dolmatova L.S., Dobryakov Ju.I., Dardymov I.V. Haurantina influence on the activity of antioxidant system under stress in rats and in model experiments on human neutrophils, *Valeologija*. Vladivostok: Dalnauka, 2000. No. 3. P. 101–105.
4. Zaichkina S.I., Kondakova N.V., Rozanova O.M. et al. Testing antiradiation effect of biological active substances in the medium and low-dose radiation with cytogenetic indicator, *Him.-farm. zhurnal*. 2004. Vol. 38, No. 8. P. 3–8.
5. Kushnerova N.F., Dobryakov Ju.I., Jankova V.I. The chemical components of alcoholic extracts from the ascidian purple tunic *Halocynthia aurantium*, *Valeologija*. Vladivostok: Dalnauka, 2000. no. 4. P. 151–155.
6. Normal hematopoiesis and its regulation / ed. N.A. Fedorova M.: Medicina, 1996. 543 p.
7. Ponomareva T.I., Dobryakov U.I. The study of immune properties haurantina with immunosuppression in the experiment, *Pacific Medical Journal*. 2009. No. 3. P. 52–54.
8. The manual of Hematology. Vol. 1. / ed. A.I. Vorobeva. M.: Medicina, 2002. 235 p.

Поступила в редакцию 05.04.2011.

THE EFFECT OF HYDROBIONT HALOCYNTHIA AURANTIUM EXTRACT ON HEMOPOIESIS UNDER CONDITIONS OF CYTOSTATIC MYELOSUPPRESSION

T.I. Ponomareva¹, Yu.I. Dobryakov¹, E.Yu. Dobryakov²

¹V.I. Il'ichev Oceanological Institute FEB RAS (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690021 Russian Federation), ²Hospital of FEB RAS (95 Kirov St. Vladivostok 690021 Russian Federation)

Summary – The effect of haurantinum (extract of marine hydrobiont *Halocynthia aurantium*) on hemopoietic processes under cyclophosphanum (250 mg/kg) induced bone marrow hypoplasia in CBA mice were investigated. There was shown, that hemopoiesis recovery activated by haurantinum is manifested by the granulocyte and erythrocyte lineage hyperplasia in bone marrow, rapid restoration of the polymorphonuclear leukocyte and monocyte count in the peripheral blood, and development of neutrophilosis and monocytosis. The effect of haurantinum on the bone marrow hemopoiesis is related to accelerate of proliferation and differentiation of the hemopoietic precursor cells.

Key words: haurantinum, hemopoietic cells, myelosuppression.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 50–52.

УДК [616.98:579.842.23-06:616.94]-085.324:563.96

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ВИДОВ ГОЛОТУРИЙ НА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС И АПОПТОЗ В МАКРОФАГАХ МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Л.С. Долматова¹, О.А. Заика¹, Н.Ф. Тимченко²

¹Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Балтийская, 43),

²НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

Ключевые слова: иерсинии, экстракт из голотурий, макрофаги, сепсис.

Исследовано влияние экстракта из дальневосточных видов голотурий на уровень продукции нитросинего тетразолия и активность антиоксидантных ферментов макрофагов мышей, зараженных *Yersinia pseudotuberculosis*. Установлено, что при 100 %-ной выживаемости у 67 % инфицированных животных происходила коагуляция перитонеальной жидкости. Трехсуточное введение инфицированным животным ЭГ в концентрациях 0,5–1 мг/кг подавляло функциональную активность макрофагов и оказывало защитный антисептический эффект, снижая число мышей с септическими проявлениями инфекции. В дозе 10 мг/кг экстракт стимулировал функциональную активность макрофагов, но и увеличивал количество мышей с коагуляцией перитонеальной жидкости. Авторы предлагают использование экстракта из голотурий в низких дозах для комплексного лечения септических проявлений при иерсиниозе.

Псевдотуберкулез, вызываемый *Yersinia pseudotuberculosis* (дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка), постоянно регистрируется в России и за рубежом. Заболевание характеризуется клиническим полиморфизмом и нередкой генерализацией инфекции [6]. Лечение псевдотуберкулеза часто осложняется формированием лекарственно-резистентных штаммов возбудителя. Все это обуславливает необходимость совершенствования фармакотерапии заболевания, разработок и исследований новых препаратов, в том числе иммуномодулирующей направленности, поскольку возбудитель псевдотуберкулеза вызывает значительные повреждения иммунитета [14].

Из тканей ряда дальневосточных голотурий (*Cusimaria japonica*, *Eupentacta fraudatrix*) получен экстракт, содержащий комплекс биологически активных веществ и получивший коммерческое название «Пентакан» (ТУ 9154-001-77418193). Первоначально обнаружена его эффективность в ингибировании роста микробов *in vitro* и в клинике при наружном применении [1]. Дальнейшие опыты на животных показали выраженный иммуномодулирующий эффект препарата, в том числе при профилактическом использовании в опытах по заражению неинбредных мышей *Y. pseudotuberculosis* [3].

Функциональная активность фагоцитов во многом определяется уровнем продукции в них активных метаболитов кислорода. При этом увеличение активности может быть опасно и для самой клетки, в связи с чем рост продукции активных метаболитов кислорода ограничивает система антиоксидантной защиты. Модуляция

оксидантно-антиоксидантного баланса препаратами также может влиять на уровень иммунного ответа. Экстракт из голотурий (ЭГ) проявляет высокую антиоксидантную активность, по-видимому обусловленную входящими в его состав каротиноидами и тритерпеновыми гликозидами, и это свойство может лежать в основе его иммуномодулирующего действия [1].

Целью настоящей работы явился анализ влияния ЭГ на уровень продукции активных метаболитов кислорода и активность антиоксидантных ферментов макрофагов мышей, зараженных *Y. pseudotuberculosis*, по лечебной схеме применения – после заражения животных бактериями.

Материал и методы. Использовали самок неинбредных мышей массой 14–15 г, находившихся на стандартной диете. В работе руководствовались правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Контрольным животным (1-я группа) вводили физиологический раствор. Для экспериментального инфицирования животным 2–5-й групп внутрибрюшинно однократно вводили *Y. pseudotuberculosis* в дозе 105 микробных клеток (штамм 3D, III серотип, выделенный от больного человека). Животным 3–5-й групп дополнительно в течение трех последующих суток вводили ЭГ *per os* один раз в день в дозах 0,5, 1,0 и 10,0 мг/кг соответственно. Животных 1-й и 2-й групп поили физиологическим раствором (рН 7, 4) в течение трех суток по той же схеме. Отдельно три группы животных (6–8-я) получали только ЭГ в дозах 0,5, 1,0 и 10,0 мг/кг *per os* один раз в день в течение трех дней. Каждая экспериментальная группа состояла из трех-четырёх мышей. По окончании эксперимента (через 45 мин после последнего введения физраствора или ЭГ) животных забивали дислокацией шейных позвонков и отбирали перитонеальный экссудат. В полученных из него макрофагах определяли содержание нитросинего тетразолия (НСТ), по которому судили о продукции активных метаболитов кислорода [5]. Часть клеток отбирали для последующего анализа уровня апоптоза, часть замораживали в жидком азоте и хранили при –20 °С до определения активности антиоксидантных ферментов. Перед определением активности антиоксидантных ферментов клетки разрушали ультразвуком (УЗДН-1, 22 кГц, 25×6 с при 0 °С). Ядра осаждали центрифугированием. В полученных супернатантах спектрофотометрическими методами определяли активность супероксиддисмутазы

(СОД, НФ 1.15.1.1), каталазы (НФ 1.11.1.6) и глутатионредуктазы (ГР, НФ 1.6.4.2) [4]. Все измерения проводили в трипликатах. Количество белка в пробах определяли окраской по Кумасси бриллиантовым голубым G-250.

Для анализа апоптоза суспензии перитонеальных макрофагов (0,3–0,5 млн клеток) центрифугировали (1000g×5 мин при 4 °С), к осадку добавляли 40 мкл 4 % раствора формалина и делали мазки, которые окрашивали Hoechst 33342 [12]. Об уровне апоптоза судили по процентному содержанию ярко-голубых флуоресцирующих клеток.

Результаты обрабатывали статистически, используя для определения достоверности различий между группами t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования. В течение эксперимента все животные были живы. Однако уже через сутки после введения бактерий у части инфицированных мышей (2–5-я группы) появились визуальные признаки сепсиса, в частности – коагуляция перитонеальной жидкости. На 4-й день у животных, не получавших экстракта (2-я группа), этот феномен зарегистрирован в 67 % случаев. ЭГ в дозе 0,5 и 1 мг/кг проявлял защитное действие, снижая число животных с коагулированной перитонеальной жидкостью в 3-й и 4-й группах до 25 и 33 % соответственно. В то же время экстракт в концентрации 10 мг/кг стимулировал коагуляцию, которая на четвертые сутки была зарегистрирована у всех мышей 5-й группы.

Для понимания механизмов такой про- и противовоспалительной активности ЭГ было проведено исследование состояния оксидантно-антиоксидантного баланса макрофагов. У мышей 2-й группы не было отмечено изменений в продукции НСТ по сравнению с контролем. Однако у инфицированных мышей, получавших дополнительно ЭГ в дозе 1 мг/кг (4-я группа), уровень НСТ был значительно снижен по сравнению с контролем, а доза 10 мг/кг, напротив, стимулировала продукцию НСТ (рис. 1). Введение только экстракта 1 и 10 мг/кг в сутки (7-я и 8-я группы) значительно снижало уровень НСТ в клетках по сравнению с контролем (максимально при дозе 1 мг/кг – на 77 %).

При этом как инфицирование бактериями (2-я группа), так и скармливание экстракта (6–8-я группы) не оказывали влияния на активность СОД в макрофагах мышей по сравнению с контролем (1-я группа). Введение препарата в дозе 0,5 мг/кг инфицированным животным (3-я группа) также не оказывало влияния на активность фермента. Однако экстракт в дозе 1 мг/кг (4-я группа) значительно стимулировал активность СОД (на 64 % по сравнению с контролем), а в дозе 10 мг/кг (5-я группа) снижал активность фермента на 36 % по сравнению с контролем (рис. 2, а).

Активность каталазы в эксперименте изменялась более значительно. Так, во 2-й группе она снижалась на 37 % по сравнению с контролем. В 7-й и 8-й группах зарегистрировано прямое дозозависимое подавление активности фермента: на 39 и 53 % соответственно. Введение

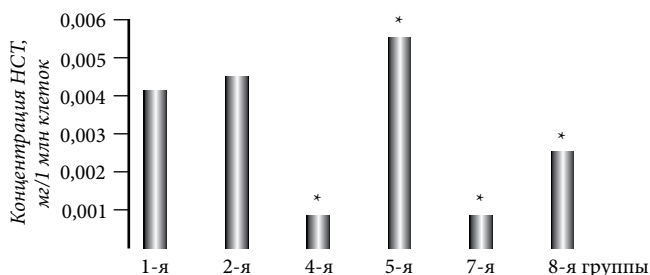


Рис. 1. Влияние ЭГ на уровень НСТ в макрофагах:

* – разница с контролем статистически значима.

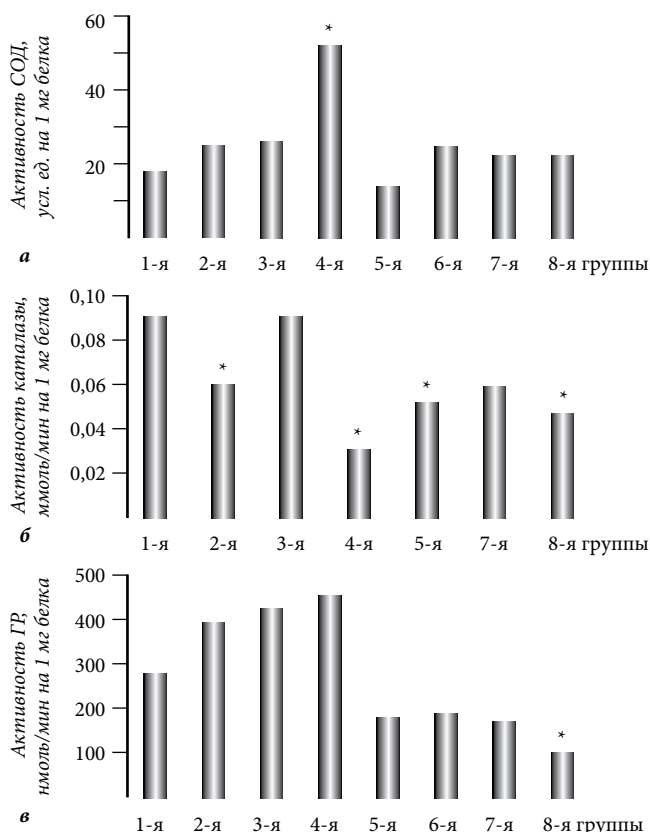


Рис. 2. Изменения активности антиоксидантных ферментов в макрофагах:

а – СОД, б – каталаза, в – ГР; * – разница с контролем статистически значима.

же ЭГ инфицированным мышам возвращало активность каталазы к контрольным значениям только в 3-й группе. В 4-й и 5-й группах активность фермента оставалась практически на том же уровне, что во 2-й (рис. 2, б).

В макрофагах мышей 2-й группы отмечена тенденция к возрастанию активности ГР (на 40 %). Это свидетельствовало об определенной напряженности антиоксидантной ферментной защиты, связанной со снижением уровня восстановленного глутатиона. В группах 6–8, напротив, отмечено дозозависимое подавление активности фермента (максимальное подавление – на 64 % – при концентрации 10 мг/кг). При введении ЭГ в дозе 0,5 мг/кг инфицированным мышам (3-я группа) активность фермента была практически такой же, как во 2-й группе, превышая контрольное значение в 1,6 раза. Однако в 4-й группе ЭГ (10 мг/кг) уже возвращал активность фермента к контрольному уровню (рис. 2, в).

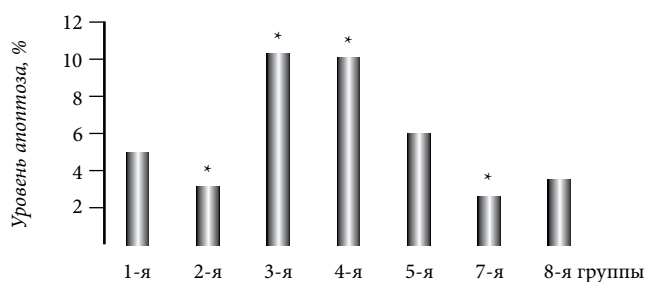


Рис. 3. Уровень апоптоза в макрофагах:

* – разница с контролем статистически значима.

Уровень апоптоза в макрофагах инфицированных мышей снижался на 32% по сравнению с контролем. У животных 7-й и 8-й групп также происходило снижение уровня апоптоза (статистически значимое в 7-й группе). У инфицированных животных, принимавших ЭГ (3–5-я группы), уровень апоптоза достоверно возрастал в обратной концентрационной зависимости (рис. 3).

Обсуждение полученных данных. Ранее нами было показано, что один из важных факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* – термостабильный токсин ТсТур – обладает способностью модулировать апоптоз в нейтрофилах крови крыс *in vitro* [2]. Стратегия бактерий, в том числе *Y. pseudotuberculosis*, направленная на подавление иммунитета макроорганизма, может реализовываться и через другие факторы, например эффекторные белки Yop, которые индуцируют апоптоз и подавляют фагоцитоз в макрофагах путем блокировки респираторного взрыва [14, 15]. Ранее было показано, что заражение мышей бактериями псевдотуберкулеза уже через 45 мин приводит к значительному снижению уровня НСТ в перитонеальных макрофагах [3], что соответствует представлениям, изложенным выше. Однако в настоящих опытах через четверо суток после заражения мышей не отмечено изменений в продукции НСТ макрофагами. При этом не зарегистрировано и существенных изменений активности антиоксидантных ферментов за исключением каталазы, активность которой достоверно снижалась. Уменьшался также уровень апоптоза в макрофагах. Очевидно, к четвертым суткам после заражения происходило восстановление функциональной активности макрофагов, по-видимому, за счет увеличения синтеза ими провоспалительных веществ, что способствовало появлению у части инфицированных животных признаков сепсиса.

Такая динамика изменений клеточного ответа на бактерии, вероятно, обусловлена тем, что реализация иммунного ответа макрофага на патоген может вести и к выживанию, и к смерти клетки, в зависимости от изменений в контролируемых апоптозом системах [14]. Возможно, в более поздние сроки включаются апоптозконтролирующие механизмы, направленные на выживание макрофагов. В частности, известно, что в регуляции апоптоза, помимо каспаз, могут участвовать митогенактивируемые и циклоаденозинмонофосфатзависимые протеинкиназы [14]. В свою очередь

показано участие циклического аденозинмонофосфата в регуляции продукции активных форм кислорода, причем аденозинмонофосфат не только стимулирует активность антиоксидантных ферментов в культуре клеток и снижает концентрацию перекиси водорода, но и может снижать активность каталазы в отсутствие изменений других антиоксидантных ферментов (что указывает на важную роль перекиси водорода в проведении сигнала) [7, 9, 10].

По-видимому, снижение активности антиоксидантных ферментов при первоначальном снижении уровня НСТ в макрофагах при введении бактерий в последующие сроки сопровождается его ростом с соответствующим повышением активности антиоксидантных систем (СОД и ГР) практически до уровня контроля. При этом концентрация перекиси водорода поднимается до значений, превышающих контрольные, на фоне значительно сниженной активности каталазы. Избирательное действие на продукцию перекиси водорода показано и при действии некоторых других бактерий [8, 13]. Повышение же продукции этого соединения может стимулировать синтез циклического аденозинмонофосфата [9]. Наряду с имеющимися данными о вовлеченности циклического аденозинмонофосфата в регуляцию апоптоза, индуцированного *Y. pseudotuberculosis* [2], это свидетельствует о возможности снижения уровня апоптоза в макрофагах через четверо суток после инфицирования в связи с ростом его уровня.

Вместе с тем при трехсуточном введении ЭГ (1 и 10 мг/кг) отмечено обратное концентрационно-зависимое подавление продукции НСТ при сохраненной активности СОД, но не каталазы и ГР, активность которых препарат ингибировал в прямой концентрационной зависимости (достоверно – только при дозе 10 мг/кг).

Таким образом, ЭГ снижает уровень НСТ на фоне уменьшения активности как каталазы, так и ГР, что говорит в пользу антиоксидантного механизма действия: экстракт может эффективно снижать уровень свободных радикалов в клетке [1], тем самым отменяя необходимость поддержания высокой антиоксидантной ферментной защиты. При этом он снижает уровень апоптоза в обратной зависимости от дозы.

Введение инфицированным животным ЭГ в дозе 0,5 мг/кг вызывало рост активности каталазы до контрольного уровня при неизменной активности СОД и ГР, но уровень НСТ оставался сниженным. При дозе 1 мг/кг уровень НСТ у инфицированных животных не превышал таковой при введении ЭГ неинфицированным мышам, не происходило изменений в активности ГР и каталазы, но значительно возрастала активность СОД. Обе дозы экстракта (0,5 и 1 мг/кг) значительно стимулировали уровень апоптоза.

Таким образом, увеличение уровня апоптоза в макрофагах инфицированных животных при введении указанных доз ЭГ связано с низким уровнем продукции НСТ. При этом снижалось и число животных с проявлениями сепсиса по сравнению с инфицированными

мышьями 2-й группы. По-видимому, снижение функциональной активности макрофагов и увеличение их гибели в этих условиях способствовало снижению их провоспалительных эффектов, как это было показано и при действии растительных флавоноидов [11].

Напротив, в 5-й группе наибольшая из использованных концентраций (10 мг/кг) при введении инфицированным животным значительно стимулировала продукцию НСТ, не вызывая достоверного изменения в активности СОД и ГР, а также в уровне апоптоза. Таким образом, при этой дозе происходил рост антибактериальной активности ЭГ при сохранении жизнеспособности самих макрофагов. Однако активность каталазы, но не других ферментов, оставалась сниженной. В этой группе число животных с коагуляцией крови составило 100 %, превысив даже частоту сепсиса во 2-й группе. Таким образом, в условиях бактериального инфицирования стимуляция ЭГ функциональной активности макрофагов сопровождалась, по-видимому, усилением их провоспалительной активности, способствовавшей развитию сепсиса.

В целом при введении ЭГ с лечебной целью в течение трех суток мышам, инфицированным *Y. pseudotuberculosis*, отмечено дозозависимое противодействие эффекту бактерий в макрофагах. Наиболее выраженное, стимулирующее функциональную активность макрофагов действие имело применение ЭГ в максимальной из исследованных концентраций – 10 мг/кг. Однако именно эта доза, повышая функциональную активность макрофагов и их выживаемость, по-видимому, приводила к усилению продукции этими клетками провоспалительных веществ, приводящих к септическим проявлениям. В связи с этим дозы ЭГ 0,5–1 мг/кг, при которых сохранялась сниженная функциональная активность макрофагов, но при этом уменьшалась и частота септических проявлений, могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения при лечении сепсиса.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ-ДВО РАН № 08-04-99141.

Литература

References

- Dolmatova L.S., Dolmatov I.U., Dobryakov U.I. et al. Antioxidant and biological activity of sea cucumbers extracts *Eupentacta fraudatrix* and ascidian *Halocynthia aurantium*, *Materialy VIII Mezhdunarodnogo sezda "Fitofarm-2004"*. Mikkeli, Finland. 21–23 June 2004. SPb.: Adaptogen, 2004. P. 85–88.
- Dolmatova L.S., Zaika O.A., Nedashkovskaja E.N., Timchenko N.F. Researches of apoptosis modulating influence mechanisms of heat-stable toxin *Yersinia pseudotuberculosis* and correcting effect of extract from the Far Eastern species of sea cucumbers in the rat neutrophils in vitro, *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 3. P. 76–80.
- Dolmatova L.S., Zaika O.A., Timchenko N.F. Immunomodulatory effect of the sea cucumbers extract *Eupentacta fraudatrix* in experimental pseudotuberculosis infection, *Kamchatka – zdavnica severo-vostochnykh regionov Rossii: mat. mezhhregionalnoj nauch.-prakt. konf. Petropavlovsk-Kamchatskii, 22–24 oktober 2009*. Petropavlovsk-Kamchatskii: Kamchatpress, 2009. P. 85–91.

- Dolmatova L.S., Romashina V.V. Especially changes in the activity of antioxidant enzymes in different types of white blood cells in patients with chronic alcoholism, *Pat. fiziol. jeksperim. terapija*. 2003. no. 2. P. 17–19.
- Melnikov V.P. The test of the nitroblue tetrazolium reduction by phagocytes, *Lab. delo*. 1991. no. 8. P. 51–53.
- Pomogaeva A.P., Urazova O.I., Kovshirina Ju.V. et al. Clinical and immunological features of children pseudotuberculosis, *Bulleten sibirskoj mediciny*. 2006. V. 5, no. 4. P. 103–110.
- Bellomo F., Piccoli C., Cocco T. et al. Regulation by the cAMP cascade of oxygen free radical balance in mammalian cells, *Antioxid. Redox Signal*. 2006. Vol. 8, No. 3–4. P. 495–502.
- Chakraborty P., Ghosh D., Basu M.K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes, *J. Parasitol.* 2001. Vol. 87, No. 5. P. 1023–1027.
- Cochrane R., Clark R.B., Maulik N. et al. cAMP-mediated suppression of a Th1 clone associated with an alteration of the intracellular redox environment, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2003. Vol. 49, No. 2. P. 301–306.
- Ezeamuzie C.I., Taslim N. Reactive oxygen species mediate phorbol ester-stimulated cAMP response in human eosinophils, *Eur. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 543, No. 1–3. P. 174–180.
- Fang S.H., Hou Y.C., Chang W.C. et al. Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock, *Life Sci*. 2003. Vol. 74, No. 6. P. 743–756.
- Komatsu N., Oda T., Muramatsu T. Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and *Pseudomonas* toxin, *J. Biochem.* 1998. Vol. 124. P. 1038–1044.
- Morganti R.P., Marcondes S., Baldasso P.A. et al. Inhibitory effects of staphylococcal enterotoxin type B on human platelet adhesion in vitro, *Platelets*. 2008. Vol. 19, No. 6. P. 432–439.
- Ruckdeschel K. Immunomodulation of macrophages by pathogenic *Yersinia* species, *Arch. Immunol. Ther. Exp.-Warsz.* 2002. Vol. 50, No. 2. P. 131–137.
- Viboud G.I., Bliska J.B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis, *Ann. Rev. Microbiol.* 2005. Vol. 59. P. 69–89.

Поступила в редакцию 01.04.2011.

EFFECTS FROM FAR EASTERN HOLOTHURIANS EXTRACT ON OXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE AND APOPTOSIS IN MICE MACROPHAGES IN CASE OF EXPERIMENTAL PSEUDOTUBERCULOSIS INFECTION

L.S. Dolmatova¹, O.A. Zaika¹, N.F. Timchenko²

¹Pacific Oceanological Institute (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russian Federation), ²Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation)

Summary – The paper describes effects from the Far Eastern Holothurians extract on nitroblue tetrazolium production level and action of antioxidant ferments of mice macrophages infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. As reported, given the 100 % survival rate, 67 % of infected animals had the peritoneal fluid coagulated. The three day introduction of HE into infected animals at the concentration of 0.5–1 mg/kg allowed to suppress functional activity of macrophages and have protective antiseptic effect, thereby decreasing a number of mice with septic manifestations. Given the 10 mg/kg dose, the Holothurians extract appeared to stimulate functional activity of macrophages and increase number of mice with coagulated peritoneal fluid. The authors suggest applying the Holothurians-derived extract in low doses to treat septic manifestations in case of Yersiniosis.

Key words: *Yersinia*, *Holothurians extract*, *macrophages*, *sepsis*.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 53–56.

УДК 615.324.014.425:597.94:577.112.6

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ГЛИКОПЕПТИДОВ КОЖНОГО СЕКРЕТА ГИГАНТСКОЙ КИТАЙСКОЙ САЛАМАНДРЫ

В. Лу¹, М. Ху², Ч. Тон³, Х. Джин¹, К. Ю¹, В. Ван¹, П.А. Лукьянов⁴¹Даляньский океанологический университет (г. Далянь, Ляонин, 116023, Китай),²Шеньянский сельскохозяйственный университет (г. Далянь, Ляонин, 116023, Китай),³Северо-восточный лесотехнический университет (г. Харбин, Хейлунцзян, 150040, Китай),⁴Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)**Ключевые слова:** китайская гигантская саламандра, гликопептиды, антиоксидантные свойства.

Кожный секрет китайской гигантской саламандры *Andrias davidianus* защищает животное от неблагоприятных условий окружающей среды, обеспечивая антиоксидантную устойчивость и защиту от ультрафиолетового излучения. Он предохраняет от бактериальной инфекции, обладает ранозаживляющим действием. Из кожного секрета китайской гигантской саламандры выделены гликопептиды с молекулярной массой 3,5 кДа и ниже. Они устойчивы к действию 0,1N соляной кислоты, трипсина и пепсина, легко проникают через стенку кишечника. Гликопептиды обладают выраженными антиоксидантными свойствами, нормализуют нитроксидсинтазную активность клеток периферической крови человека, подавляют в них гиперпродукцию реактивных форм кислорода, являясь перспективными корректорами оксидантного стресса.

Китайская гигантская саламандра *Andrias davidianus* – самая большая амфибия в мире, достигающая в длину 2 метров и живущая до 100 лет. В неизменном состоянии этот вид существует последние 50 млн лет в провинции Хунань и прилегающих к ней областях Китая. Кожный мукосоподобный секрет защищает животное от неблагоприятных условий окружающей среды, обеспечивая антиоксидантную устойчивость, защиту кожных покровов от ультрафиолетового излучения [5]. Кроме того, секрет защищает раны от бактериальной инфекции, обладает ранозаживляющим действием и стимулирует клетки ткани раневой поверхности к пролиферации и дифференцировке. Он состоит из муциноподобного углеводно-белкового комплекса с включением различных низкомолекулярных соединений [2, 4]. Кожный секрет постоянно генерируется и сбрасывается животным в окружающую среду. При этом саламандры охотно поедают его. В Китае налажено фермерское воспроизводство саламандр как для сохранения генофонда, так и для пищевой промышленности. При культивировании взрослых особей с одного животного в течение года можно собрать до 500 г сухого мукуса. Биологические свойства этого уникального продукта и возможность получения новых терапевтических средств на его основе привлекли наше внимание.

Материал и методы. Гликопептиды получали после размораживания нативного секрета саламандр (10 г) гидролизом углеводно-белкового комплекса при pH 2 с использованием 30 мг кислой протеазы из *Aspergillus*

sp., полученной от Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Utilization of Liaoning Province (Dalian, China) в течение 3 часов при 55 °С. После прогревания реакционной среды при 90 °С в течение 15 мин для инактивации фермента, охлаждения, нейтрализации и удаления высокомолекулярных соединений центрифугированием при 9000 об./мин в течение 30 мин гликопептиды как мажорный продукт выделяли с использованием ультрафильтрации между мембранами 5 и 1 кДа (выход 2,4 г). Молекулярную массу полученных гликопептидов определяли масс-спектрометрией на Bruker Autoflex time-of-flight mass spectrometer (Bruker, Germany). Аминокислотный анализ (без определения триптофана) проводили после гидролиза (1 мг/мл 6M HCl) при 100 °С в течение 24 часов с использованием анализатора Hitachi 835 (Japan).

Антиоксидантные свойства гликопептидов тестировались гашением радикалов [6]: 0,2 мл 0,2мМ 2,2-дифенил-1-пикрилгидраза в этаноле инкубировали 30 мин при комнатной температуре в присутствии различных концентраций гликопептидов, определяли падение оптической плотности (ОП) в процентах при 517 нм и рассчитывали гашение по формуле:

$$\text{ОП} = (\text{ОП}_{\text{бланк}} - \text{ОП}_{\text{образец}}) \times 100 / \text{ОП}_{\text{бланк}}$$

Антиоксидантные свойства также изучали на клетках белой крови человека, стимулированных липополисахаридом *Escherichia coli* (10 мкг/мл), исследуя подавление нитроксидсинтазной активности и генерации реактивных форм кислорода по методам, описанным А.Д. Коряковой и др. [1].

Результаты исследования. Ферментативным гидролизом нативного муциноподобного секрета саламандр кислой протеазой с выходом 24 % были получены гликопептиды, по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии, с молекулярной массой 3,5 кДа и ниже (рис. 1). Препарат гликопептидов был хорошо растворим в воде и 75 %-ном этаноле (до 1 мг/мл), не изменял молекулярно-массового распределения при действии трипсина, пепсина и 0,1N HCl. Гликопептиды содержали в своем составе треонин, глутамин и глутаминовую кислоту, аспарагин и аспарагиновую кислоту, а также ароматические аминокислоты – фенилаланин и тирозин (табл.). Содержание углеводов, по данным фенол-сернокислотного анализа с глюкозой в качестве стандарта, составляет 17,6 %.

Лукьянов Павел Александрович – д-р хим. наук, профессор, ведущий лабораторией химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН; e-mail: paluk@mail.ru

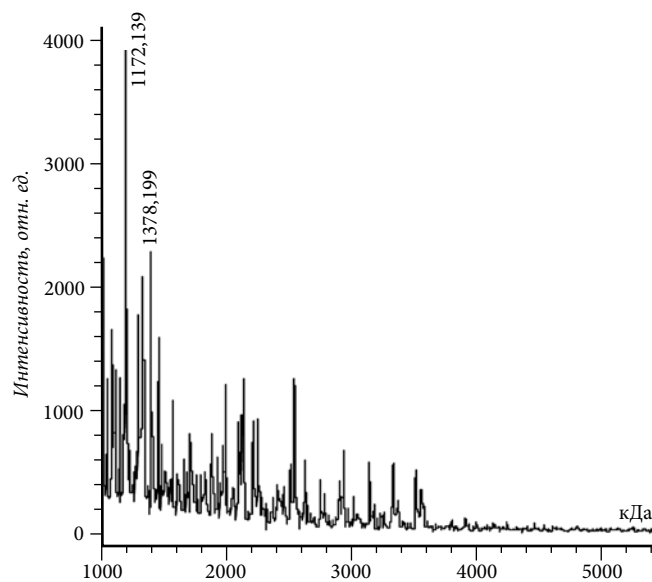


Рис. 1. Масс-спектрометрический анализ молекулярной массы гликопептидов саламандры.

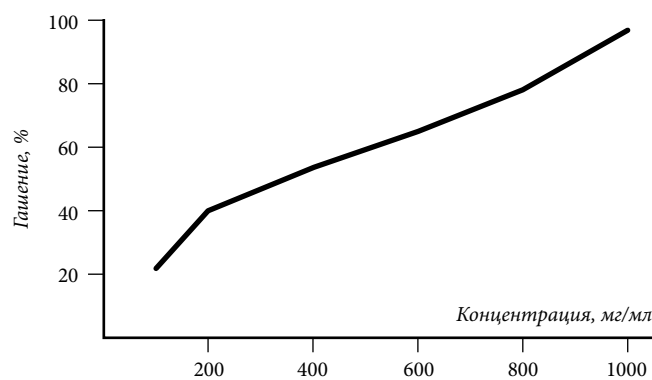


Рис. 2. Гашение радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразина гликопептидами саламандры.

Гликопептиды вызвали гашение радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразина [3] на 50 % при концентрации 300 мкг/мл (рис. 2). Кроме того, они были способны подавлять на 50 % гиперпродукцию реактивных форм кислорода и активность нитроксидсинтазы в клетках белой крови человека, стимулированных липополисахаридом *E. coli*, при концентрациях 125 и 250 мкг/мл соответственно (рис. 3).

Обсуждение полученных данных. Ферментативным гидролизом получены гликопептиды из мускуса саламандры с выходом 24 %. Их молекулярная масса оказалась меньше 3,5 кДа, и они устойчивы к ферментам пищеварительного тракта, что предполагает способность проникать сквозь стенку кишечника при пероральном применении в неизменном состоянии. Высокое содержание оксиаминокислот предполагает, что в основе структуры гликопептидов лежат O-гликозидные связи, кроме того, данные анализа бета-элиминирования подтверждают это. Содержание углеводов составляет 17,6 %, что характерно для муциноподобных гликопротеинов.

Гликопептиды эффективно гасят радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразина и подавляют генерацию

Таблица
Аминокислотный состав гликопептидов

| Аминокислоты | % | Аминокислоты | % |
|--------------|------|--------------|-----|
| Аспарагинаты | 11,2 | Лейцин | 5,3 |
| Треонин | 13,1 | Тирозин | 3,1 |
| Серин | 0,2 | Фенилаланин | 4,7 |
| Глутаминаты | 12,5 | Гистидин | 2,6 |
| Пролин | 8,9 | Лизин | 5,3 |
| Глицин | 2,4 | Аргинин | 6,5 |
| Аланин | 8,5 | Метионин | 2,1 |
| Валин | 5,7 | Цистеин | 1,2 |
| Изолейцин | 3,6 | Триптофан | н/о |

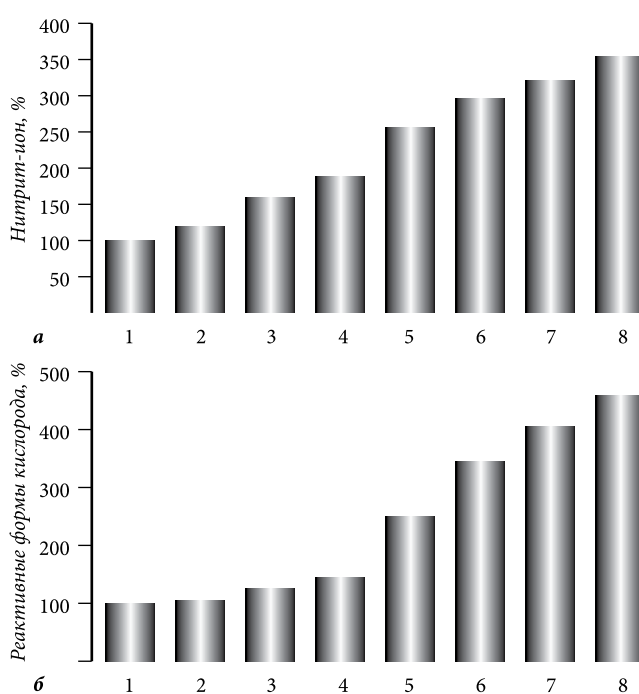


Рис. 3. Подавление нитроксидсинтазной активности (а) и генерации реактивных форм кислорода (б) гликопептидами в клетках белой крови человека, стимулированных липополисахаридом *E. coli* (10 мкг/мл):

1 – нативные клетки, 2–7 – 1000, 500, 250, 125, 63 и 32 мкг/мл гликопептидов соответственно, 8 – клетки, стимулированные липополисахаридом.

реактивных форм кислорода в гиперстимулированных клетках периферической крови человека, кроме того, они эффективно ингибируют в них нитроксидсинтазную активность. Совместная гиперактивация синтеза реактивных форм кислорода и нитроксидсинтазы приводит к синтезу пероксинитрила – чрезвычайно токсического интермедиата, вызывающего нитрирование ароматических аминокислот и дезактивирующего белки окружения.

Эти эффекты гликопептидов мускуса гигантской саламандры позволяют предположить, что они являются перспективными терапевтическими средствами, способными корректировать оксидантный статус и нитроксидсинтазную активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального фонда NSFC-31071612, NSFC-21075012, Научного фонда Чжандзаде 2010ZD019 и Научного фонда провинции Хунань 2010FJ6096.

References

1. Korjakova A.G., Homenko A.V., Lukjanov P.A. The role of surfactant protein A in vector delivery by liposomes to cells, *Biologicheskie membrany*. 2001. Vol. 18, No. 2. P. 131–136.
2. Batista I., Ramos C., Coutinho J., Bandarra N.M., Nunes M.L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced, *Process Biochemistry*. 2010. Vol. 45. P. 18–24.
3. Jao C.L., Ko W.C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from Tuna cooking juice, *Fisheries Science*. 2002. Vol. 68. P. 430–435.
4. Kong L., Wu X., Luo B. et al. Glycopeptides isolated from skin glands secretion of *Andrias davidianus*, *Glycobiology*. 2010. Vol. 20. P. 1503–1509.
5. Lan S., Li D., Jiang J. Call and skin glands secretion induced by stimulation of midbrain in urodele (*Andrias davidianus*), *Brain Research*. 1990. Vol. 528. P. 159–161.
6. Singh N., Rajini P.S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel, *Food Chemistry*. 2004. Vol. 85. P. 611–616.

Поступила в редакцию 25.03.2011.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF CHINESE GIANT SALAMANDER SKIN SECRETION GLYCOPEPTIDES

W. Li¹, M. Qu², Ch. Tong³, Q. Jin¹, X. Yu¹, W. Wang¹, P.A. Lukyanov⁴

¹Dalian Ocean University (Dalian Liaoning 116023 China),

²Shenyang Agriculture University (Dalian Liaoning 116023 China),

³Northeast Forestry University (Harbin Heilongjiang 150040 China),

⁴Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far East Branch of Russian Academy of Science (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The skin secretion of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* protects the animal from unfavourable environmental conditions, thus ensuring antioxidative resistance and protection from ultraviolet light. It prevents from bacterial infections and has vulnerary effect. The glycopeptides with molecular weight of 3.5 kDa and lower have been extracted from the Chinese giant salamander skin secretion. These are known to be resistant to 0.1 N of hydrochloric acid, trypsin and pepsin, easy to penetrate the intestinal wall. The glycopeptides have evident antioxidant properties, normalize nitroxide synthase activity of human peripheral blood, and suppress hyperproduction of reactive oxygen forms. It is very promising to treat oxidant stress.

Key words: Chinese giant salamander, glycopeptides, antioxidant properties.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 57–59.

УДК 577.114:612.112.91/94/95:612.017.11

ГЛИКОПОЛИМЕРЫ МОРСКИХ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АКТИВАТОРЫ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА

Т.П. Смолина¹, Т.А. Кузнецова¹, Е.Л. Назаренко², Н.Н. Беседнова¹

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: лимфоциты, липополисахарид протеобактерий, моноциты, нейтрофилы.

Показано влияние липополисахарида (ЛПС), выделенного из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* штамма КММ156, и его структурных компонентов на активацию нейтрофилов, моноцитов и натуральных киллеров крови человека. Активацию клеток оценивали по изменению уровня экспрессии мембранных кластеров дифференцировки (CD) на поверхности натуральных киллеров (CD69 и CD25), на мембранах моноцитов и нейтрофилов (CD14 и CD16). ЛПС и его безлипидные компоненты оказывали активирующее действие на клеточное звено врожденного иммунитета. ЛПС вызывал шеддинг мембранных молекул CD14 с моноцитов и, по сравнению с контролем, значительно увеличивал популяцию клеток CD14⁺CD16⁺ с высоким уровнем эффекторных свойств и большим потенциалом антигенпредставляющей активности. О-специфический полисахарид и олигосахарид кора увеличивали популяцию моноцитов CD14⁺CD16⁺ в меньшей степени. Все гликополимеры, увеличивая экспрессию сигнальных молекул (CD14) и иммуноглобулинов (CD16) на нейтрофилах, приводили клетки к состоянию активации. На натуральных киллерах ЛПС в большей степени увеличивал экспрессию CD25 (пролиферативный потенциал клеток), а О-специфический полисахарид и олигосахарид кора – экспрессию CD69 (маркер цитотоксических функций).

Липополисахариды бактерий – сильные активаторы врожденного иммунитета – содержат токсический

компонент – липид А, что ограничивает их использование в качестве основы для получения лекарственных препаратов. В этом плане большой интерес представляют морские бактерии, относящиеся к роду *Pseudoalteromonas*, которые в силу особых условий обитания могут синтезировать необычные структурные варианты липида А с низким эндотоксическим потенциалом [3].

К настоящему времени биологически активные вещества, принадлежащие к различным классам соединений, обнаружены во многих видах морских бактерий рода *Pseudoalteromonas*. Установлено, что в состав гликополимеров внешней мембраны грамотрицательных морских бактерий *Pseudoalteromonas* входят редкие и необычные N-ациламино- и кислые моносахариды, а также высшие сахара [1]. Ранее нами было установлено, что кислые капсульный и клеточные полисахариды морских микроорганизмов этого рода обладают способностью блокировать адгезию патогенных микроорганизмов на клетках животных и человека [5], а липополисахарид (ЛПС) и его компоненты, выделенные из бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, оказывают активирующее действие на мононуклеары клеток крови [6].

Цель настоящей работы – определение возможности активации клеток врожденного иммунитета

Смолина Татьяна Павловна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: +7 (423) 244-24-46, e-mail: tsmol@mail.ru

человека ЛПС *P. nigrifaciens*, а также его безлипидными компонентами: О-специфическим полисахаридом (О-ПС) и олигосахаридом кора (ОК). Для этого на основе анализа кластеров дифференцировки (CD – Cluster of Differentiation) на моноцитах и нейтрофилах измеряли уровень экспрессии рецепторов, участвующих в проведении активационного сигнала внутрь клетки (CD14 – рецептор к ЛПС) и запускающих различные механизмы клеточного ответа (CD16 – рецептор для Fc-фрагмента иммуноглобулина G). Среди натуральных киллеров определяли процент клеток, характеризующихся цитотоксическими свойствами (CD69⁺) и пролиферативным потенциалом (CD25⁺).

Материал и методы. Гликополимеры получены из штамма *P. nigrifaciens* КММ 156, выделенного из ткани желудка дальневосточного двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* (бухта Троица) и находящегося в коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН. О-ПС, входящий в состав ЛПС, имеет идентичное строение с капсульным полисахаридом и состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка L-рамнозы, один остаток 2-ацетидамо-2-дезоксид-глюкозы и один остаток 3-O-[(R)-1-карбоксиил]-D-глюкозы (глюколактиловой кислоты) [2]. В состав ЛПС кроме О-ПС входит липид А в аномально низком количестве и ОК.

Материалом для исследования служила периферическая кровь с гепарином (25 БД/мл), полученная от здоровых доноров. Исследуемые гликополимеры растворяли в физиологическом растворе и вносили в кровь в конечной концентрации 100 мкг/мл (оптимальную дозу определили в предварительных экспериментах). В контрольные пробы вносили физиологический раствор в равном объеме.

Уровень экспрессии молекул определяли методом двуцветного цитометрического анализа в программе Cell Quest на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson) с использованием моноклональных антител к молекулам CD45-FITC/CD14-PE, CD16-FITC, CD14-FITC, CD69-PE, CD25-PE (Beckman Coulter) и соответствующих изотипических контролей. Гейтирование субпопуляций нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов осуществляли по прямому и боковому светорассеянию, натуральных киллеров – по CD16. В каждой пробе анализировали не менее 10⁴ клеток.

Экспрессию активационных маркеров CD69 определяли на поверхности натуральных киллеров через 1, 4 и 24 часа, экспрессию CD25 – через 24 часа. Уровень экспрессии CD16 на моноцитах оценивали через 4 часа. Результаты представлены как процент клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры. Интенсивность экспрессии мембранных антигенов CD14 и CD16 на поверхности нейтрофилов и CD14 на моноцитах оценивали через 1 и 4 часа. Результаты, характеризующие количество молекул на поверхности клеток, показаны в виде средних интенсивностей

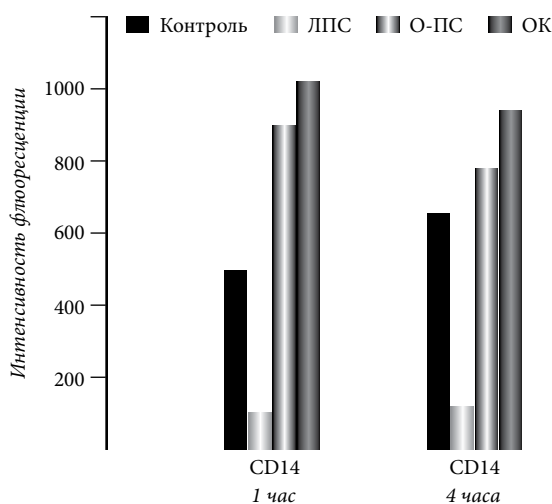


Рис. 1. Влияние гликополимеров, выделенных из *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD14 моноцитами.

флуоресценции, из которых вычтены аналогичные показатели изотипического контроля.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием пакета компьютерных программ Geostat, которые включали расчет медианы и квартильного размаха (разность значений 75-го и 25-го процентилей), а также оценку различий с использованием критерия Вилкоксона для связанных групп [4].

Результаты исследования. При изучении влияния на экспрессию CD14 на моноцитах было установлено значительное снижение числа этих молекул под действием ЛПС в течение 1-го часа инкубации: интенсивность флуоресценции CD14 была равна 108 усл.ед. (90–116 усл.ед.), в контроле – 489 усл.ед. (465–501 усл.ед.), через 4 часа этот показатель увеличивался до 130 усл.ед. (122–143 усл.ед.). Противоположный характер изменения экспрессии CD14 вызывали О-ПС и ОК: выраженная флуоресценция в течение 1-го часа инкубации – О-ПС – 890 усл.ед. (874–911 усл.ед.), ОК – 1039 усл.ед. (1018–1052 усл.ед.) – к 4-му часу начинала снижаться (рис. 1).

Все гликополимеры увеличивали минорную популяцию моноцитов, экспрессирующих CD16 и слабо экспрессирующих CD14 (рис. 1). Наибольший эффект оказывал ЛПС, повышавший количество моноцитов CD14⁺CD16⁺ до 47,7 % (40,2–51,6 %) при 7,4 % (6,2–8,4 %) в контроле, в то время как О-ПС увеличивал эту популяцию до 20,5 % (17,6–24,4 %), а ОК – до 19,9 % (16,2–21,7 %).

Экспрессия молекул CD14 на нейтрофилах под действием ЛПС носила двухфазный характер: снижение интенсивности флуоресценции CD14 через 1 час до 1,8 усл.ед. (1,4–2,0 усл.ед.) при 6,0 усл.ед. (5,5–6,4 усл.ед.) в контроле и повышение ее через 4 часа культивирования до 3,3 усл.ед. (3,0–3,6 усл.ед.) при 6,0 усл.ед. (5,4–6,3 усл.ед.) в контроле (рис. 2). Компоненты ЛПС – О-ПС и ОК – напротив, значительно увеличивали интенсивность флуоресценции CD14 уже через 1 час контакта с нейтрофилами. Если уровень экспрессии CD14 под действием

О-ПС продолжал возрастать до 4 часов инкубации, то под действием ОК он оставался без изменений.

Все гликополимеры изменяли уровень экспрессии CD16 на нейтрофилах, увеличивая количество молекул на мембранах в течение первого часа культивирования на 40–50%. Дальнейшая инкубация с гликополимерами в течение 4 часов приводила к снижению количества этих рецепторов на мембранах нейтрофилов, наибольший эффект оказывал ЛПС (рис. 2).

Лимфоциты, в том числе натуральные киллеры, в интактном состоянии не экспрессируют CD69 [8]. В наших экспериментах после 1 часа культивирования уровень натуральных киллеров CD69⁺ в контроле был невысоким: 5,41% (4,35–6,27%). Инкубация клеток крови с любым из гликополимеров в течение часа приводила к увеличению их количества: ЛПС – 11,91% (9,37–13,24%), О-ПС – 18,07% (15,68–20,25%); ОК – 18,36% (16,35–21,04%). В дальнейшем количество натуральных киллеров, экспрессирующих CD69, продолжало возрастать до конца срока наблюдения (рис. 3).

Все исследованные гликополимеры через 24 часа инкубации с клетками крови увеличивали экспрессию CD25 на натуральных киллерах. Количество этих клеток, экспрессировавших CD25 под действием ЛПС, достигало 49,73% (43,61–55,37%), в то время как О-ПС увеличивал этот показатель до 32,75% (27,32–36,45%), ОК – до 29,57% (24,87–33,56%) при контрольном значении – 4,55% (2,25–6,23%).

Обсуждение полученных данных. Как показали наши исследования, ЛПС *P. nigrifaciens* и его структурные компоненты изменяли экспрессию активационных и сигнальных молекул на мембранах нейтрофилов, моноцитов и натуральных киллеров крови, осуществляющих функции врожденного иммунитета. Одним из ключевых медиаторов, опосредующих провоспалительную активность ЛПС, является его рецептор на моноцитах – CD14. Связывание ЛПС и других бактериальных продуктов с этим рецептором и последующее формирование высокоаффинного рецепторного комплекса с толл-подобным рецептором-4 запускает процессы активации клеток и продукцию цитокинов, регулирует апоптоз, взаимодействие лейкоцитов и эндотелия. [13]. По данным литературы, ЛПС инициирует в клетке два процесса, связанных с изменением количества рецепторов CD14, которое регистрируется в первые часы воздействия: сшивание (шеддинг) молекул с мембран и транслокацию внутриклеточных молекул на поверхность клетки [11]. В зависимости от того, какой из процессов преобладает, наблюдается уменьшение или увеличение мембранных молекул и возрастание концентрации растворимых рецепторов CD14, играющих роль в транспортировке ЛПС к мембранам клеток. Результаты экспериментов выявили двухфазный характер изменения уровня экспрессии мембранных рецепторов CD14 на моноцитах под действием гликополимеров, причем если ЛПС в первый час инкубации снижал их количество, а в дальнейшем увеличивал, то О-ПС и ОК демонстрировали противоположный эффект.

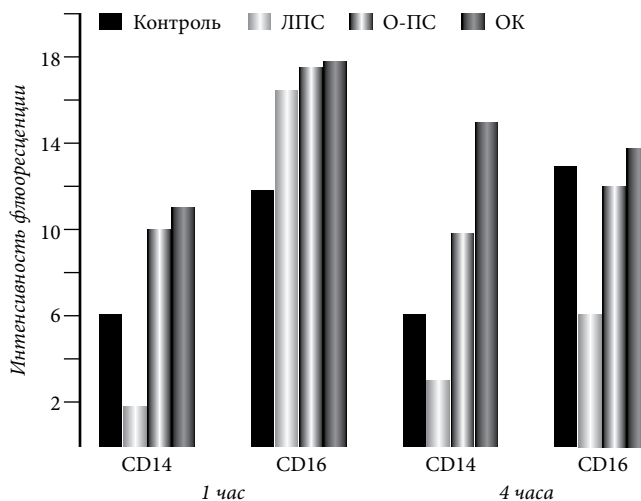


Рис. 2. Влияние гликополимеров, выделенных из *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD14 и CD16 нейтрофилами.

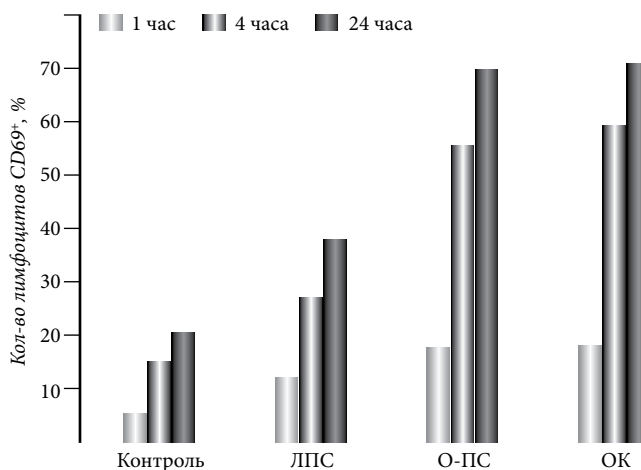


Рис. 3. Влияние гликополимеров, выделенных из *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD69 натуральными киллерами.

На нейтрофилах, как и на моноцитах, ЛПС вызывал сначала снижение, а затем увеличение экспрессии молекул CD14, в то время как О-ПС и ОК с первого часа уровень их экспрессии увеличивали.

Все гликополимеры умножали популяцию моноцитов CD14⁺CD16⁺, которая характеризуется более высокими уровнями фагоцитоза и продукции провоспалительных цитокинов, а также большим потенциалом антигенпредставляющей функции [10]. Наибольшим эффектом здесь обладал ЛПС. На основе различий экспрессии поверхностных молекул CD14 и CD16 у здорового человека идентифицированы две субпопуляции моноцитов: CD14⁺⁺CD16⁻ (90–95%) и CD14⁺CD16⁺ (5–10%). На моноцитах, принадлежащих к этим субпопуляциям, экспрессируются разные комбинации адгезионных молекул и рецепторов хемокинов, которые определяют различия во взаимодействии этих клеток с эндотелием и пути их миграции [10].

Все гликополимеры в течение первого часа культивирования увеличивали на мембранах нейтрофилов количество молекул CD16, которые могут играть важную роль в формировании иммунного ответа. Взаимодействие Fc-фрагмента иммуноглобулина G с циркулирующими

иммунными комплексами запускает различные механизмы клеточного ответа, включая активацию клеток, фагоцитоз, респираторный взрыв, антителозависимую клеточную цитотоксичность и секрецию провоспалительных медиаторов [7]. Дальнейшая инкубация с гликополимерами в течение 4 часов вызывала снижение количества рецепторов CD16 на мембранах нейтрофилов, вероятно, за счет шеддинга. Шеддинг молекул, наиболее выраженный в пробах с ЛПС, может свидетельствовать об апоптозе нейтрофилов [12] и увеличивать количество растворимых молекул CD16, которые осуществляют регуляторную функцию провоспалительных процессов, взаимодействуя с моноклеарами крови через рецепторы комплемента (CR3 и CR4) и индуцируя продукцию интерлейкинов 6 и 8 моноцитами [9].

CD69 не экспрессируется на покоящихся лимфоцитах, в том числе и на натуральных киллерах, но появляется после их активации в течение 1–2 часов после возбуждения. Увеличение уровня экспрессии CD69 на этих клетках (CD16⁺) индуцировали все исследованные гликополимеры, однако более значительный эффект наблюдался после воздействия О-ПС и ОК. Рецептор CD69 увеличивает цитотоксические свойства клеток, участвуя в лизисе, осуществляемом активированными натуральными киллерами [8].

Поскольку экспрессию CD25 принято считать маркером пролиферации [8], можно предположить, что ЛПС в большей степени увеличивает пролиферацию натуральных киллеров, в то время как его безлипидные фрагменты – О-ПС и ОК – эффекторную популяцию клеток CD69⁺ с выраженными цитотоксическими свойствами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛПС *P. nigrifaciens* штамма КММ156 и его безлипидные компоненты оказывают активирующее действие на клетки врожденного иммунитета. ЛПС в большей степени увеличивает эффекторные функции моноцитов и пролиферативный потенциал натуральных киллеров, инициирует апоптоз нейтрофилов. Безлипидные компоненты О-ПС и ОК, оказывая действие на все исследуемые клетки, в большей степени увеличивают субпопуляцию натуральных киллеров CD69⁺. В связи с этим представляется перспективным дальнейшее исследование этих гликополимеров для определения возможности использования их в качестве агонистов рецепторов врожденного иммунитета.

References

- Gorshkova N.M. Taxonomic criteria in the systematics of marine aerobic proteobacteria: abstracts, thesis, Vladivostok, 2000. 26 p.
- Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Zubkov A.A. et al. The structure of the repeating unit of acidic polysaccharide *Alteromonas haloplanktis* КММ156, *Bioorgan. himija*. 1993. Vol. 19, No. 3, P. 327–336.
- Krasikova I.N., Kapustina N.V., Isakov V.V. et al. Establishing the structure of lipid A from the marine gram-negative bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393t, *Bioorganicheskaja himija*. 2004. Vol. 30, No. 4. P. 409–416.
- Smolin V.A. Mathematical modeling in geology and geophysics (statistics). Vladivostok: FENTU, 2007. 232 p.

- Smolina T.P., Gorshkova R.P., Nazarenko E.L. et al. Blocking adhesion of *Yersinia pseudotuberculosis* by polysaccharides isolated from marine microorganisms *Pseudoalteromonas*, *Pacific Medical Journal*. 2001. No. 2. P. 18–20.
- Smolina T.P., Zaporozhec T.S., Gorshkova R.P., Nazarenko E.L. Early activation of lymphocytes and monocytes of peripheral blood components proteobacteria *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Pacific Medical Journal*. 2009, No. 3. P. 45–48
- Brunkhorst B.A., Strohmeier G., Lazzari K. et al. Differential roles of Fc gamma RII and Fc gamma RIII in immune complex stimulation of human neutrophils, *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, No. 15. P. 20659–20666.
- Frey E.A., Miller D.S., Jahr T.G. et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide, *J. Exp. Med.* 1992. Vol. 176. P. 1665–1671.
- Galon J., Gauchat J.F., Mazieres N. et al. Soluble Fc gamma receptor type III (Fc gamma RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors, *J. Immunol.* 1996. Vol. 157. P. 1184–1192.
- Grage-Griebenow E., Flad H. D., Ernst M. et al. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates, *Immunobiology*. 2000. Vol. 202. P. 42–50.
- Landmann R., Knopf H.-P., Link S. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide, *Infection and immunity*. 1996. Vol. 64, No. 5. P. 1762–1769.
- Moulding D.A., Hart C.A., Edwards S.W. Regulation of neutrophil Fc gamma RIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate, *J. of Leukocyte Biology*. 1999. Vol. 65. P. 875–882.
- Xia Y., Yamagata K., Krukoff T.L. Differential expression of the CD14/TLR4 complex and inflammatory signaling molecules following i.c.v. administration of LPS, *Brain Res.* 2006. Vol. 1095, No. 20. P. 85–95.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

MARINE PROTEOBACTERIUM GLYCOPOLYMERS AS PROMISING ACTIVATORS OF HUMAN INNATE IMMUNITY CELLS

T.P. Smolina¹, T.A. Kuznetsova¹, E.L. Nazarenko², N.N. Besednova¹

¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ²Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of FEBRAS (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The paper describes effects from lipopolysaccharide (LPS) extracted from marine proteo-bacterium *Pseudoalteromonas nigrifaciens* (strain КММ156) and its structural components on the activation of neutrophils, monocytes and natural killer cells in human blood. The cell activation was assessed by the changes in expression levels of membranous cluster differentiation (CD) on the natural killer cell surface (CD69 и CD25), membranes of monocytes and neutrophils (CD14 и CD16). The lipopolysaccharide and its lipid-free components have activated the innate immunity cells. The lipopolysaccharide caused shedding of membrane molecules CD14 with monocytes and, compared to the control group, considerably increased CD14⁺CD16⁺ cell population with a number of effector properties and a great potential for antigen-presenting activity. O-Specific Polysaccharide and core oligosaccharide have increased population of CD14⁺CD16⁺ monocytes to a lesser extent. Enhancing expression of signalling molecules (CD14) and immunoglobulins (CD16) on the neutrophils, the glycopolymers have induced the cells activation. In case of natural killer cells, the lipopolysaccharides have to a greater extent enhanced expression of CD25 (cell-doubling capacity), and the O-specific polysaccharide and core oligosaccharide has induced expression of CD69 (marker of cytotoxic functions).

Key words: lymphocytes, lipopolysaccharide of proteobacterium, monocytes, neutrophils.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 59–62.

УДК 616-056.43:577.22

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-13 И СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГОПАТОЛОГИЕЙ

Д.В. Бахаев¹, А.М. Стенкова¹, Ю.В. Иванова², О.В. Щеголева², Е.В. Просекова², В.А. Рассказов¹, М.П. Исаева¹¹Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),²Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, интерлейкин-13, глутатион-S-трансферазы, аллергические заболевания.

Представлены результаты генотипирования интерлейкина-13 в отношении трех полиморфных локусов (-1512A>C, -1112C>T и +2044G>A), а также исследования нуль-полиморфизма генов *M1* и *T1* глутатион-S-трансфераз (GST) у детей Владивостока с аллергическими заболеваниями (73 человека) и без аллергопатологии (27 человек). В ходе исследования не установлено связи «нулевых» генотипов *GSTM1* и *GSTT1* с развитием аллергических заболеваний. Обнаружено значимое преобладание гетерозиготного носительства варианта -1112C/T среди больных (58% против 22,2% в контроле). В группе детей с клиническими проявлениями аллергических заболеваний достоверно чаще встречались гетерозиготные состояния одновременно по 2–3 полиморфным локусам (48,4% против 18,5% в контроле). Генотипирование интерлейкина-13 по трем полиморфным локусам может быть рекомендовано к использованию как дополнительный критерий групп риска реализации аллергических заболеваний.

Аллергические заболевания по распространенности, склонности к хронизации и социально-экономическому ущербу помещены в группу глобальных проблем здравоохранения [4]. В основе развития аллергических заболеваний, таких как атопическая бронхиальная астма, атопический дерматит и аллергический ринит, лежит иммуноглобулин-Е-зависимое аллергическое воспаление. Исходя из сложнаследуемой (мультифакториальной) природы этой группы заболеваний, определяемой комплексным взаимодействием генетических и средовых факторов, важной задачей становится выяснение «неблагоприятных» сочетаний полиморфных вариантов генов, которые с высокой долей вероятности могут привести к развитию аллергопатологии.

Центральную роль в аллергическом воспалении играет секретлируемый Т-хелперами 2-го типа интерлейкин-13 (IL-13), ключевыми свойствами которого являются переключение В-лимфоцитов на синтез иммуноглобулина Е, индукция бронхиальной гиперреактивности и гиперсекреции слизи, активация эозинофилов и привлечение их в очаг воспаления [1, 5, 7, 14]. Очевидно, что полиморфизм гена IL-13 (*Arg130Gln*) определяет разнообразие его фенотипических проявлений. К настоящему времени в этом гене идентифицирован ряд мутаций, наиболее общими из которых являются две в промоторном участке (-1512A>C и -1112C>T) и одна в кодирующей части (+2044G>A). Показано, что мутации в промоторной части гена вызывают

увеличение транскрипции IL-13, а миссенс-мутация +2044A (замена *Arg130* на *Gln*) приводит к появлению функционально-активного варианта цитокина и увеличению уровня сывороточного иммуноглобулина Е [8, 9, 13]. При сочетании мутаций по локусам -1112T/T и +2044A/A наблюдается синергичный эффект в виде гиперэкспрессии высокоактивного варианта IL-13 [13]. К генам, предрасполагающим к развитию аллергических заболеваний, т.е. способным влиять на увеличение аллергенной нагрузки в условиях, например, сниженной активности биотрансформации ксенобиотиков и медиаторов воспаления, относят гены глутатион-S-трансфераз (GST). Для них характерен высокий полиморфизм, при котором белковый продукт может отсутствовать или различаться по уровню ферментативной активности [3, 6]. Полиморфизм по «нулевым» аллелям, описанный для генов *GSTM1* и *GSTT1*, наиболее интенсивно изучается при различных патологиях, в том числе атопической бронхиальной астме и атопическом дерматите, при этом литературные данные об ассоциации «нулевых» типов этих генов с риском развития аллергопатологии противоречивы [2, 10–12].

Целью настоящего исследования явился анализ полиморфизма гена IL-13 в отношении трех полиморфных локусов (-1512A>C, -1112C>T и +2044G>A), а также нуль-полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* у детей с аллергопатологией.

Материал и методы. Обследованы 73 ребенка с атопической бронхиальной астмой, аллергическим ринитом и атопическим дерматитом в возрасте 3–15 лет. В качестве контроля послужила группа сверстников (27 человек) без каких-либо признаков аллергопатологии и с неотягощенным наследственным анамнезом. Материалом для получения ДНК служили лейкоциты периферической крови или эпителиальные клетки слизистой оболочки щеки. ДНК выделяли с использованием набора Genomics DNA Purification Kit (Fermentas, Евросоюз). Генотипирование ДНК-полиморфизмов гена IL-13 проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, используя структуры праймеров, температурный режим и условия анализа, описанные в работе P.E. Graves et al. [8]. Детекцию полиморфных маркеров I/D генов *GSTM1* и *GSTT1* выполняли с использованием наборов ГосНИИгенетики (Москва). Содержание общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови определяли с использованием тест-системы фирмы «ВекторБест» (Новосибирск). Статистическую обработку материала

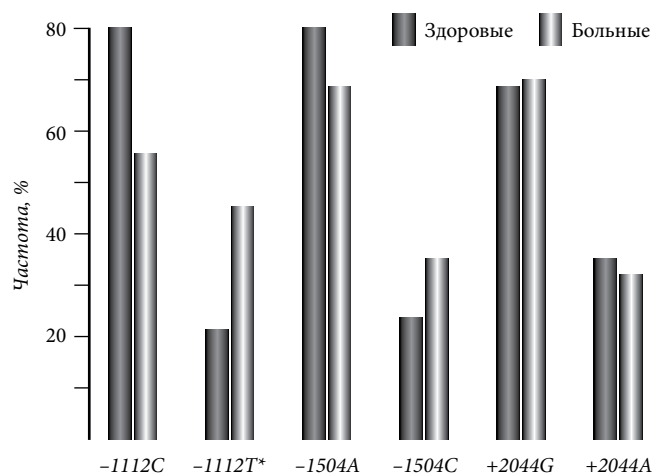


Рис. 1. Распределение аллелей гена IL-13 у здоровых детей и детей с аллергическими заболеваниями (* – разница статистически значима).

проводили в программе Statistica 6. При сравнении частот генотипов применяли стандартный критерий χ^2 Пирсона. При условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса. Отношение шансов подсчитывали по методу Woolf с 95 %-ным доверительным интервалом.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Число генов-кандидатов предрасположенности к аллергическим заболеваниям достаточно велико, тем не менее, исходя из особенностей развития данной патологии, первостепенными для исследований являются гены, ответственные за гипериндукцию синтеза иммуноглобулина Е – одного из основных маркеров аллергопатологии. По нашим данным, частота встречаемости аллеля +2044G (*Arg130*) составила 67,4 % в группе детей с аллергопатологией и 66,1 % среди здоровых лиц, а частота встречаемости минорного аллеля +2044A (*Gln130*) – 32,6 и 33,9 % соответственно. В группе здоровых частота встречаемости нормальных аллелей -1112C и -1504A была одинаковой и составила 78 % (доля минорных аллелей – 22 %). Однако в группе с аллергическими заболеваниями наблюдалось преобладание минорных аллелей -1112T и -1504C, но статистически значимым было только увеличение частоты встречаемости аллеля -1112T (рис. 1, табл.).

Анализ распределений генотипов зафиксировал неравномерность для всех трех полиморфных локусов гена IL-13 (табл.). Статистический анализ распределений генотипов не дал достоверно значимых различий, за исключением -1112C/T: гетерозиготное носительство этого варианта наблюдалось среди больных в 2 раза чаще (58 % против 22,2 % в контроле). Следует отметить, что распределение генотипов -1504A>C в группе контроля было близким к распределению полиморфных вариантов в европейской популяции (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1881457), тогда как распределение генотипов по полиморфному локусу -1112C>T соответствовало этнически смешанной популяции (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800925).

Таблица
Распределение генотипов IL-13 и GST у здоровых детей и детей с аллергическими заболеваниями, %

| Генотип | Здоровые | | | Больные | | |
|---------------|----------|--------------|---------|---------|--------------|---------|
| | норма | гетерозигота | мутация | норма | гетерозигота | мутация |
| IL-13-1504A>C | 59,3 | 37,0 | 3,7 | 41,9 | 48,4 | 9,7 |
| IL-13-1112C>T | 66,7 | 22,2 | 11,1 | 25,8 | 58,0 | 16,1 |
| IL-13+2044G>A | 50,0 | 32,1 | 17,9 | 50,7 | 33,3 | 16,1 |
| GSTM1 | 42,0 | – | 58,0 | 46,1 | – | 52,9 |
| GSTT1 | 88,0 | – | 12,0 | 83,8 | – | 16,2 |

Примечание. Норма: A/A – для IL-13-1504, C/C – для IL-13-1112, G/G – для IL-13+2044, 0/+ или +/+ – для GSTM1 и GSTT1; мутация: C/C – для IL-13-1504, T/T – для IL-13-1112, A/A – для IL-13+2044, 0/0 или 0/0 – для GSTM1 и GSTT1; гетерозигота: A/C – для IL-13-1504, C/T – для IL-13-1112, G/A – для IL-13+2044.

Интересными являются данные, полученные по распределению генотипов по локусу +2044G>A: частота их регистрации у аллергиков и здоровых детей была практически одинаковой и в обеих группах наблюдался довольно высокий процент гомозигот (табл.). Аналогично высокая частота гомозигот A/A (17,4 %) характерна для испанской популяции (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=20541). Полученные результаты отличаются от ранее опубликованных [8, 9] и могут свидетельствовать об отсутствии решающей роли данной мутации в развитии аллергических заболеваний у детей во Владивостоке. Ранее в японской и британской популяциях была выявлена ассоциация полиморфизма +2044A (*Gln130*) с атопической бронхиальной астмой, но не с увеличением уровня сывороточного иммуноглобулина Е [9].

При сравнении распределения генотипов GSTM1 и GSTT1 в группе контроля было обнаружено их соответствие литературным данным [11]. В распределении этих «нулевых» генотипов, а также их комбинаций в исследуемой и контрольной группах значимых различий обнаружено не было. Частоты «нулевых» генотипов GSTM1 и GSTT1 составили 52,9 и 16,2 % у больных против 58 и 12 % у здоровых соответственно. Мы проанализировали также нуль-полиморфизм GSTM1 и GSTT1 в группах детей с бронхиальной астмой (21 человек) и с бронхиальной астмой в сочетании с аллергическим ринитом (31 человек) как наиболее многочисленных. Распределение относительных частот «нулевых» генотипов у детей с аллергическими заболеваниями мало отличалось от распределения в группе контроля: GSTM1 0/0 при бронхиальной астме встретился в 48 %, при бронхиальной астме в сочетании с аллергическим ринитом – в 55 %, в контрольной группе – в 58 % случаев. GSTT1 0/0 в группе зарегистрирован при бронхиальной астме в 14 %, при бронхиальной астме в сочетании с аллергическим ринитом – в 16 %, в контрольной группе – в 12 % случаев. Сочетание «нулевых» генотипов также было неинформативным (8 % случаев у здоровых против 5 и 6 % случаев

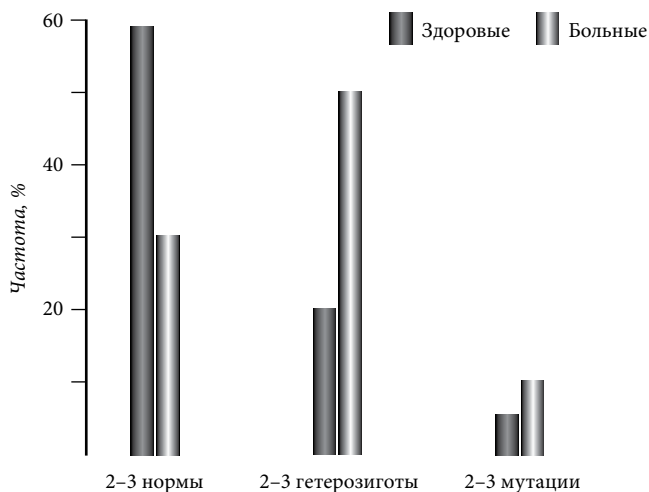


Рис. 2. Частота одновременного носительства генотипов IL-13 у здоровых детей и у детей с аллергическими заболеваниями.

в группах больных). Полученные данные показывают, что влияние полиморфных вариантов *GSTM1* и *GSTT1* на атопию в рамках изучаемой выборки было незначимым, что также согласуется с результатами других исследований [2, 12].

Нами также были проанализированы случаи одновременного носительства нормальных и минорных аллелей IL-13 (рис. 2). В группе детей с аллергопатологией достоверно чаще встречались гетерозиготные состояния одновременно по 2–3 полиморфным локусам (48,4 % против 18,5 % в контроле; отношение шансов – 4,1). У детей без аллергопатологии достоверно чаще наблюдалось одновременное носительство нормальных аллелей по разным локусам (55,6 % против 29 %). Одновременное носительство 2–3 мутаций гена IL-13 было достаточно редким явлением, чаще наблюдаемым в группе больных (9,7 %), чем здоровых (3,7 %). Важно отметить, что +2044G/A и –1112C/T проявляют высокую аддитивность, в результате чего наблюдается и гиперэкспрессия, и сверхактивность IL-13 [13].

Анализ полиморфизма генов IL-13 и глутатион-S-трансфераз показал перспективность исследования ассоциаций генотипов только для IL-13. Мы полагаем, что генотипирование здесь по трем полиморфным локусам информативно как критерий выделения групп риска реализации аллергических заболеваний у детей. В перспективе желательно расширение объемов выборок, а также включение других генов-кандидатов атопии для дальнейших исследований в этом направлении.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-98547_р-восток_а.

References

1. Kaznacheev V.A., Gervaziev Ju.V. The role of cytokines gene polymorphisms and their receptors in the development of atopic asthma, *Astma*. 2004. Vol. 5, No. 1. P. 73–84.
2. Frejdin M.B., Bragina E.Ju., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P. [Glutathione transferase gene polymorphism $\theta 1$ and $\mu 1$ (*GSTT1* and *GSTM1*) in patients with atopic asthma in Western Siberia region, *Molekuljarnaja biologija*. 2002. Vol. 36, No. 4. P. 630–634.

3. Frejdin M.B., Bragina E.Ju., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P. The genetics of atopy: current status, *Vestnik VOGiS*. 2006. Vol. 10, No. 3. P. 492–503.
4. Haitov R.M., Ilina N.I., Latysheva T.V. Rational pharmacotherapy of allergic diseases. M.: Litterra, 2007. 504 p.
5. Cameron L., Webster R.B., Stempel J.M. et al. Th2-selective enhancement of human IL-13 transcription by IL-13–1112C>T, a polymorphism associated with allergic inflammation, *J. Immunol.* 2006. Vol. 177. P. 8633–8642.
6. Eaton D.L. Concise Review of the Glutathione S-Transferases and their Significance to Toxicology, *Toxicological sciences*. 1999. Vol. 49. P. 154–164.
7. Georas S.N., Gue J., Fanis U.D., Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease, *European respiratory journal*. 2005. Vol. 26. P. 933–947.
8. Graves P.E., Kabesch M., Halonen M. et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000. Vol. 105. P. 506–513.
9. Heinzmann A., Mao X.Q., Akaiwa M. et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy, *Hum Mol Genet.* 2000. Vol. 9. P. 549–559.
10. Islam T., Berhane K., McConnell R. et al. Glutathione-S-transferase (*GST*) P1, *GSTM1*, exercise, ozone and asthma incidence in school children, *Thorax*. 2009. Vol. 64. P. 197–202.
11. Minelli C., Granell R., Newson R. et al. Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a Human Genome Epidemiology (HuGE) systematic review and meta-analysis including unpublished data, *Int. J. Epidemiol.* 2010. Vol. 39. P. 539–562.
12. Vavilin V.A., Safronova O.G., Lyapunova A.A. et al. Interaction of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* genotypes in determination of predisposition to atopic dermatitis, *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003. Vol. 136. P. 388–391.
13. Vladich F.D., Brazille S.M., Stern D. et al. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation, *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115. P. 747–754.
14. Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X. et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma, *Science*. 1998. Vol. 282. P. 2258–2261.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

POLYMORPHISM OF INTERLEUKIN-13 GENES AND XENOBIOTIC DETOXIFICATION SYSTEMS IN CHILDREN WITH ALLERGIC PATHOLOGY

D.B. Bakhaev¹, A.M. Stenkova¹, Yu. V. Ivanova², O.V. Schegoleva², E.V. Prosekova², V.A. Rasskazov¹, M.P. Isaeva¹

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Prospekt, Vladivostok, 690022 Russian Federation),

²Vladivostok State Medical University (2, Ostryakova Prospekt, Vladivostok, 690950 Russian Federation)

Summary – The paper provides results of interleukin-13 genotyping with respect to three polymorphous locuses (–1512A>C, –1112C>T and +2044G>A) as well as studies on zero-polymorphism of genes M1 and T1 glutathione-S-transferase in children living in Vladivostok diagnosed with allergic diseases (73 patients) and allergic pathology-free (27 patients). As reported, there are no incidences that the “zero” genotypes *GSTM1* and *GSTT1* cause allergic diseases. There has been considerable prevalence of heterozygous carrier state of 1112C/T among the patients (58 % against 22.2 % in control). The heterozygous states were reliably more often observed simultaneously by 2 or 3 polymorphous locuses (48.4 % against 18.5 % in control) in children with clinical manifestations of the allergic diseases. The interleukin-13 genotyping by three polymorphous locuses can be recommended for applying as additional criterion of risk groups for the allergic diseases.

Key words: genetic polymorphism, interleukin-13, glutathione-S-transferase, allergic diseases.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 63–65.

УДК 618733:612.438:618.29

АНТЕНАТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ТИМУСА ПЛОДА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ГЕСТАЦИИ

С.М. Колесникова¹, Е.А. Левкова^{1,2}, О.А. Гребеняк²¹Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения (680009 г. Хабаровск, ул. Краснодарская, 9),²Перинатальный центр (680028 г. Хабаровск, ул. Истомина, 85)

Ключевые слова: плод, вилочковая железа, гестация, ультразвуковой метод.

При помощи ультразвукового метода изучено формирование тимуса плода при различных типах гестации. Установлено, что патологическое течение беременности оказывает влияние на развитие вилочковой железы. Показатели плодов у беременных с гестозом достоверно превышали идентичные в группе контроля по триместрам беременности. У плодов, развивающихся в условиях угрозы прерывания беременности, ко II триместру объем органа превышал идентичные показатели в группе контроля, а к III триместру отмечено уменьшение объема вилочковой железы по сравнению с группой контроля.

Изучение закономерностей развития различных органов и тканей является одной из предпосылок создания общих концепций онтогенеза. Это в полной мере справедливо и в отношении вилочковой железы – важнейшего органа иммунной системы. Большинство исследователей подчеркивают, что чаще всего причиной перинатальной заболеваемости являются различные патологические процессы в системе «мать–плацента–плод» [1, 2, 5, 6]. Очевидно, что период внутриутробного развития является наиболее перспективной моделью для изучения становления функции органов и систем, особенно иммунной системы при различных типах гестации. На этой основе возможна разработка критериев риска возникновения патологии данной системы.

Цель настоящей работы – анализ влияния осложненного течения беременности на формирование тимуса плода в различные периоды онтогенеза.

Материал и методы. Группы исследования были сформированы исходя из особенностей течения гестационного процесса:

1-я группа – 38 женщин с физиологическим течением беременности,

2-я группа – 42 женщины с угрозой прерывания беременности,

3-я группа – 35 женщин с ОПГ-гестозом.

С помощью ультразвука исследовали вилочковую железу плода. Этот вид исследования при сроке гестации 14 недель был сделан впервые. Помимо топографических особенностей и формы вилочковой железы оценивали контуры органа, его эхогенность, однородность, линейные и объемные показатели. Исследования проводили по триместрам беременности.

Результаты исследования. При физиологическом течении беременности во всех случаях контуры железы

были четкими, ровными, структура имела среднюю эхогенность с незначительным количеством линейных включений. Эхографическая оценка линейных размеров тимуса в этой группе наблюдения позволила установить увеличение его размеров по мере увеличения продолжительности гестации. Размеры органа увеличивались соответственно росту плода. Показатели объема и массы тимуса у плодов 1-й группы также увеличивались соответственно триместрам беременности, но самый активный рост отмечен во II триместре (табл. 1).

В то же время параметры вилочковой железы у плодов из 2-й группы имели отличия от аналогичных показателей при физиологическом течении беременности как по линейным, так и по объемным параметрам (табл. 2)

При сравнении параметров тимуса отмечено, что в группе с угрозой прерывания беременности средняя длина органа была меньше нормы (1-я группа). Далее в этой группе наблюдения во II триместре этот параметр увеличивался в 1,2 раза по сравнению с нормой, а в III триместре он снова становился ниже нормы. Толщина вилочковой железы во все сроки наблюдения в 1-й и 2-й группах статистически значимо не различалась. Ширина тимуса при угрозе прерывания беременности менялась, как и длина, имея низкие значения в I триместре, превышая норму во II триместре (в 1,3 раза) и уменьшаясь по сравнению с 1-й группой в III триместре беременности. Аналогичные изменения претерпевал и объем вилочковой железы: в I триместре он был меньше нормы, во II триместре превышал

Таблица 1

Характеристика параметров тимуса при физиологическом течении беременности

| Триместр | Длина, см | Толщина, см | Ширина, см | Объем, см ³ |
|----------|-----------|-------------|------------|------------------------|
| I | 1,01±0,08 | 0,30±0,08 | 0,13±0,07 | 0,17±0,07 |
| II | 2,05±0,24 | 0,88±0,11 | 2,31±0,22 | 2,09±0,71 |
| III | 2,95±0,21 | 1,31±0,08 | 2,93±0,20 | 5,69±1,10 |

Таблица 2

Характеристика параметров тимуса при угрозе прерывания беременности

| Триместр | Длина, см | Толщина, см | Ширина, см | Объем, см ³ |
|----------|-----------|-------------|------------|------------------------|
| I | 0,74±0,07 | 0,25±0,06 | 0,85±0,12 | 0,09±0,02 |
| II | 2,46±0,23 | 0,92±0,14 | 2,52±0,21 | 3,28±0,66 |
| III | 2,60±0,32 | 1,15±0,07 | 2,65±0,39 | 3,55±1,36 |

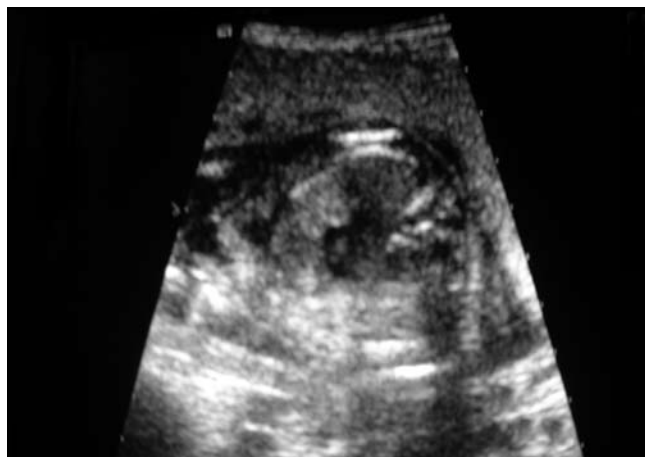


Рис. 1. Беременность 34 недели, фетоплацентарная недостаточность, 2-я степень задержки роста плода, маловодие, угрожающие преждевременные роды:

изменения структуры тимуса в виде повышения эхогенности левой доли, неровности контуров, уменьшения объема ($3,47 \text{ см}^3$); отмечалось критическое нарушение маточно-плацентарно-плодового кровотока III степени, тяжелая гипоксия плода.

ее в 1,4 раза и в III триместре снижался в 1,6 раза по сравнению с показателями 1-й группы.

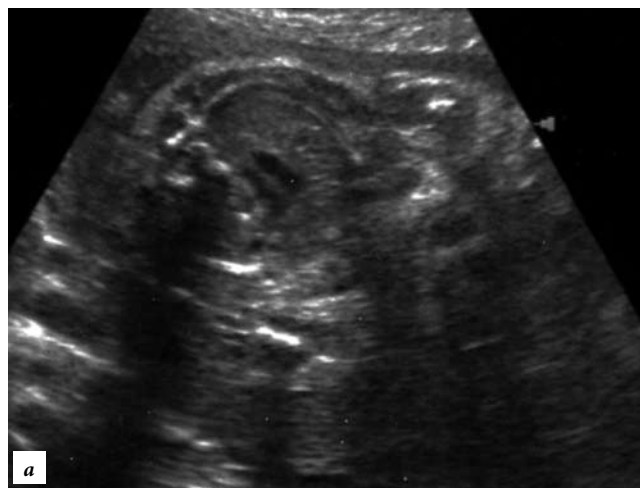
Уменьшение размеров вилочковой железы при угрозе прерывания беременности отмечалось в 85 % случаев, и чаще после 30-й недели гестации. На фоне уменьшенных размеров у 98 % плодов были выявлены неровные контуры органа, в 82 % наблюдений было отмечено повышение его эхогенности за счет гиперэхогенных включений (рис. 1). При физиологическом течении беременности вышеперечисленных изменений в эхографической картине вилочковой железы не отмечено. Чаще всего во 2-й группе описанная ультразвуковая картина наблюдалась при субкомпенсированной и декомпенсированной формах фетоплацентарной недостаточности. Следует отметить, что в 6 случаях в этой группе (15 %) зарегистрировано увеличение объемных показателей и во II, и в III триместрах. Дополнительное исследование здесь позволило выявить у женщин высокую степень базальной контаминации ассоциациями *Cytomegalovirus hominis*, *Chlamidia trachomatis* и *Candida albicans*.

В результате сопоставления параметров тимуса у плодов при физиологической беременности и гестозе (3-я группа) выявлено достоверное увеличение длины и ширины органа по сравнению с нормой. Объем органа у плодов в группе беременных с гестозом уже в I триместре значимо увеличивался, но особенно интенсивно (в 19 раз) это происходило во II триместре беременности (табл. 3). При динамическом наблюдении в

Таблица 3

Характеристика параметров тимуса при гестозе

| Триместр | Длина, см | Толщина, см | Ширина, см | Объем, см^3 |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| I | $1,21 \pm 0,06$ | $0,36 \pm 0,07$ | $1,14 \pm 0,04$ | $0,19 \pm 0,06$ |
| II | $2,15 \pm 0,21$ | $1,12 \pm 0,07$ | $3,13 \pm 0,23$ | $4,58 \pm 0,04$ |
| III | $3,21 \pm 0,07$ | $1,43 \pm 0,06$ | $3,51 \pm 0,26$ | $7,26 \pm 0,23$ |



а



б

Рис. 2. Эхограмма тимуса плода у беременной с ранним гестозом на фоне хронического пиелонефрита, 32-я неделя гестации, у матери зафиксирована смешанная вирусно-бактериальная инфекция (*Herpes simplex* и *Chlamydia trachomatis*):

а – увеличение ширины и изменение структуры органа, объем $23,22 \text{ см}^3$ (в 2,3 раза больше нормы); б – кальцификаты в паренхиме вилочковой железы.

32–35 недель указанные параметры достоверно отличались в сторону увеличения (в 2,4 раза) от идентичных в 22–25 недель. Особенностью данной группы наблюдения явилось сочетание увеличения вилочковой железы с многоводием – в 72 % случаев.

К эхографическим признакам гиперплазии были отнесены увеличение объема железы за счет увеличения ее линейных размеров с преимущественным отклонением в толщине и ширине (рис. 2).

Обсуждение полученных данных. Мы считаем, что большое увеличение размеров вилочковой железы у плодов 3-й группы было обусловлено гипокортицизмом в системе «мать–плацента–плод». Основанием для этого послужили обнаруженные у беременных этой группы явления инфекционного плацентита, приводившего к развитию маточно-плацентарной недостаточности, когда резко снижается синтез гормонов надпочечников у женщин и синтез промежуточных форм глюкокортикоидов в плаценте и у плода [3, 4]. Эти данные подтверждаются выраженной инфекционной контаминацией, зафиксированной в группе

беременных с гестозом. *Chlamidia trachomatis* была выявлена в 42 % случаев, *Mycoplasma hominis* – в 34 %, *Herpes simplex* и *Cytomegalovirus hominis* – в 54 и 42 % наблюдений соответственно. В 38 % случаев отмечалась ассоциация *Chlamidia trachomatis* и *Herpes simplex*. Сопоставляя полученные показатели размеров тимуса у плодов, можно заключить, что доминирование гиперплазии тимуса отмечалось чаще при 1-й и 2-й степени тяжести гестоза, и только в 13 % случаев при декомпенсированной форме фетоплацентарной недостаточности была зафиксирована гипоплазия вилочковой железы.

Таким образом, тимус у плодов, развивающихся в условиях длительной угрозы прерывания беременности, уже с I триместра начинает изменяться по сравнению с нормой и ко II триместру объем железы значительно увеличивается. Максимальные изменения регистрируются в III триместре и характеризуются уменьшением объема железы, неровностью контуров и появлением гиперэхогенных включений в паренхиме. Величина тимуса у плодов, развивающихся в условиях гестоза, превышает норму в течение всей беременности, но максимальное увеличение объема отмечается во II триместре. Увеличение показателей параметров тимуса у плодов часто регистрируется у беременных с инфекцией. Полученные результаты необходимо учитывать в практике неонатолога в первую очередь при формировании групп риска прогноза нарушения адаптации.

References

1. Abramenko V.V., Shabalov N.P. Clinical perinatology. Petrozavodsk: IntelTek, 2004. 424 p.
2. Kinsht D.N., Verewagin E.I., Pasman N.M. Late preeclampsia as a systemic inflammatory reaction, *Vestnik intensivnoj terapii*. 1999. No. 2. P. 23–28.
3. Kobozeva N.V., Gurkin Ju.A. Perinatal endocrinology. L.: Medicina, 1982. 310 p.
4. Kroshkina N.V., Sotnikova N.Ju., Skripkina I.Ju. Features of the immune response in pregnant women on early stages of gestation with subsequently developed preeclampsia, *Medicinskaja immunologija*. 2004. Vol. 6, No. 3–5. P. 381.
5. High risk infants / eds. V.I. Kulakova, Ju.I. Barashneva. M.: GJeOTAR-Media, 2006. 528 p.
6. Suhih G.T., Vanko L.V. The immunology of pregnancy. M.: Izd-vo RAMS, 2002. 400 p.

Поступила в редакцию 26.01.2011.

ANTENATAL ASPECTS OF FOETAL THYMUS FORMATION IN CASE OF VARIOUS GESTATION TYPES

S.M. Kolesnikova¹, E.A. Levkova^{1,2}, O.A. Grebenyak²

¹Postgraduate Institute for Public Health Workers (9 Krasnodarskaya St. Khabarovsk 680009 Russian Federation), ²Perinatal Centre (85 Istomina St. Khabarovsk 680028 Russian Federation)

Summary – The ultrasound method allows studying the foetal thymus formation in case of various gestation types and identifying that the pathological course of pregnancy affects the thymus gland development. The parameters of foetuses in pregnant women with gestational toxicosis reliably increase those of the control group by pregnancy trimesters. In foetuses developing under threatened miscarriage by the II trimester the volume of this organ exceeded the parameters of those of control group, and by the III trimester there was a reduction of the thymus gland compared to the control group.

Key words: foetus, thymus gland, gestation, ultrasound method.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 66–68.

УДК 616.883-06:[616.98:579.842.23]-078

ВЕРИФИКАЦИЯ И КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОРАЖЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ИЕРСИНИОЗНОЙ ЭТИОЛОГИИ

О.П. Вострикова¹, О.Д. Новикова¹, Т.А. Горбач², Н.Н. Рябова², О.Ю. Портнягина¹, В.А. Хоменко¹, Г.Г. Павлова²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),

²Медицинское объединение ДВО РАН (690068 г. Владивосток, ул. Кирова, 95)

Ключевые слова: иерсиниозы, диагностика, белки-порины, иммунный статус.

Показана эффективность использования разных молекулярных форм неспецифического порообразующего белка – видоспецифического антигена наружной мембраны *Yersinia enterocolitica* для выявления иерсиниозной этиологии заболеваний периферической нервной системы. Проведен анализ некоторых показателей специфического гуморального иммунного ответа у пациентов с поражениями периферической нервной системы в зависимости от стадии заболевания. Иммунологическое обследование лиц с острой формой заболевания выявило существенные изменения показателей иммунного статуса, характерных для вторичных иммунодефицитных состояний.

Иерсиниозы остаются социально-значимой проблемой медицины, поскольку отличаются от других острых кишечных инфекций возможностью перехода во вторично-очаговые формы и формированием

иммунопатологических состояний [1, 10, 13, 15]. Последние рассматриваются как аутоиммунные процессы, вследствие того, что иерсинии проявляют антигенную мимикрию, т.е. обладают антигенами, сходными с антигенами тканей органов человека [7, 11, 15]. Согласно современным представлениям, аутоиммунные проявления при иерсиниозах относятся к вторичным иммунодефицитным состояниям [5, 9, 10].

Иммунопатологические процессы, обусловленные иерсиниозом, характеризуются полиорганностью поражения и сопровождаются нарушениями функций сердечно-сосудистой и нервной систем, опорно-двигательного аппарата, мочевыводящей системы и желудочно-кишечного тракта [1, 6, 15]. После иерсиниоза, перенесенного в среднетяжелой или тяжелой форме, в 40 % случаев отмечаются поражения нервной системы в виде серозного или гнойного менингита, менингоэнцефалита, невралгий (по типу межреберной и затылочной)

Вострикова Ольга Павловна – канд. хим. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОУ ДВО РАН; e-mail: olgavostrik@yandex.ru

и более в пояснично-крестцовом отделе [6, 14]. Причины возникновения поражений нервной системы при иерсиниозах пока не находят объяснения.

Иммунопатогенез вторично-очаговых форм иерсиниозов изучен недостаточно. В литературе имеются лишь единичные сообщения, свидетельствующие о существенных изменениях в гуморальном и клеточном звене иммунного ответа у детей [10, 14]. Этиологическая верификация поражений нервной системы представляет собой сложную задачу: во-первых, ввиду того, что проявление неврологической симптоматики, как правило, отсрочено и, во-вторых, из-за отсутствия эффективных и специфичных методов диагностики [1, 9–11, 14]. В этой связи разработка способов верификации различных форм иммунопатологии, обусловленной иерсиниями, а также повышение эффективности патогенетической терапии, основанной на анализе клинико-иммунологических показателей, является актуальной задачей практической медицины.

Целью данного исследования явилась апробация тест-системы на основе порина из *Yersinia enterocolitica*, разработанной нами ранее для дифференциальной диагностики острой формы иерсиниоза [8] и для выявления иммунопатологии, обусловленной иерсиниями.

Как известно, порины наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий, представляющие собой видо- и родоспецифические антигены, могут быть выделены в различных молекулярных формах (тримерной и мономерной), отличающихся пространственной и антигенной структурой. Как показали наши исследования, у тримера порина выявлены два типа антигенных детерминант – конформационные (или прерывистые) и линейные [12]. Конформационные детерминанты формируются на уровне третичной (четвертичной) структуры белка и разрушаются при термоденатурации тримера, сопровождающейся диссоциацией порина на мономеры. У мономера порина выявлены линейные детерминанты, определяющиеся аминокислотной последовательностью белка, и детерминанты, формирующиеся на уровне вторичной структуры порина [12].

В задачи настоящей работы входили сравнительный анализ эффективности использования тримерной и мономерной форм порина НМ *Y. enterocolitica* для диагностики и оценки специфического гуморального иммунного ответа у больных с поражением периферической нервной системы иерсиниозной этиологии и характеристики клеточного иммунитета у этой группы пациентов.

Материал и методы. Обследованы 90 пациентов в возрасте от 46 до 65 лет с заболеваниями периферической нервной системы (вертеброгенная люмбалгия, дискогенный радикулит), находившихся на стационарном лечении в больнице МО ДВО РАН. Диагноз был поставлен на основании типичной клинической картины, рентгенологического обследования, клинического и биохимического анализов крови. Лабораторные и иммунологические исследования проводили

при поступлении и через 7–14 дней пребывания в стационаре. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови 20 сопоставимых по возрасту и полу здоровых доноров (Станция переливания крови, г. Владивосток). В качестве положительного контроля использовали сыворотку крови 20 больных иерсиниозом с подтвержденным диагнозом (Роспотребнадзор по Приморскому краю и кафедра детских инфекционных болезней ВГМУ). Серологический анализ сыворотки крови больных иерсиниозом с помощью реакции непрямой гемагглютинации осуществляли на базе лечебных учреждений г. Владивостока согласно существующим нормативным документам (инструкция МЗ СССР № 15-6/42 от 03.03.1988 и 18.01.2001 г.). Бактериологический анализ проводился в соответствии с нормативными инструкциями (МУ 3.1.1.2438–09; протокол № 3 от 25.12.2008 г.).

Порин для иммуноферментной тест-системы выделяли из штамма 134 *Y. enterocolitica* O:3 сероварианта, предоставленный НИИЭМ СО РАМН (г. Владивосток). Тример и мономер порина *Y. enterocolitica* были получены, как описано в работе О.П. Востриковой и др. [2]. Для постановки твердофазного иммуноферментного анализа использовали 96-луночные полистирольные планшеты GR-655001 фирмы Costar (США). В качестве антивидовых антител применяли коммерческие иммуноферментные конъюгаты производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (г. Москва), в качестве субстрата – 0,04 %-ный орто-фенилендиамин фирмы Sigma (США). Результаты учитывали на спектрофотометре μ Quant (США) при 492 нм и выражали в единицах оптической плотности продукта ферментативной реакции. В качестве критерия наличия специфических антител к *Y. enterocolitica* использовали отношение регистрируемых параметров для исследуемой (Р) и контрольной отрицательной (N) сывороток. Исследуемую сыворотку считали положительной при $P/N \geq 2$ [4].

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и активационных маркеров выполнялось с помощью микроскопии с масляной иммерсией на основе прямых моноклональных антител к кластерам дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD16, CD22, CD25, CD95 фирмы Becton Dickinson. Содержание сывороточных иммуноглобулинов (Ig) классов А, М и G определяли методом радиальной иммунодиффузии, используя диагностический набор НПЦ «Медицинская иммунология» (г. Москва). Функциональное состояние системы фагоцитоза оценивалось с помощью тест-набора «Определение фагоцитоза» (ТУ 2600-19310-93, гигиенический сертификат 046/00059 от 20.01.1994 г.). Фагоцитарный показатель и фагоцитарное число устанавливали методом определения фагоцитарной активности нейтрофилов с использованием стафилококков.

Статистическую обработку полученных данных проводили в пакете прикладных программ Microsoft

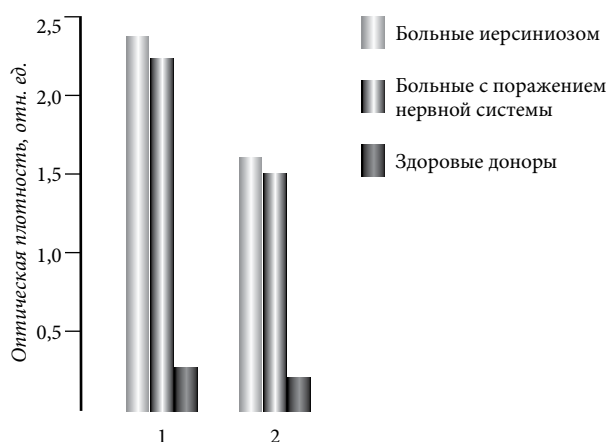


Рис. 1. Специфические антитела к тримеру (1) и мономеру (2) порина NM *Y. enterocolitica* в пуловых сыворотках крови больных с поражением периферической нервной системы.

Excel. Достоверность различий средних величин оценивали с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Для выявления иерсиниозной этиологии заболевания и оценки некоторых показателей специфического гуморального иммунного ответа нами впервые были использованы разные молекулярные формы порина NM *Y. enterocolitica*: тример и мономер, представляющие собой конформационные интермедиаты белка, отличающиеся пространственной структурой и антигенной активностью при верификации иерсиниоза с помощью иммуноферментного анализа [2, 3].

В сыворотках крови 90 пациентов с заболеваниями периферической нервной системы в 32 % случаев (29 человек) выявлены антитела в диагностическом титре (1:1600) к обеим формам порина независимо от стадии заболевания (рис. 1). Тем не менее тример порина в 1,5 раза эффективнее, чем мономер, выявлял в сыворотках крови больных специфические антитела к белку из *Y. enterocolitica*. Полученный результат согласуется с существующим в литературе мнением о том, что антитела к поринам грамотрицательных бактерий вырабатываются преимущественно на конформационные детерминанты, присущие тримеру порина [12].

Важно отметить, что уровень класс-специфических иммуноглобулинов к тримеру и мономеру порина из *Y. enterocolitica* у пациентов отличался в зависимости от стадии заболевания. Так, в индивидуальных (и пуловых) сыворотках крови в период обострения (20 человек) и ремиссии (5 человек) выявлен высокий уровень IgG- и низкий уровень IgM-антител к обеим формам порина (рис. 2). Для пациентов с хроническим течением заболевания (4 человека) также было характерно высокое содержание IgG-антител к тримеру и мономеру белка. Однако уровень IgM-антител к мономеру порина у этой группы пациентов оказался в 5 раз выше, чем у больных на стадиях обострения и ремиссии. Вероятно, пролонгированный синтез IgM-антител к мономеру порина *Y. enterocolitica* у пациентов с хронической формой заболевания свидетельствует о персистенции возбудителя в организме и, как

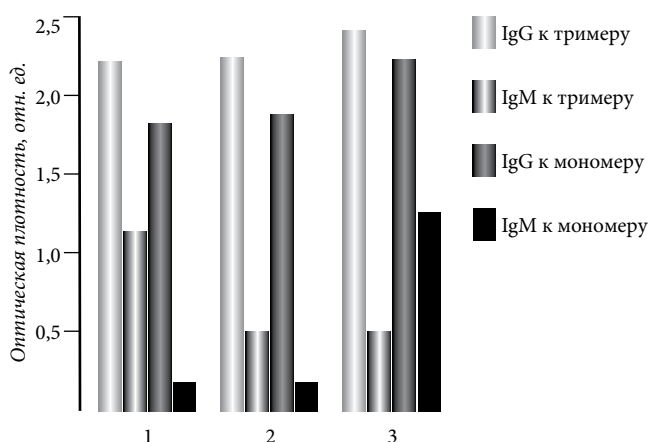


Рис. 2. Класс-специфические иммуноглобулины к тримеру и мономеру порина NM *Y. enterocolitica* в пуловых сыворотках крови больных с поражением периферической нервной системы на разных стадиях заболевания:

1 – ремиссия, 2 – обострение, 3 – хроническое течение.

Таблица

Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови пациентов с поражением периферической нервной системы иерсиниозной этиологии ($M \pm \sigma$), %

| CD | Пациенты, n=20 | Доноры, n=20 |
|-------------------|----------------|--------------|
| CD3 ⁺ | 58,91±4,60 | 73,30±5,40 |
| CD4 ⁺ | 31,28±3,30 | 47,13±4,90 |
| CD8 ⁺ | 51,20±4,30 | 25,13±5,50 |
| CD16 ⁺ | 31,46±3,20 | 15,60±1,40 |
| CD22 ⁺ | 33,20±2,10 | 16,32±1,16 |
| CD19 ⁺ | 25,36±2,40 | 12,49±0,32 |
| CD20 ⁺ | 41,20±2,10 | 20,12±1,60 |
| CD25 ⁺ | 42,36±2,60 | 10,59±2,30 |
| CD95 ⁺ | 23,20±1,20 | 5,80±2,70 |

следствие, о тяжести и/или хроническом характере заболевания.

Таким образом, высокий уровень продукции специфических IgG-антител к обеим формам порина из *Y. enterocolitica* и их длительная циркуляция у больных может указывать на развитие существенных иммунопатологических изменений [5, 10]. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что для оценки специфического гуморального иммунитета больных с хронической формой заболевания в качестве диагностического антигена перспективнее использовать мономер порина из *Y. enterocolitica*.

Для 20 пациентов в остром периоде заболевания были определены показатели иммунного статуса, позволяющие оценить состояние клеточного иммунитета при вторичном иммунодефиците [5]. Анализ иммунограмм выявил здесь перераспределение содержания Т- и В-лимфоцитов в сравнении со здоровыми донорами (табл.). У всех больных содержание В-лимфоцитов (CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺) оказалось в 2 раза выше подобных показателей в норме. Как известно, повышенный уровень популяции В-лимфоцитов характерен для некоторых аутоиммунных заболеваний и связан с ростом в крови дифференцированных форм В-клеток [5].

У 14 пациентов в стадии обострения отмечено в среднем 4-кратное увеличение содержания ранних (CD25⁺) и поздних (CD95⁺) активационных маркеров, что указывало на нарушения процессов активации лимфоцитов. Как известно, CD25⁺-CD95⁺-маркеры отвечают за дифференцировку Т-лимфоцитов [5]. Повышение количества CD25⁺ считается критерием развития воспалительного процесса любой природы. Одной из причин повышенной экспрессии на лимфоцитах рецептора CD95⁺ может быть персистенция микроба в лейкоцитах [5]. Увеличение количества CD95⁺ на поверхности клетки может указывать на ее готовность к апоптозу. На нашем материале это могло служить фактором развития активационно-индуцированного иммунодефицита [5, 10].

Содержание популяции натуральных киллеров, экспрессирующих CD16, в крови обследованных оказалось в 2 раза выше нормы, что указывало на возможность развития аутоиммунных процессов [5].

У 14 больных обнаружено 1,5-кратное снижение уровня Т-лимфоцитов (CD3⁺) и субпопуляции иммунорегуляторных клеток (CD4⁺), что могло указывать на Т-иммунодефицитное состояние [5]. Содержание Т-супрессоров/цитотоксических клеток (CD8⁺) увеличивалось только у 30 % пациентов (6 человек), в остальных случаях было близко значению этого показателя у здоровых лиц.

Одним из прогностических критериев развития иммунодефицитного состояния могут служить показатели фагоцитарной активности [5]. У 12 пациентов (60 %) отмечено снижение поглотительной и переваривающей активности нейтрофильных лейкоцитов: фагоцитарный показатель снижался до 18,2±3,1 % (доноры – 72,0±1,8 %), фагоцитарное число – до 4,5±0,1 (доноры – 5,3±0,1). У 6 пациентов (30 %) фагоцитарный показатель оставался близким нормальному, а фагоцитарное число, напротив, повышалось (до 6,9±0,7). Полученные результаты свидетельствуют о низкой способности фагоцитов к поглощению антигена, что приводит к задержке элиминации возбудителя, и как следствие, к развитию иммунопатологических процессов [5, 10].

Анализ содержания сывороточных иммуноглобулинов показал, что в крови у 6 пациентов (30 %) уровень IgM был в 2,2 раза ниже, чем у здоровых доноров (0,63±0,34 и 1,19±0,20 г/л соответственно), что могло указывать на иммунодефицитное состояние [5, 10]. Содержание IgG (27,67±0,4 г/л) у всех пациентов оказалось в 1,8 раза выше нормы (15,37±0,48 г/л), IgA (3,96±0,2 г/л) у 6 больных (30 %) в 2 раза выше показателя здоровых доноров (3,96±0,20 и 1,97±0,30 г/л соответственно), в остальных случаях – в пределах нормы. Высокий уровень в крови IgG и IgA (у части пациентов) может свидетельствовать о постоянной стимуляции лимфоидной ткани персистирующими иерсиниями и хронизации заболевания [5, 10].

У 2/3 пациентов заболевание характеризовалось лейкоцитозом (9,6±0,4×10⁹/л) и у всех пациентов – повышением СОЭ (16,5±0,7 мм/час).

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что разные молекулярные формы порина *Y. enterocolitica* обладают различной эффективностью в иммуноферментном анализе при верификации поражений периферической нервной системы иерсиниозной этиологии и выявлении особенностей специфического гуморального иммунного ответа пациентов на разных стадиях заболевания. Это может быть полезным для проведения соответствующей иммунотерапии в зависимости от характера и сроков заболевания.

Клинико-иммунологическое обследование больных с поражением периферической нервной системы иерсиниозной этиологии указывает на угнетение Т-клеточного звена и активацию В-системы иммунитета, что свидетельствует об отсутствии координации в функционировании иммунокомпетентных клеток и наличии иммунных расстройств, характерных для вторичных иммунодефицитных состояний. Это обстоятельство открывает перспективу дальнейших исследований, направленных на изучение иммунопатологических механизмов формирования вторичных иммунодефицитных состояний, обусловленных иерсиниями, и обоснования возможности использования в терапии иммунотропных препаратов.

Работа выполнена при поддержке гранта ДВО РАН № 03-1-0-05-004 «Комплексная диагностика вторично-очаговых форм иерсиниозов с помощью ИФА на основе поринов – видоспецифических антигенов наружной мембраны бактерий».

*Авторы выражают глубокую признательность д-ру мед. наук Ф.Н. Шубину (НИИЭМ СО РАМН) за предоставление штамма *Y. enterocolitica*, д-ру мед. наук, профессору кафедры детских инфекционных болезней ВГМУ А.В. Гордеец и канд. мед. наук, старшему научному сотруднику Роспотребнадзора по Приморскому краю Г.Н. Каленченко за предоставление сывороток крови больных иерсиниозом.*

References

1. Beniova S.N, Gordeec A.V., Malashenkova V.G. et.al. Immunological aspects of children Yersinia infection, *Pediatrija*. 2001. No. 2. P. 111–112.
2. Vostrikova O.P., Kim N.Ju., Lihackaja G.N. et.al. The structure and the function of pore-forming proteins of genus Yersinia bacteria. Isolation and comparative characteristics of physical and chemical properties and functional activity of Yersinia porins, *Bioorgan. himija*. 2006. Vol. 32, No. 4. P. 371–383.
3. Vostrikova O.P., Malashenkova V.G., Novikova O.D., Soloveva T.F. The use of different molecular forms in outer membrane porin Yersinia enterocolitica for the diagnosis and analysis of the humoral immune response in patients with yersiniosis, *Rossiiskij allerg. zhurn.* 2008. No. 1. S. 63–64.
4. Vostrikova O.P., Novikova O.D., Malashenkova V.G. et.al. The usage of the outer membrane porin Yersinia enterocolitica to diagnose intestinal yersiniosis by ELISA, *Biol. membrany*. 2009. Vol. 29, No. 5. P. 419–428.
5. Drannik G.N. Clinical Immunology and Allergology. M.: MIA, 2003. 604 p.
6. Kamancev V.N., Skripchenko N.V., Tihomirova O.V., Behtereva M.K. Disorders of the peripheral nervous system by Yersinia infection in children, *Rossiiskij med. zhurn.* 2003. no. 2. P. 27–29.
7. Malov I.V. The role of autoimmunity in the protracted course of yersiniosis: abstracts, thesis. M., 1998. 24 p.

8. Portnjagina O.Yu., Vostrikova O.P., Novikova O.D. et al. The role of autoimmunity process in the protracted course of yersiniosis: abstracts, thesis, *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 3. P. 85–90.
9. Somov G.P., Pokrovskij V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. Pseudotuberculosis. M.: Medicina, 2001. 254 p.
10. Shestakova I.V. Yersiniosis: clinical and pathogenetic features of predicting outcomes of generalized and secondarily focal forms: abstracts, thesis. M., 2009. 48 p.
11. Ceneva G.Ja. Yersinia and yersiniosis. SPb.: Medmassmedia, 2006. 168 p.
12. Arockiasamy A., Murthy G.S., Rukmini M.R., et al. Conformational epitope mapping of OmpC, a major cell surface antigen from *Salmonella typhi*, *J. Struct. Biol.* 2004. Vol. 148, No. 1. P. 22–33.
13. Saebø A., Lassen J. Yersinia enterocolitica: an inducer of chronic inflammation, *Int. J. Tissue React.* 1994. Vol. 16, No. 2. P. 51–57.
14. Sotaniemi K.A. Neurologic complications associated with yersiniosis, *Neurology*. 1983. Vol. 33, No. 3. P. 95–97.
15. Wenzel B.E., Heeseman J., Heufelder A., et al. Enteropathogenic Yersinia enterocolitica and organ-specific autoimmune diseases in man, *Contrib. Microbiol. Immunol.* 1991. Vol. 12, No. 3. P. 80–88.

Поступила в редакцию 28.03.2011.

VERIFICATION AND CLINICAL IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM LESIONS OF YERSINIOSIS AETIOLOGY

O.P. Vostrikova¹, O.D. Novikova¹, T.A. Gorbach², N.N. Ryabova², O.Yu. Portnyagina¹, V.A. Khomenko¹, G.G. Pavlova²

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation),

²Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The paper describes efficiency of various molecular forms of non-specific pore-forming proteins – species-common antigen of outer membrane of Yersinia enterocolitica in identifying yersiniosis aetiology of the peripheral nervous system diseases. The authors have analysed several indices of the specific antibody response in patients with peripheral nervous system lesions, depending on the disease stage. The immunological examination of patients diagnosed with atypical form of the disease has allowed detecting considerable changes in the immune status indices being characteristic of secondary immunodeficiency.

Key words: yersiniosis, diagnostics, porins, immune status.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 68–72.

УДК 616.137-004.6-002.18-07

ОЦЕНКА СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ СОСУДОВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Т.С. Запорожец¹, К.В. Майстровский², В.Г. Раповка², Л.А. Иванушко¹, Т.П. Смолина¹, А.К. Гажа¹

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

²Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: атеросклероз, хроническое системное воспаление, системная воспалительная реакция.

Проведена оценка перспективности использования интегральных показателей системной воспалительной реакции – коэффициента реактивности и уровня реактивности, рассчитанных на основе сывороточного содержания пяти цитокинов (интерлейкинов 6, 8 и 10, фактора некроза опухоли- α и γ -интерферона), для характеристики хронического системного воспаления у больных облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей. Показано, что системная воспалительная реакция при этом заболевании характеризуется высокими уровнями γ -интерферона и интерлейкина-8, фибриногена, маркеров активации эндотелия и лейкоцитов без вовлечения интерлейкин-10-зависимых механизмов, наличием органной дисфункции. Установлено, что интегральные показатели при сопоставлении с частными признаками являются более эффективными критериями оценки системной воспалительной реакции. Выявленная с их помощью устойчивость хронического системного воспаления при облитерирующем атеросклерозе к лечению диктует необходимость оптимизации патогенетической противовоспалительной терапии. Метод оценки хронического системного воспаления с помощью интегральных показателей может быть рекомендован для регистрации наличия и характера системной воспалительной реакции, оценки риска осложнений и мониторинга терапии облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей.

Облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей представляет собой важную клиническую форму атеросклероза – третью по частоте после ишемической болезни сердца и ишемического поражения

головного мозга [4, 6]. Его характерной особенностью является тенденция к прогрессированию, высокая степень инвалидизации, ведущей к временной или стойкой потере трудоспособности и преждевременной смерти [4, 5]. В этой связи важное значение приобретают вопросы повышения информативности диагностических мероприятий, позволяющих предупреждать развитие более тяжелых форм хронической артериальной недостаточности нижних конечностей, в том числе критической ишемии, прогнозировать возможные осложнения [4, 7].

В настоящее время как один из наиболее вероятных механизмов, способствующих прогрессированию атеросклероза и деструктивным изменениям атеросклеротической бляшки с развитием острых ишемических синдромов, рассматривается воспалительный процесс [14]. В последние годы на роль предикторов риска и прогрессирования атеросклеротического повреждения артерий претендуют различные медиаторы воспаления: С-реактивный белок, белки сывороточных амилоидов А и В, гомоцистеин, неоптерин, цитокины, молекулы межклеточной адгезии, продукты внутрисосудистого кининогенеза и активации лейкоцитов и др. Однако, несмотря на обилие работ, посвященных использованию маркеров воспаления в качестве прогностических критериев при атеросклерозе, оценка степени выраженности воспалительной реакции при

этом заболевании остается проблематичной. Выраженность воспаления может являться дополнительным диагностическим фактором и при развитии мультифокального атеросклероза, когда симптомы патологии одного сосудистого бассейна маскируют проявления ишемии других областей [5]. В классификаторах болезней (МКБ-10 и национальных) отсутствуют синдромы, которые отражали бы понятие хронического системного воспаления, а критерии синдрома системной воспалительной реакции обладают в этом случае низкой специфичностью [3]. Отсутствуют формализованные критерии хронического воспаления, позволяющие качественно оценивать состояние пациента, эффективность проводимой терапии, прогнозировать возможные осложнения и при атеросклерозе.

В последние годы в институте иммунологии и физиологии УрО РАН академиком В.А. Черешневым сформулирована принципиально новая концепция системного воспаления как типового патологического процесса и системной воспалительной реакции – как его клинического выражения [1, 10]. Е.Ю. Гусевым и др. была разработана методология оценки системного воспаления, в т.ч. и хронического, основанная на использовании интегральных критериев – коэффициента реактивности и уровня реактивности, доступная для массового использования в клинике [2, 3].

Целью нашей работы явилась оценка перспективности использования интегральных критериев системной воспалительной реакции для характеристики хронического системного воспаления у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей.

Материал и методы. В исследование были включены 60 пациентов 40–60 лет с окклюзионным поражением сосудов и ишемией конечностей 2А–3А стадий по Фонтейну–Покровскому, находившиеся на лечении в Приморской краевой клинической больнице № 1 (г. Владивосток). Критерии исключения: острые инфекции, онкологические заболевания, сахарный диабет, сердечная недостаточность III–IV функционального класса по NYHA и органические дисфункции, которые могли воздействовать на воспалительный статус. Все пациенты получали адекватную форму и тяжести заболевания терапию, которая включала прямые и непрямые антикоагулянты, дезагреганты, средства, улучшающие реологию крови, антибиотики, антигистаминные препараты и противовоспалительные средства. Контрольную группу составили 20 условно здоровых доноров.

Выраженность цитокинемии оценивали по концентрации в сыворотке крови интерлейкинов (IL) 4, 6, 8 и 10, фактора некроза опухоли- α (TNF α) и γ -интерферона (IFN γ) методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Цитокин». Активацию эндотелия и лейкоцитов регистрировали, измеряя концентрацию растворимых молекул адгезии и экспрессию активационных антигенов – кластеров дифференцировки (Cluster of

Differentiation – CD) – с использованием моноклональных антител производства Bender Medsystems (Австрия) Becton Coulter (Франция) методом проточной цитометрии на цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson). Развитие хронического синдрома диссеминированного сосудистого свертывания регистрировали на анализаторах TS 400 (HTI, USA) и Amelung 4KS на основании оценки состояния системы гемостаза по показателям протромбинового индекса, тромбинового времени, активированного парциального тромбопластинового времени, содержанию фибриногена и количеству тромбоцитов.

Расчет интегральных показателей системной воспалительной реакции – коэффициента реактивности и уровня реактивности – рассчитывали по методу, разработанному в лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН [2] в собственной модификации.

Статистический анализ данных проводили с использованием прикладного пакета Statistica 6. Использовали следующие методы: проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений (W-критерий Шапиро–Уилка), парный и непарный t-критерии, непараметрические критерии Mann–Whitney и Wilkoxon, корреляционный анализ.

Результаты исследования. Статистический анализ данных всей выборки показал, что у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей выявлялись признаки хронической Т-клеточной активации, которая носила системный характер и была сопряжена с увеличением количества циркулирующих Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные антигены – рецептор к IL-2 (CD25) и апоптотический маркер CD95/Fas. Провоспалительная цитокинемия проявлялась выраженным увеличением концентрации хематтрактанта IL-8 и ключевого проатерогенного цитокина IFN γ (по сравнению с IL-6 и TNF α , уровень которых повышался в меньшей степени). Коэффициент соотношения оппозитных цитокинов IFN γ /IL-4 у пациентов значительно превышал таковой у здоровых доноров, свидетельствуя о выраженной активации Т-хелперного иммунного ответа 1-го типа, способствующего прогрессированию воспаления в стенке сосуда. Системная активация эндотелия сопровождалась увеличением концентрации растворимых молекул межклеточной адгезии в сыворотке крови и нарушениями гемостаза с активацией прокоагулянтного звена. Интенсивность системной Т-клеточной и эндотелиальной активации, выраженность цитокинемии, нарушения липидного обмена и системы гемостаза усиливались по мере прогрессирования ишемии от 2А к 3А стадии (табл. 1).

В то же время изменения маркеров воспаления различались как по частоте встречаемости, так и по степени выраженности у отдельных индивидов с клинически одинаковой системной воспалительной реакцией. Наиболее часто при ишемии 2А и 3А стадий

Таблица 1

Значения показателей развития системной воспалительной реакции у пациентов с облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей (M±σ)

| Показатель | Контроль | Ишемия 2А ст. | | Ишемия 3А ст. | |
|--|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | до лечения | после лечения | до лечения | после лечения |
| IFN γ , пг/мл | 21,8±3,1 | 31,4±8,4* | 32,9±17,5* | 44,5±15,3* | 37,7±10,5* |
| TNF α , пг/мл | 3,2±1,7 | 3,2±1,5 | 3,2±1,5 | 3,3±1,6 | 3,2±1,5 |
| IL-8, пг/мл | 12,0±2,2 | 33,1±18,5* | 38,35±11,7* | 46,0±25,5* | 46,8±26,1* |
| IL-6, пг/мл | 5,2±2,1 | 6,0±1,3* | 6,8±3,8* | 7,4±3,0* | 9,9±4,2* |
| IL-10, пг/мл | 5,4±1,3 | 2,0±1,5* | 1,6±1,3* | 2,3±1,5* | 2,1±1,9* |
| IL-4, пг/мл | 4,2±0,8 | 4,0±1,9 | 4,4±0,7 | 2,0±0,4* | 2,0±0,9* |
| IFN γ /IL-4 | 5,2±1,1 | 7,9±1,6* | 7,5±1,4* | 22,2±2,4* | 18,9±2,0* |
| Тромбиновое время, с | 15,2±2,4 | 13,1±1,4* | 13,9±1,9* | 12,6±0,6* | 12,3±1,3* |
| Фибриноген, г/л | 3,1±0,7 | 3,8 ±0,7* | 4,2±0,6* | 4,1±0,4* | 4,4±0,5* |
| sICAM-1, нг/мл | 212,3±73,2 | 327,3±96,1* | 311,4±101,3* | 385,4±70,2* | 376,9±61,5* |
| sVCAM-1, нг/мл | 378,1±72,9 | 428,3±81,0* | 430,5±78,9* | 533,7±133,7* | 527,1±119,8* |
| sP-selectin, нг/мл | 184,6±82,9 | 216,3±111,0 | 240,5±98,9* | 284,0±121,7* | 296,1±114,8* |
| sE-selectin, нг/мл | 48,2±22,0 | 52,3±14,0 | 53,5±16,9 | 59,5±9,7* | 57,7±11,8* |
| CD3 ⁺ CD25 ⁺ , % | 6,9±1,9 | 11,2±2,0* | 14,9±4,7* | 14,8±2,1* | 9,6±2,3* |
| CD3 ⁺ CD95 ⁺ , % | 6,9±1,9 | 10,4±2,3* | 14,5±3,1* | 13,6±3,3* | 11,4±4,1 |

* Разница с контролем статистически значима.

соответственно регистрировались повышенные уровни IFN γ (от 63,3 до 70 % случаев), IL-8 (от 56,6 до 100 % случаев), фибриногена (от 63,3 до 100 % случаев), лимфоцитов CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺CD95⁺ (от 66,6 до 100 % случаев). Реже определялось увеличение концентрации IL-6 (24,0–37,5 %) и TNF α (12,5–26,6 %). Увеличение же концентрации IL-10 не было зарегистрировано ни у одного пациента. Обращала на себя внимание несинхронность изменений исследуемых маркеров у отдельных индивидов: сила корреляционной связи между ними была низкой или средней.

Для расчета коэффициента реактивности использовали плазменные уровни цитокинов (IL 6, 8 и 10, TNF α , IFN γ). Для каждого из параметров авторами метода определены дозовые диапазоны, точкой отсчета которых является верхняя граница предельно допустимого значения: для IL-6 и IL-10 – 5 пг/мл, для IL-8 – 10 пг/мл, для TNF α – 8 пг/мл, для IFN γ – 25 пг/мл (дозовые диапазоны значений IFN γ определены нами с учетом устойчивой связи с уровнями исследуемых показателей и других признаков системной воспалительной реакции). Каждому диапазону концентраций показателя присвоено определенное значение индивидуального индекса реактивности. В результате суммации трех наибольших индексов реактивности вычислялся коэффициент реактивности (от 0 до 5 баллов), который при оценке системной воспалительной реакции у каждого больного классифицировался до определенного уровня реактивности с верификацией фаз и стадий хронического системного воспаления [3].

Корреляционный анализ, проведенный между маркерами хронического системного воспаления и интегральными коэффициентами реактивности выявил преимущество последних: степень корреляции между отдельными маркерами была низкой либо

отсутствовала, в то время как коэффициент реактивности структурировал все параметры, увеличивая число связей высокой (с 66,6 % всех маркеров) и очень высокой (с 11,1 % всех маркеров) степени.

Расчет и анализ значений коэффициента реактивности выявил большую выраженность системного воспаления у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей по сравнению с контрольной группой. Было установлено увеличение коэффициента реактивности по мере прогрессирования ишемии, достигавшее максимума у лиц с ишемической болезнью сердца (табл. 2).

Качественная характеристика степени выраженности системной воспалительной реакции, оцениваемая с помощью уровней реактивности, позволила заключить, что если для пациентов с ишемией 2А стадии был характерен 1-й уровень реактивности (коэффициент реактивности – 2–4 балла), то на 3А стадии ишемии определялся 2-й уровень реактивности (коэффициент реактивности – 2–5 баллов). У 10 % пациентов с ишемией нижних конечностей 3А стадии диагностирован 3-й уровень реактивности (коэффициент реактивности – 6–7 баллов). Если 1-й уровень реактивности определяется как минимальный (маргинальный) при системной воспалительной реакции, 2-й – как некротический маркер риска системного воспаления, то 3-й уровень реактивности служит критерием развития хронического системного воспаления.

Поскольку уровень реактивности, характеризующий фазы процесса в случае развития острого системного воспаления, при хроническом системном воспалении отражает неустойчивость воспалительной реакции при одном и том же качественном состоянии процесса, авторы метода предлагают использовать для характеристики хронического системного воспаления

Таблица 2

Значения коэффициента реактивности у пациентов с облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей

| Группа | | Баллы | | Распределение пациентов по баллам, % | | | | | | |
|---------------|---------------|-----------|-----|--------------------------------------|------|------|------|----|---|---|
| | | M±m | Me | 0-1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Контроль | | 0,08±0,30 | 0,0 | 100,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Все пациенты | До лечения | 3,60±1,10 | 4,0 | 0 | 20,0 | 20,0 | 40,0 | 20 | 0 | 0 |
| | После лечения | 3,90±1,20 | 4,0 | 0 | 20,0 | 10,0 | 30,0 | 40 | 0 | 0 |
| Ишемия 2А ст. | До лечения | 3,03±0,88 | 3,0 | 0 | 13,3 | 60,0 | 26,7 | 0 | 0 | 0 |
| | После лечения | 3,15±0,74 | 3,0 | 0 | 13,3 | 60,0 | 26,7 | 0 | 0 | 0 |
| Ишемия 3А ст. | До лечения | 4,20±1,15 | 4,0 | 0 | 6,6 | 20,0 | 40,0 | 27 | 3 | 3 |
| | После лечения | 4,60±0,67 | 4,0 | 6,6 | 26,6 | 53,3 | 20,0 | 0 | 0 | 0 |

дополнительные критерии и маркеры, позволяющие верифицировать степень воспаления и его стадии [3]. Используя данные лабораторных показателей, коэффициент и уровень реактивности, дополнительные критерии системной воспалительной реакции и маркеры хронического диссеминированного внутрисосудистого свертывания в соответствии с классификацией Ю.М. Гусева, мы выявили различия выраженности хронической воспалительной реакции в зависимости от тяжести заболевания. Было установлено, что если для пациентов с ишемией 2А степени характерно наличие 1-й стадии хронического системного воспаления (компенсированной), то при ишемии 3А стадии системное воспаление приобретает характер неустойчивой компенсации (2-я стадия), а наличие сопутствующих заболеваний сердечно-сосудистой системы у части пациентов сопровождается развитием субкомпенсированных (3-я стадия) форм хронического системного воспаления (табл. 3).

Оценка эффективности терапии с помощью интегральных критериев выявила толерантность хронического системного воспаления у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей к проводимому лечению: выраженность системной воспалительной реакции, оцениваемая по коэффициенту и уровню реактивности, не изменялась (а у лиц с 3А стадией ишемии коэффициент реактивности увеличивался).

Обсуждение полученных данных. Хроническое системное воспаление вообще и при атеросклерозе в частности имеет принципиальные отличия от острого системного воспаления и длительное время развивается на фоне относительного компенсированного равновесия между повреждающими факторами и буферными противовоспалительными системами [1]. Однако с определенного момента прогрессирование ишемии тканей может приводить к форсированию основных патогенетических феноменов, которые сопровождают хроническое системное воспаление, усугубляя местные проявления, болевую реакцию и способствуя развитию критических осложнений [9]. Важным моментом в этой связи является количественная и качественная оценка выраженности системной воспалительной реакции. Используемые для выявления факторов риска развития и прогрессирования атеросклеротического

повреждения артерий маркеры воспаления не дают представления о ней как о целостном процессе [2, 3]. Принимая во внимание очевидную прогностическую несостоятельность отдельных воспалительных маркеров для характеристики хронического системного воспаления, Ю.М. Гусев и др. предложили метод количественной оценки системной воспалительной реакции [2]. Он

основан на интегральных критериях, доступных для массового использования в клинике и позволяющих определять наличие и характер системной воспалительной реакции, установить ее клинически значимые пороговые уровни, отражающие трансформацию классического воспаления в системное, а также оценивать риск осложнений и осуществлять мониторинг терапии. В качестве главного звена (эталонного критерия) системной воспалительной реакции здесь рассматривается уровень цитокинов (IL 6, 8 и 10, TNFα) и С-реактивного протеина в сыворотке крови, позволяющие рассчитать интегральные критерии – коэффициент и уровень реактивности.

При прогрессировании атеросклероза гиперпродукция провоспалительных цитокинов приводит к срыву регуляции каскадных реакций иммунной системы с последующим развитием системного воспаления [12]. В ряде исследований, в том числе и многоцентровых, продемонстрирована тесная связь между повышением активности провоспалительных цитокинов в сыворотке крови и тяжестью хронической сердечной недостаточности ишемической и неишемической этиологии [8]. В нашей работе наиболее значимые изменения были установлены для IL-8 и IFNγ. Роль последнего как ключевого проатерогенного цитокина обусловлена его биологическими эффектами и связана как с локальным действием в зоне атеросклеротической бляшки, так и с системным влиянием, способствующим развитию воспаления. Это реализуется и через стимуляцию антигенпредставляющих функций эндотелия и макрофагов, выработку провоспалительных цитокинов, повышенную экспрессию эндотелиальных молекул адгезии, усиление продукции активных форм кислорода в макрофагах и ингибирование выхода холестерина из «пенящихся» клеток [13]. Блокируя синтез коллагена и стимулируя продукцию матриксной металлопротеиназы макрофагов, IFNγ способствует дестабилизации зрелых атеросклеротических поражений [11]. Эксперименты, выполненные на IFNγ-дефицитных мышах, и клинические исследования, показавшие связь уровня IFNγ с выраженностью атеросклероза коронарных артерий, свидетельствуют о значительной патобиологической актуальности этого цитокина при атеросклерозе [11, 15]. Значимо более высокие уровни IFNγ у пациентов

с проявлениями ишемии других областей, зарегистрированные и в наших исследованиях, подтверждают значение иммуновоспалительной активации, обусловленной хронической сердечной недостаточностью, в прогрессировании атеросклероза сосудов нижних конечностей. Учитывая полученные результаты и данные литературы о значимости IFN γ в атерогенезе, мы использовали плазменные уровни этого цитокина в качестве одного из параметров при расчете коэффициента реактивности вместо С-реактивного белка. Включение IFN γ в качестве маркера системной воспалительной реакции при облитерирующем атеросклерозе сосудов нижних конечностей отвечает принципу относительности включения показателей в коэффициент реактивности, постулируемому авторами метода и предполагающему возможность взаимозаменяемости маркеров, сопоставимых по биологической значимости при той или иной патологии, при сохранении общего принципа — суммирования трех наибольших значений индекса реактивности.

С помощью интегральных критериев было установлено, что прогрессирование ишемии при атеросклерозе от 2А к 3А стадии сопряжено с развитием хронического системного воспаления от 1-й (компенсированной) ко 2-й (неустойчивой компенсации) стадии. Наличие атеросклеротических поражений других бассейнов (ишемическая болезнь сердца) ассоциируется с признаками 3-й стадии хронического системного воспаления (субкомпенсированной).

Хроническое системное воспаление у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей характеризуется высокой частотой обнаружения, повышенных уровней сывороточного IFN γ и IL-8, фибриногена, маркеров активации эндотелия (растворимые молекулы адгезии) и лейкоцитов (активационные антигены), отсутствием развития IL-10-зависимых механизмов и наличием органной дисфункции. Устойчивость хронического системного воспаления к проводимому лечению диктует необходимость оптимизации патогенетической противовоспалительной терапии при облитерирующем атеросклерозе.

Таким образом, интегральные показатели — коэффициент и уровень реактивности, рассчитанные на основе сывороточных уровней пяти цитокинов (IL 6, 8, и 10, TNF α и IFN γ), являются более эффективными критериями оценки системной воспалительной реакции при сопоставлении с частными признаками. В то же время индексы реактивности отдельных показателей, формирующих систему «коэффициент реактивности/уровень реактивности», в частности индексы реактивности IL-8 и IFN γ , могут использоваться и в качестве самостоятельных маркеров при мониторинге заболевания.

Метод оценки хронического системного воспаления с помощью интегральных показателей может быть рекомендован для регистрации наличия и характера системной воспалительной реакции, оценки риска

Таблица 3

Характеристика системной воспалительной реакции (СВР) у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей

| Группа | | ур ² | Степень СВР | Стадия ХСВ ³ |
|-----------------------------|---------------|-----------------|-------------|-------------------------|
| Все пациенты | До лечения | 1–2 | 1–2 | 1–2 |
| | После лечения | 1–2 | 1–2 | |
| Ишемия 2А ст. | До лечения | 1 | 2 | 1 |
| | После лечения | 1 | 2 | |
| Ишемия 3А ст. | До лечения | 1–2 | 3 | 2 |
| | После лечения | 1–2 | 3 | |
| Пациенты с ИБС ¹ | До лечения | 2 | 3 | 3 |
| | После лечения | 2 | 3 | |

¹ Ишемическая болезнь сердца.

² Уровень реактивности.

³ Хроническое системное воспаление.

осложнений и мониторинга терапии у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей.

References

- Gusev E.Ju., Chereshev V.A., Jurchenko L.N. Systemic inflammation on the position of type pathological process, *Citokiny i vospalenie*. 2007. No. 4. p. 9–21.
- Gusev E.Ju., Jurchenko L.N., Chereshev V.A., Zotova N.V. The methodology of the research of systemic inflammation, *Citokiny i vospalenie*. 2008. Vol. 7, No. 1. P. 15–25.
- Gusev E.Ju., Jurchenko L.N., Chereshev V.A. et al. Chronical system inflammation as a typical pathological process, *Citokiny i vospalenie*. 2008. No. 4. P. 3–10.
- Koshkin V.M. Obliterating atherosclerosis of the arteries of the lower limbs: the shortcomings and perspectives of conservative treatment, *Klin. farmakol. i terapija*. 2005. No. 4. P. 72–75.
- Kuznecov A.N. The modern signs treatment of the multifocal atherosclerosis. URL: <http://www.pirogov-centr.ru/infoclinic/2/6/> (date – 10.03.2011).
- Pokrovskij A.V. Clinical angiology. M.: Medicina, 1979. 328 p.
- Savelev V.S., Koshkin V.M., Karalkin A.V. Pathogenesis and severe stages conservative treatment of atherosclerotic lesions of lower limbs arteries. M.: MIA, 2010. 214 p.
- Serik S.A., Stepanova, S.V., Volkov V.I. Pro-and anti-inflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease with the progression of chronic heart failure. URL: http://www.rql.kiev.ua/cardio_j/2004/4/serik.htm (date 10.03.2011).
- Jurchenko L.N., Kuzmin V.V., Gusev E.Ju. et al. Pathophysiological phenomena of irreversible limb ischemia. *Klin. anesteziol. i reanimatol*. 2008. No. 4. P. 24–28.
- Chereshev V.A., Gusev E.Ju., Jurchenko L.N. Systemic inflammation – a myth or reality? *Vestnik RAN*. 2004. Vol. 74, No. 3. P. 219–225.
- Buono C., Come C.E., Stavrakis G. et al. Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003. Vol. 23. P. 454–460.
- Curtiss L.K., Tobias P.S.J. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis, *J. Lipid Res*. 2009. Vol. 50. P. 340–345.
- Harvey E.J., Ramji D.P. Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or anti-atherogenic? *Cardiovasc. Res*. 2005. Vol. 67. P. 11–20.
- Libby P., Ridker P.M., Maseri A. Inflammation and atherosclerosis, *Circulation*. 2002. Vol. 105. P.1135–1143.
- Ranjbaran H. Sokol S., Gallo A. et al. An inflammatory pathway of IFN γ production in coronary atherosclerosis, *J. of Immunology*. 2007. Vol. 178. P. 592–604.

Поступила в редакцию 26.04.2011.

ESTIMATING SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN PATIENTS WITH OBLITERATING ARTERIAL SCLEROSIS OF LOWER LIMB ARTERIES

T.S. Zaporozhets¹, K.V. Maystrovsky², V.G. Rapovka², L.A. Ivanushko¹, T.P. Smolina¹, A.K. Gazha¹

¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ²Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The paper estimates efficiency of applying integral indices of inflammatory response – reactivity factor and reactivity level calculated upon the serum content of five cytokines (interleukins 6, 8 and 10, tumour necrosis factor- α , and γ -interferon) to describe chronic systemic inflammation in patients with obliterating atherosclerosis of the low limb arteries. As reported, the systemic

inflammatory response in this case is characterised by high levels of γ -interferon and interleukin-8, fibrinogen, markers of endothelium and leukocyte activation without participation of interleukin-10-dependent mechanisms, and organ dysfunction. When compared with the particular signs, the integral indices appear to be most efficient criteria to estimate systemic inflammatory response. The treatment re-sistance of the chronic systemic inflammation in case of obliterating atherosclerosis requires optimising the pathogenetic anti-inflammatory therapy. The method of assessing the chronic systemic inflammation using integral indices can be recommended to detect the systemic inflammatory response and its character, estimate risks of complications and monitor therapy of the obliterating atherosclerosis of lower limb arteries.

Key words: atherosclerosis, chronic systemic inflammation, systemic inflammation response.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 72–77.

УДК 616.24-007.271-036.12-07:612.127.2

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСЕМИИ НА НЕКОТОРЫЕ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ КАЧЕСТВО ЖИЗНИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

М.Ф. Киняйкин¹, Г.И. Суханова¹, Н.Ю. Рассохина², А.В. Крамар³

¹Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ²Владивостокский филиал Дальневосточного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения (690105 г. Владивосток, ул. Русская, 73г), ³Дальневосточный окружной медицинский центр ФМБА России (690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостоку, 161)

Ключевые слова: гипоксемия, качество жизни, функциональные тесты.

У 42 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких исследованы клинико-функциональные показатели, характеризующие качество жизни (CAT-тест, степень одышки по шкале MRC, тест с 6-минутной ходьбой, индекс BODE), в зависимости от наличия гипоксемии. Показано, что у больных с явлениями гипоксемии были достоверно выше баллы по CAT-тесту, выраженнее одышка по MRC-тесту. Оценочный тест по CAT показал себя как простой и эффективный метод оценки степени влияния гипоксемии на состояние здоровья пациентов.

Известно, что любое хроническое заболевание, склонное к прогрессированию и протекающее с обострениями, может приводить к значительным ограничениям большинства компонентов «нормальной» жизни человека. Целостный подход к индивидууму, предполагающий множественность и взаимовлияние таких параметров, как физический, психоэмоциональный и социальный статус, обусловил использование в медицине понятия качества жизни. Качество жизни больного человека является одним из важнейших показателей эффективности здравоохранения [3]. В клинической практике качество жизни очень часто отождествляется с понятием функционального статуса, который отражает главным образом способность человека к физической активности и повседневной деятельности и является одной из важных составляющих характеристик качества жизни [3].

Для оценки состояния больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и исследования

качества жизни используются общие и специальные вопросы: SF-36 (The 36-item MOS Short-Form Health Survey), St George's Respiratory Questionnaire-COPD (SGRQ-C), Chronic Respiratory Disease Questionnaire (CRQ), The COPD Clinical Questionnaire (CCQ) [7]. В некоторых из них рассматриваются только специфические аспекты заболевания, такие как одышка, другие слишком громоздки для использования в ежедневной практике.

В настоящее время разработан новый международный вопросник для простой и надежной оценки состояния здоровья пациента с ХОБЛ, состоящий всего из 8 вопросов – CAT-тест: C (Chronic Obstructive Pulmonary Disease), A (Assessment), T (Test) [11]. Несмотря на небольшое число пунктов, этот вопросник позволяет определить все основные аспекты и степень влияния заболевания на состояние здоровья. Показана высокая достоверная корреляционная связь ($r = 0,80$) между наиболее употребляемым в практике вопросником SGRQ-C и CAT-тестом [11].

Проведенные ранее исследования качества жизни при ХОБЛ выявили закономерную связь между уровнем ее снижения и стадией заболевания [4, 5]. Наибольшую роль в снижении качества жизни здесь играли одышка и снижение толерантности к физической нагрузке в виде уменьшения дистанции при 6-минутной ходьбе. Доказано, что низкое качество жизни прогностически ассоциируется с высоким уровнем смертности среди пациентов с ХОБЛ [10].

В 2004 г. B.R. Celli et al. [8] предложили интегральный показатель функционального статуса больных ХОБЛ, в котором объединены спирометрические и клинические показатели – индекс BODE, где B – Bodi mass index (индекс массы тела), O – obstruction (выраженность бронхиальной обструкции по объему форсированного выдоха за 1-ю с в процентах от должного), D – dyspnoe (одышка по шкале MRC), «E» – exercise tolerance (толерантность к физической нагрузке с оценкой пройденного расстояния в метрах при 6-минутной ходьбе). Показана высокая корреляционная связь между индексом BODE и показателями качества жизни ($r=0,82$) [5].

Не вызывает сомнения важная роль гипоксемии в патогенезе ХОБЛ [1, 13, 14]. Мы попытались установить взаимосвязь между гипоксемией и некоторыми клинико-функциональными показателями, характеризующими качество жизни пациентов, а также оценить ценность САТ-теста в качестве инструмента, выявляющего влияние гипоксемии на состояние здоровья.

Материал и методы. Обследованы 42 больных ХОБЛ (40 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 47 до 72 лет. Все больные курили: индекс курящего человека составил $268,5 \pm 22,1$, количество пачко-лет – $41,3 \pm 2,8$. Согласно критериям GOLD, ХОБЛ средней стадии определялась у 6, тяжелой – у 28, крайне тяжелой – у 8 человек.

Помимо общеклинического обследования при поступлении всем пациентам определяли парциальное напряжение газов артериальной крови с помощью аппарата Blood Easy Gas (США), насыщение гемоглобина артериальной крови кислородом с помощью пульсоксиметра Nonin oxph (США). Критерием наличия гипоксемии считали снижение парциального напряжения кислорода ниже 80 мм рт. ст., насыщенности гемоглобина кислородом – ниже 95%. Влияние ХОБЛ на качество жизни оценивалось с помощью САТ-теста. Тест заполнялся самим пациентом, который отвечал на 8 вопросов, охватывающих такие аспекты, как кашель, отделение мокроты, затруднение дыхания, одышка, ограничение активности, уверенность, сон и энергичность. Каждый ответ оценивался по 5-балльной системе. Результаты теста интерпретировались по следующей схеме: от 0 до 10 баллов – незначительное, от 11 до 20 баллов – умеренное, от 21 до 30 баллов – сильное и от 31 до 40 баллов – чрезвычайно сильное влияние ХОБЛ на жизнь пациента. Всем пациентам проводился тест с 6-минутной ходьбой согласно стандартному протоколу [9]. Перед началом и в конце теста оценивались одышка по Боргу, насыщенность гемоглобина артериальной крови кислородом и частота пульса. Дистанцию, пройденную в течение 6 мин, измеряли в метрах и сравнивали с должным показателем, вычисленным по формулам:

$$6MWD(i) = 1140 - 5,61 \times \text{ИМТ} - 6,94 \times \text{возраст (для мужчин)},$$

$$6MWD(i) = 1017 - 6,24 \times \text{ИМТ} - 5,83 \times \text{возраст (для женщин)},$$

где 6MWD – 6 minutes walking distance (дистанция 6-минутной ходьбы), м, ИМТ – индекс массы тела, $\text{кг}/\text{м}^2$.

Степень одышки и ее влияние на состояние здоровья оценивалось по вопроснику Британского

Таблица 1

Параметры индекса BODE

| Параметр | Индекс BODE, баллы | | | |
|---|--------------------|---------|---------|------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| ОФВ ₁ , % от должного | >65 | 50–65 | 35–49 | <35 |
| Диспноэ по MRC, баллы | 0–1 | 2 | 3 | 4 |
| 6MWD, м | >350 | 250–349 | 150–249 | <149 |
| Индекс массы тела, $\text{кг}/\text{м}^2$ | >21 | <21 | – | – |

медицинского исследовательского совета – Medical Research Council (MRC) Dyspnea Scale – модификации шкалы Флетчера [6]. Интегральный показатель клинико-функционального статуса больного оценивали по индексу BODE, учитывая три градации: низкий – 0–3, средний – 4–6 и высокий – 7–10 баллов. Наибольшее число баллов означало наихудший прогноз (табл. 1).

Все пациенты были условно разделены на две группы: 1-я – 22 человека без признаков гипоксемии, 2-я – 20 человек с явлениями гипоксемии. Больных рандомизировали по основному показателю стадии ХОБЛ – объему форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ₁): в 1-й группе он составил $40,65 \pm 4,87\%$, во 2-й – $39,55 \pm 3,55\%$ от должного. Полученные результаты обработаны при помощи пакета прикладных программ Excel 7.0 и Statistica 6.0. с использованием непараметрических и параметрических критериев.

Результаты исследования. При поступлении средний балл по САТ-тесту у обследуемых составил $19,63 \pm 2,04$, что соответствовало «умеренному влиянию ХОБЛ на жизнь». Причем во 2-й группе данный показатель был достоверно выше, чем в группе без гипоксемии (табл. 2). В 1-й группе преобладали больные с умеренным, а во 2-й – с сильным влиянием ХОБЛ на жизнь. В процессе лечения, через 14 дней от момента поступления, средний балл САТ-теста недостоверно снизился в обеих группах. Но даже при выписке у больных 2-й группы он оставался выше. Из вышеизложенного можно заключить, что гипоксемия играет существенную роль в снижении качества жизни лиц с ХОБЛ, а САТ-тест является чувствительным в выявлении влияния гипоксемии на состояние здоровья пациентов.

Аналогичная закономерность получена и при анализе степени тяжести одышки по вопроснику MRC. У больных с гипоксемией при поступлении средняя оценка составила $2,99 \pm 0,19$, у больных без гипоксемии – $2,45 \pm 0,18$ балла, что было достоверно ниже и указывало на более выраженное снижение качества жизни у представителей 2-й группы. В пробе с 6-минутной ходьбой пациенты в обеих группах прошли значительно меньшую дистанцию, чем должная. Причем во 2-й группе это расстояние было несколько меньше, чем у больных без гипоксемии, однако достоверных значений эта разница не достигла (табл. 3).

При анализе изменений клинико-функционального теста BODE мы не выявили статистически значимых различий в обследуемых группах, хотя у больных с гипоксемией этот показатель был выше (табл. 4).

Таблица 2

Результаты САТ-теста

| Группа | Кол-во баллов | |
|--------|-----------------|---------------|
| | при поступлении | после лечения |
| 1-я | 17,45±2,17 | 12,05±2,06 |
| 2-я | 24,05±2,51* | 18,10±2,18* |

* Различия между группами статистически значимы.

Таблица 3

Результаты теста 6-минутной ходьбы с учетом насыщения гемоглобина артериальной крови кислородом (SaO₂)

| Группа | 6MWD, м | | SaO ₂ , % | |
|--------|------------|-------------|----------------------|-------------|
| | должное | фактическое | до теста | после теста |
| 1-я | 553,2±10,2 | 392,7±21,4* | 96,51±0,15 | 93,12±1,89 |
| 2-я | 563,2±17,4 | 371,9±22,3* | 92,32±0,50 | 90,71±0,62 |

* Различия с должным показателем статистически значимы.

Таблица 4

Результаты оценки индекса BODE и средние значения составляющих его параметров у пациентов с ХОБЛ

| Группа | Параметр | | | | Индекс BODE, баллы |
|--------|----------------------|------------|------------|------------------------|--------------------|
| | ОФВ ₁ , % | MRC, баллы | 6MWD, м | ИМТ, кг/м ² | |
| 1-я | 40,65±4,87 | 2,45±0,18 | 392,7±21,4 | 27,74±1,13 | 4,12±0,33 |
| 2-я | 39,55±3,55 | 2,99±0,19* | 371,9±22,3 | 25,74±2,13 | 5,04±0,39 |

* Разница с 1-й группой статистически значима.

Обсуждение полученных данных. Как известно, гипоксемия играет большую роль в патогенезе ХОБЛ, в частности в развитии легочной гипертензии, гипертрофии правых отделов сердца, системного воспаления и миокардиальных повреждений [1, 2, 12, 14]. По результатам исследования видно, что гипоксемия играет роль и в снижении показателей качества жизни. У больных ХОБЛ с гипоксемией достоверно были выше баллы по САТ-тесту, выраженнее степень одышки по MRC-тесту. Мы не получили достоверной разницы в группах по пробе с 6-минутной ходьбой и по BODE-тесту. Возможно, это связано с недостаточным количеством наблюдений, возможно – с выраженной гетерогенностью по индексу BODE даже в пределах одной стадии ХОБЛ, так как он включает не только ОФВ₁, но и другие клинико-функциональные параметры. Так, Б.А. Черняк и И.Н. Трофименко [5] показали, что среди пациентов с тяжелой ХОБЛ низкий индекс BODE (0–3 балла) определялся в 33 %, средний (4–6 баллов) – в 53 %, высокий (7–10 баллов) – в 14 % случаев. Для уточнения данных взаимосвязей требуются дальнейшие исследования.

Таким образом, у больных ХОБЛ установлена определенная взаимосвязь между наличием гипоксемии и некоторыми клинико-функциональными показателями, характеризующими качество жизни. При ХОБЛ с гипоксемией достоверно были выше баллы по САТ-тесту и выраженнее одышка по MRC-тесту. Тест САТ показал себя как простой и эффективный метод оценки степени влияния гипоксемии на состояние здоровья пациентов с ХОБЛ.

References

- Kinjajkin M.F., Suhanova G.I., Besednova N.N. et al. The role of hypoxemia and systemic inflammation in the formation of pulmonary hypertension and chronic pulmonary heart disease in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Dalnevostochnyj medicinskij zhurnal*. 2010. No. 1. P. 6–8.
- Kinjajkin M.F., Suhanova G.I., Udovichenko I.A., Kondrashova E.A. Myocardial damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Pulmonologija*. 2008. No. 5. P. 71–74.
- Senkevich N.Ju., Hanova F.M., Safrygin K.V. Four questions about the life quality, *Pulmonol. i allergol.* 2002. No. 4. P. 26–28.
- Chuchalin A.G., Belevskij A.S., Chernjak B.A. et al. The life quality for patients with chronic obstructive pulmonary disease in Russia: results of a multicenter population-based study of ICAR-COPD, *Pulmonologija*. 2005. No. 1. P. 93–102.
- Chernjak B.A., Trofimenko I.N. The life quality in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Hronicheskaja obstruktivnaja bolezn legkih* / ed. A.G. Chuchalina. M.: Atmosfera, 2008. P. 332–339.
- Bestall J.C., Paul E.A., Garrod R. et al. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax*. 1999. Vol. 54, No. 7. P. 581–586.
- Cazzola M., MacNee W., Martinez F.J. et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers, *Eur. Respir. J.* 2008. Vol. 31. P. 416–469.
- Celli B.R., Cote C.G., Marin J.M. et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease, *N. Engl. J. Med.* 2004. Vol. 350. P. 1005–1012.
- Enright P.L., Sherrill D.L. Reference equations for the six-minute walk in healthy adults, *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998. Vol. 158. P. 1384–1391.
- Jones P.W. St George's Respiratory Questionnaire: development, interpretation and use, *Eur. Respir. Rev.* 2002. Vol. 12. P. 63–64.
- Jones P.W., Harding G., Berry P. et al. Development and first validation of the COPD Assessment Test, *Eur. Respir. J.* 2009. Vol. 34. P. 648–654.
- Joppa P., Petrasova D., Stancak B., Tkacova R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension, *Chest*. 2006. Vol. 130. P. 326–333.
- Naeije R. Pulmonary hypertension and right heart failure in COPD, *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 2003. Vol. 59. P. 250–253.
- Von Euler U., Lijstrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in cat, *Acta Physiol. Scand.* 1946. Vol. 12. P. 301–320.

Поступила в редакцию 13.04.2011.

EFFECT OF HYPOXEMIA ON SEVERAL CLINICAL FUNCTIONAL PARAMETERS CHARACTERISING LIFE QUALITY OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE

M.F. Kinyaikin¹, G.I. Sukhanova¹, N.Yu. Rassokhina², A.V. Kramar³
¹Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Breathing of the Siberian Branch of RAMS – Research Institute of Medical Climatology and Restorative Treatment (73g Russkaya St. Vladivostok 690105 Russian Federation), ³Far Eastern Regional Medical Centre of the Federal Medical Bio-logical Agency of Russia (161 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – Having examined 42 patients with chronic obstructive lung disease, the authors focused upon clinical functional parameters that characterised the life quality (SAT-test, dyspnoea index by MRC scale, 6 minutes walking test, and BODE index), depending on hypoxemia. As reported, the patients with hypoxemia had the SAT-test balls reliably higher and the dyspnoea more evident (MRC-test). The SAT test appears to be simple and efficient method of estimating effect of hypoxemia on the patients' health.

Key words: hypoxemia, life quality, functional tests.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 77–79.

УДК 617.7-007.681-073.8/.97

СКРИНИНГОВАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

Я.Ф. Пестрякова¹, Г.А. Шабанов², В.Я. Мельников³, А.А. Рыбченко²

¹Медобъединение ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95),

²Научно-исследовательский центр «Арктика» ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95),

³Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: глаукома, диагностика, магнитоэнцефалография.

Работа посвящена изучению закономерностей изменений суммарной биоэлектрической активности головного мозга при первичной открытоугольной глаукоме с помощью индукционной магнитной энцефалографии. Обследовано 30 больных первичной открытоугольной глаукомой, 30 человек с глазным ишемическим синдромом и 30 человек, не имевших глазных заболеваний. Для регистрации диффузной ритмической активности мозга использовался оригинальный диагностический комплекс МЭГИ-01. Выявлены специфичные для первичной открытоугольной глаукомы изменения диффузной биоэлектрической активности головного мозга: нарушение работы адренорецепторных структур глаза, ослабление парасимпатического влияния на нервно-рецепторный аппарат, отличающийся богатством и разнообразием форм рецепторных элементов, сконцентрированных на границе цилиарного тела и дренажной зоны глаза. На основе полученных данных возможно создание корректирующей матрицы для нормализации вегетативного тонуса структур глаза при начальных стадиях глаукомы.

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – чрезвычайно важная медико-социальная проблема. На протяжении последних 10 лет глаукома занимает лидирующие позиции в структуре слепоты и слабовидения. Первичная инвалидность по этому заболеванию в Российской Федерации возросла с 16 % в 1995 г. до 40,2 % – в 2009 г. Доля глаукомы в нозологической структуре слепоты и слабовидения в России составляет 29 % [8]. Ожидается дальнейший рост данных показателей в связи со старением населения.

Несмотря на достигнутые за последние годы значительные успехи в диагностике и лечении глаукомы, в настоящее время в мире нет скрининговых процедур, которые могли бы точно установить наличие этого заболевания [1]. Диагностическая чувствительность тонометрии составляет здесь 39 %, офтальмоскопии – 45 %, периметрии – 52 % [14]. Полное обследование (компьютерная периметрия, гейдельбергская ретинотомиография, оптическая когерентная томография) стоит около 5000 рублей, что при средней пенсии в России, равной в 2010 г. 7100 рублей, делает его практически недоступным для пожилых пациентов, которые составляют основную группу риска по развитию глаукомы. Большинство указанных методов диагностики (гейдельбергская ретинотомиография, оптическая когерентная томография, сканирующая лазерная поляриметрия) регистрируют морфологические изменения зрительного нерва. Электрофизиологические методы, оценивающие функциональные отклонения, зависят от состояния пациента, носят субъективный характер,

имеют ряд ограничений. Так, компьютерная периметрия требует от пациента предельной внимательности и адекватности. В связи с этим поиск новых доступных и информативных методов диагностики глаукомы на ранних стадиях остается актуальным. Перспективным в этом направлении представляется метод индукционной магнитной энцефалографии, основанный на анализе суммарной биоэлектрической активности головного мозга, он позволяет по-новому подойти к выявлению глаукомы на стадии нарушения нейротрофической вегетативной регуляции. Спектральный анализатор вычисляет координаты патологического очага с целью последующего анализа и коррекции.

Материалы и методы. Работа выполнялась на базе лаборатории экологической нейрокибернетики НИЦ «Арктика» ДВО РАН, медицинского объединения ДВО РАН (Владивосток). В исследование были включены пациенты, проходившие курс лечения в глазном отделении Приморской краевой клинической больницы № 2, Приморском краевом диагностическом центре, а также в поликлинике ДВО РАН, после подписания информированного согласия и выполнения необходимых требований (в частности, исключение приема лекарственных средств за 2 дня до обследования).

На первом этапе работы были определены закономерности изменений диффузной биоэлектрической активности головного мозга в ответ на раздражение вегетативных рецепторов глаза фармакологическими стимуляторами и блокаторами интерорецепторов в виде глазных капель у офтальмологических больных по данным индукционной магнитоэнцефалографии (МЭГИ) [3]. Всем пациентам проводилось и стандартное офтальмологическое обследование. Регистрация и спектральный анализ диффузной биоэлектрической активности головного мозга осуществлялся при помощи магнитоэнцефалографа индукционного «МЭГИ-01» (патент № 72395, заявка № 2007145888, приоритет от 03.12.2007 г.), разработанного в лаборатории экологической нейрокибернетики научно-исследовательского центра «Арктика» ДВО РАН. Данный прибор является оригинальным и предназначен для функционально-топической диагностики дисфункций и заболеваний внутренних органов человека. Магнитоэнцефалограф имеет двухканальную систему отведения – соответственно левому и правому полушариям с установкой индукционных катушек в лобных отведениях. Диаметр катушек – 50 мм, расстояние между центрами катушек – 80 мм. Чувствительность усилителей – 2 пТл/см,

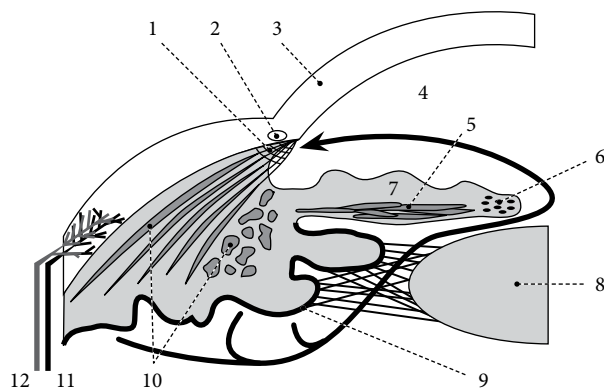


Рис. 1. Вегетативные рефлексы глаза (схема):

1 - трабекулярная сеть; 2 - шлеммов канал; 3 - роговица; 4 - передняя камера; 5 - мышца, расширяющая зрачок: α -адренорецепторы F1-2 (R), Th₁; 6 - круговая мышца радужки: M-холинорецепторы F6-2, Th; 7 - радужка; 8 - хрусталик; 9 - цилиарный эпителий: β -адренорецепторы F3-3 (L), C₅-Th_p, M-холинорецепторы F5-3 (R); 10 - цилиарная мышца: α -адренорецепторы, M-холинорецепторы F1-2 (R), F6-2 (R), C₂-C₆; 11 - α -адренорецепторы венозных сосудов F3-5 (R), C₄-C₆; 12 - α -адренорецепторы артериальных сосудов F2-5 (R), C₄-C₆.

частотный диапазон - 0,1-30 Гц. Уровень шума в полосе частот не более 1 мкв. Число полосовых фильтров при спектральном анализе - 840. Время одного обследования (суммации) - 160 сек. Число съёмов одного пациента - не менее трех. Таким образом, на обследование одного пациента уходило 15 мин, за час можно было обследовать 4 человека, при эксплуатации прибора в течение 6-часового рабочего дня - 24 человек, что позволяет применять данный метод для скрининга.

Данные МЭГИ подвергались программно-аппаратному анализу и представлялись в виде графиков, отображающих спектральную оценку в различных частотных диапазонах, соответствующих определенной группе вегетативных рецепторов. Спектральная оценка выражалась в относительных единицах по шкале ординат от 1 до 10. Шкала абсцисс отображала частотные диапазоны соответствующих определенному типу вегетативных рецепторов (F1-F7). Каждый график представлялся для определенной сегментарной области, отражающей спинно-мозговые рефлекторные вегетативные центры, в которых регистрировалась афферентная активность вегетативной нервной системы в соответствии с сегментарным строением спинного мозга.

Полученные результаты подвергались компьютерной обработке с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.

Следующий этап работы стал продолжением первого и заключался в исследовании спектральных характеристик ритмической активности головного мозга у больных с ПОУГ. Под наблюдением находились 90 пациентов. Всем было проведено электромагнитное исследование головного мозга в лаборатории экологической нейрокибернетики научно-исследовательского центра «Арктика» с помощью магнитоэнцефалографа. В ходе исследования были сформированы следующие группы наблюдения:

1) основная группа - 30 больных ПОУГ (критерии исключения - развитая и далекозашедшая стадии

Таблица
Спектральные характеристики вегетативных рефлексов глаза в норме и патологии (сегмент C₇)

| Функция | Спектральная характеристика, отн. ед. | |
|---------|---------------------------------------|--------------------|
| | основная группа | контрольная группа |
| F1-3 | 0,85±0,04 | 0,35±0,02 |
| F3-4 | 0,67±0,06 | 0,48±0,02 |
| F6-2 | 0,22±0,02 | 0,45±0,02 |

Примечание. Разница по всем функциям между группами статистически значима.

глаукомы и некомпенсированное повышение внутриглазного давления);

2) группа сравнения - 30 больных ишемической нейропатией;

3) контрольная группа - 30 пациентов с соматическими заболеваниями, не имевших повышенного внутриглазного давления.

Все группы были сопоставимы по полу, возрасту.

Результаты исследования. На первом этапе работы были достоверно определены частотные характеристики основных вегетативных рефлексов глаза в спектре магнитоэнцефалографии [3]. Каждый тип рефлексов имел свою центральную частоту. Так, холинергические препараты вызывали изменение графиков функций F6-2 в сегменте Th₁, что соответствовало вегетативной иннервации цилиарной мышцы глаза. Альфа-адреномиметик фенилэфрина гидрохлорид изменял функции F2-4 в сегментах C₇-Th₁. Бета-адреноблокатор тимолола малеат, снижающий внутриглазное давление через угнетение выработки внутриглазной жидкости отрезками цилиарного тела, повлиял на функции F1-5 в сегментах C₆-C₇ и F3-3 в сегменте Th₁. Во всех случаях полученные значения имели слабую корреляционную связь со значениями в других сегментарных областях (коэффициент ранговой корреляции Спирмена менее 0,25). Это указывало на то, что данные препараты в других сегментарных областях не действуют либо действуют в меньшей степени (рис. 1).

На втором этапе проводилось сравнение биоэлектрической активности головного мозга в определенных ранее координатах для рефлексов глаза в контрольной группе и у пациентов с патологией органа зрения. При анализе графиков, отображающих спектральную оценку в различных частотных диапазонах, наибольшие изменения функций при ПОУГ наблюдались в сегментах C₆-C₈ и Th₁ (табл., рис. 2). Изменения проявлялись в виде повышения функции F1-3, отражающей работу β -адренорецепторов гладкой мускулатуры, резкого перепада функции F3-3, 4 (тонус α -адренорецепторов венозных сосудов), угнетения M-холинорецепторов (функция F6-2). У лиц, не имевших глаукомы, таких изменений зарегистрировано не было. Для больных ишемической нейропатией было характерно выраженное повышение функции F2, отражающей тонус α -адренорецепторов артериальных сосудов, в указанных сегментарных областях.

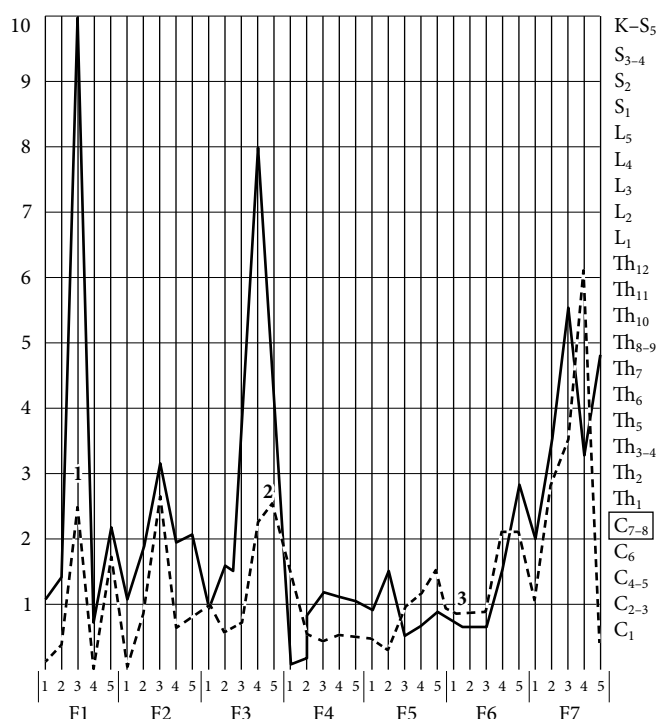


Рис. 2. График спектральной оценки МЭГИ у пациента с ПОУГ: показана реакция десинхронизации левого (пунктирная линия) и правого (сплошная линия) полушарий в области базовой функции F1–3 (1), перепад в F3–4 (2), уплощение в F6–1, 2 (3), сегментарный центр C_{7–8}. По оси абсцисс номера базовых функций (спектральных отрезков), по оси ординат величина спектральной оценки в относительных единицах и номера сегментарных центров.

Обсуждение полученных данных. В настоящий момент известен целый ряд работ по изучению динамики вегетативных реакций различных органов и систем как в спектре электроэнцефалографии, так и по данным МЭГИ. Вегетативные рецепторы представлены как преобразователи раздражения в частоту разрядов, центральные рефлекторные звенья – как частотно-селективные элементы или осцилляторы [10, 12]. На основе этих данных разработаны методы узкополосной фильтрации биопотенциалов мозга, которые позволили в спектре электроэнцефалограммы выделять длительно текущие ритмические «тонические» процессы, которые свойственны преимущественно фоновоактивным медленноадаптирующимся вегетативным рецепторам и их центральным звеньям управления [7, 13]. Для каждой группы ритмически активных рецепторов внутренних органов характерна своя центральная частота.

Имеются данные об изменении биоэлектрической активности коры головного мозга на различных этапах ПОУГ, убедительно показывающие роль регулирующего влияния на ее формирование неспецифических высших отделов вегетативной нервной системы [11]. Единичные публикации посвящены изучению динамики электроэнцефалограмм в ответ на инстилляцию в конъюнктивальный мешок глаза различных офтальмологических лекарственных средств с тенденцией к изменению корковой ритмики [9].

Определенные нами частотные спектры послужили основой для анализа уровня активности вегетативных рецепторов глаза и установления различий спектральных характеристик магнитоэнцефалограмм офтальмологических больных и здоровых исследуемых. Результаты работы подтверждают достоверность изменений биоэлектрической активности головного мозга в ответ на инстилляцию различных стимуляторов и блокаторов вегетативных рецепторов, по данным МЭГИ. Мы установили, что полученные диапазоны частот свойственны центральному рефлекторным звеньям определенных групп вегетативных рецепторов глаза.

Нарушения нейрогуморальной регуляции сосудистого тонуса признаются многими исследователями как причина возникновения дегенеративных заболеваний зрительного нерва и сетчатки, в частности глаукомы [2, 4]. Одним из ведущих патогенетических факторов первичной глаукомы является расстройство механизмов ауторегуляции внутриглазного кровотока, в формировании которого участвуют адренорецепторы тканей и сосудов глаза. Анализ экспериментального и клинического материала позволил сделать вывод о неоднородности адреноструктурных образований глаза, представленных α - и β -адренорецепторами [5, 6]. Мы выявили признаки нарушения вегетативного тонуса органа зрения при глаукоме. Они заключались в усилении адренергической активности вегетативных рефлексов цилиарной мышцы, дисрегуляции венозных сосудов, их дилатации с последующим венозным застоем, ослаблении парасимпатических рефлексов.

Таким образом, определены частотные характеристики основных вегетативных рефлексов глаза в спектре магнитоэнцефалографии, получены диагностические критерии ранних изменений рефлекторной активности при глаукоме. Эти данные позволяют синтезировать корректирующую матрицу для восстановления нормальных регулирующих влияний центральных отделов нервной системы на ранних стадиях первичной открытоугольной глаукомы, что может привести к определенным успехам в ее лечении.

References

1. Astahov Ju.S. The dialogue with the regions – the project of company “Merck Sharp & Dohme”, and “News of glaucoma”, *Novosti glaukomy*. 2010. No. 4. P. 8.
2. Bakshinskij P.P. Mechanisms of integral regulation in ocular blood flow, *Glaukoma*. 2007. No. 1. P. 47–58.
3. Veselov A.A., Melnikov V.Ja., Shabanov G.A. et al. The researches of the effects of ocular stimulants and autonomic receptor blockers according induction magnetoencephalography, *Medicinskaja fizika*. 2010. Vol. 4. P. 290–292.
4. Kasymova M.S. Prevalence and causes of violations of blood in the vessels for optic nerve, *Vestnik oftalmologii*. 2002. No. 5. P. 51–54.
5. Kashinceva L.T., Lipoveckaja E.M., Kopp O.P. Adrenoretseptsii influence on hemodynamics of eyes in experimental glaucoma, *Oftalmol. zhurn*. 1983. No. 7. P. 422–425.
6. Kryzhanovskij G.N., Kashinceva L.T., Lipoveckaja E.M., Kopp O.P. Adrenergic mechanisms of glaucoma, *Oftalmol. zhurn*. 1983. No. 8. P. 494–497.

7. Lebedev Ju.A., Shabanov G.A., Rybchenko A.A., Maksimov A.L. Activating system model of the spatial organization of the brain biopotentials: theoretical and experimental rationale, *Vestn. SVNC DVO RAN*. 2005. No. 1. P. 49–56.
8. Libman E.S., Chumaeva E.A., Elkina Ja.Je. Epidemiological characteristics of glaucoma, *HRT Klub Rossii: sb. nauchnyh statej*. M., 2006. P. 207–212
9. Mashkovskij M.D., Rowina L.F. Comparative effects of antiglaucomatous drugs on brain bioelectrical activity, *Farmakologija i toksikologija*. 1983. Vol. 46, No. 1. P. 23–28.
10. Sviderskaja N.E., Korolkova T.A. The spatial organization of the electrical processes in the brain: problems and solutions, *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti*. 1997. Vol. 47, No. 5. P. 792–811.
11. Sokolov V.A. The functional organization features of the central nervous systems in primary open-angle glaucoma, *Glaukoma*. 2001. No. 1. P. 8–11.
12. Fedotchev A.I., Bondar A.T., Akoev I.G. Rhythmic structure of the human EEG: current status and trends in research, *Uspehi fiziol. nauk*. 2000. Vol. 31, No. 3. P. 39–53.
13. Shabanov G.A., Lebedev Ju.A., Rybchenko A.A. Magnetoencephalography induction for functional topical diagnosis of internal organs diseases, *Almanah klinicheskoy mediciny: mat. III Troickoj konf. "Medicinskaja fizika i innovacii v medicine"*. M., 2008. Vol. 17, Part I. P. 252–255.
14. Katz J., Tielsch J.M., Quigley H.A. et al. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1993. Vol. 34, No. 12. P. 3271–3277.

Поступила в редакцию 30.03.2011.

SCREENING FOR PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Ya.F. Pestryakova¹, G.A. Shabanov², V.Ya. Melnikov³, A.A. Rybchenko²

¹Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russian Federation), ²Research Centre 'Arctica' FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russian Federation), ³Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The paper characterises regularities in changing total bioelectrical activity of brain in case of primary open-angle glaucoma using magnetic encephalography. The authors have examined 30 patients with primary open-angle glaucoma, 30 patients with ocular ischemic syndrome and 30 persons with no eye diseases. The original diagnostic complex MEGI-01 was used to register diffuse rhythmic activity of brain. It allowed detecting changes in the diffuse bioelectrical activity of brain being specific of primary open-angle glaucoma. These were disorders in the functioning of ocular adrenoceptor structures, weakening of the parasympathetic effects on the neuroreceptor apparatus known for abundance and variability of receptor elements concentrated at the boundaries of the ciliary body and drainage zone of the eye. The findings will allow to create correcting matrix designed to normalise vegetative tonus of ocular structures at early stages of glaucoma.

Key words: glaucoma, diagnostics, magnetoencephalography.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 80–83.

УДК 616.24-002-078:612.017.11

ОПТИМИЗАЦИЯ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

Н.М. Кондрашова¹, Н.Г. Плехова², Л.М. Сомова², А.В. Костюшко¹, Б.И. Гельцер¹

¹Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

²НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

Ключевые слова: внебольничная пневмония, индуцированная мокрота, иммунотерапия, резервные возможности фагоцитов.

Использован авторский способ оценки функциональной активности клеток врожденного иммунитета в очаге воспаления для оптимизации терапии у пациентов с внебольничной пневмонией. Подтверждено, что для определения состояния тканевого иммунного ответа целесообразно исследовать функциональную активность клеток индуцированной мокроты, как наиболее активно реагирующих на внедрение бактериальных агентов. С целью повышения объективности и достоверности результатов необходимо исследовать комплекс показателей функциональной активности фагоцитов с титрованием их резервных возможностей. Предложенный способ позволяет оценить степень влияния проводимой терапии на состояние местной защиты дыхательной системы и на этой основе дифференцированно подойти к назначению иммуномодулирующих препаратов.

К настоящему времени разработано множество надежных способов определения иммунологических параметров у человека, однако рекомендуемые методы контроля состояния иммунитета фиксируют в основном системные нарушения [4, 10, 11]. Вместе с тем роль топических

факторов защиты в противoinфекционном иммунитете трудно переоценить. Большинство проникающих в органы дыхания бактериальных агентов в локусе воспаления подвергаются утилизации клетками макрофагами и нейтрофилами без заметной стимуляции других звеньев иммунитета [7, 8]. Поэтому для диагностики состояния иммунного ответа при патологии легких целесообразно определять функциональную активность макрофагов и нейтрофилов – клеток врожденного иммунитета из очага воспаления, наиболее чутко реагирующих на различные внешние воздействия. При этом оценка состояния местной иммунной реакции может служить критерием эффективности этиопатогенетической терапии.

Определение показателей функционального состояния иммунитета позволяет оценить устойчивость организма к инфекционным агентам, прогнозировать развитие и течение заболевания [10, 11]. Важнейшей составляющей иммунной системы являются клеточные элементы врожденного иммунитета – основные эффекторы фагоцитоза. Причем в полной мере судить

Кондрашова Надежда Михайловна – канд. мед. наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней ВГМУ; e-mail: nmk5@mail.ru

о толерантности организма человека к бактериальной инвазии на основании тестирования отдельных показателей сложно, так как это не позволяет проследить весь спектр бактерицидных функций фагоцитов [11]. Выявление степени напряженности их функционального состояния в силу быстрой реакции в ответ на внедрение бактерий имеет особенное прогностическое значение. Помимо оценки исходной функциональной активности большое значение в диагностике резервных возможностей имеет выявление характера ответа фагоцитирующих клеток на дополнительную нагрузку, поскольку их способность резко усиливает метаболизм при стимуляции. При этом изменение активности фагоцитов в ответ на внесение стимулирующего агента *in vitro* может служить критерием, позволяющим максимально точно судить о состоянии иммунитета, и прежде всего о резервных возможностях этих клеток.

Учитывая высокую частоту заболеваний легких, антибиотикорезистентность основных возбудителей пневмоний, частое развитие бактериемии и других осложнений на их фоне, необходимо более глубоко изучать эту патологию. В развитии воспаления легких имеют значение не только массивность дозы возбудителя и его вирулентность, но и сниженная противомикробная защита дыхательных путей. Пневмония сопровождается системными реакциями как на уровне периферической крови, так и на уровне бронхоассоциированной лимфоидной ткани, всегда протекает с изменением функциональной активности в субпопуляциях клеток, а также с различными дисфункциями в системе комплемента и фагоцитоза [12].

Несмотря на многочисленные исследования иммунного статуса больных при патологии легких, работ, посвященных комплексному анализу функциональной активности клеточных элементов врожденного иммунитета, здесь практически нет. Преимущественно при анализе фагоцитоза определялась поглотительная активность либо нейтрофилов, либо моноцитов, при этом имелись противоречивые сведения как о высоких, так и о низких показателях у взрослых и детей [2, 6]. Необходимо также отметить, что исследование функционального состояния этих клеток преимущественно проводилось при изучении системных параметров иммунитета, тогда как исследование клеток индуцированной мокроты позволяет получить информацию не только о возбудителях инфекций дыхательных путей, но и о характере, выраженности и динамике воспалительного процесса, которые зависят от состояния клеток местного иммунитета [3].

Цель работы – оптимизировать оценку состояния клеток врожденного иммунитета путем исследования комплекса показателей функциональной активности фагоцитирующих клеток очага воспаления у пациентов с бронхолегочными заболеваниями.

Материал и методы. Обследовано 87 больных, госпитализированных по поводу внебольничной пневмонии (ВП) легкой и средней степени тяжести и 20 здоровых добровольцев-доноров (группа контроля).

Все пациенты были лицами мужского пола в возрасте 18–21 года, находившиеся в условиях организованных коллективов. Диагноз ВП устанавливался на основании общепринятых критериев [1]. Оценка тяжести состояния больных на момент поступления проводилась по Л.И. Дворецкому (1996). Всем пациентам в первый день поступления в стационар назначалась стандартная, в соответствии с существующими рекомендациями, антибактериальная терапия [1].

Пациенты со среднетяжелым течением пневмонии в зависимости от уровня реактивности клеток индуцированной мокроты были разделены на две подгруппы: 1-ю – со сниженными показателями резервных возможностей (ПРВ) фагоцитов и 2-ю – с повышенными параметрами ПРВ фагоцитов. Кроме того, 1-я подгруппа больных была разделена на две равнозначные по численности субподгруппы – А и Б. Пациентам субподгруппы А проводилось стандартное антибактериальное лечение, пациентам субподгруппы Б дополнительно назначалась иммунокорректирующая терапия ликолипидом (препарат назначали сублингвально по 1 мг ежедневно утром в течение 10 суток).

В качестве материала для исследования использовались фагоцитирующие клетки, извлеченные из индуцированной мокроты больных и доноров-добровольцев. Забор материала проводили в день поступления и на 10-й день лечения. Мокроту получали посредством индукции ее отхождения ингаляцией 3–5% стерильного гипертонического солевого раствора в течение 5–30 мин с помощью ультразвукового небулайзера по методу I. Pin и P.G. Gibson в модификации Т.А. Popov et al. [13, 14]. Отфильтрованную мокроту центрифугировали при 1200 об./мин в течение 10 мин, затем супернатант удаляли, а взвесь фагоцитов промывали три раза сбалансированным солевым раствором Хенкса. В камере Горяева подсчитывали концентрацию ядродержащих клеток и доводили ее до 2×10^6 /мл, затем разносили по 100 мкл в лунки плоскодонных иммунологических планшетов, инкубировали в течение 45 мин для адгезии клеток, после этого удаляли неадгезированные элементы путем двойного промывания теплой средой 199.

Для стимуляции клеток использовали *Staphylococcus aureus*. Для этого в лунки после адгезии лейкоцитов добавляли по 100 мкл рабочего раствора бактерий с концентрацией 20 м.к./мл, в контрольные лунки вносили 100 мкл среды 199. После инкубирования в течение 30 мин надсадок удаляли и клеточный монослой дважды отмывали от непоглощенных бактерий. Монослой высушивали и фиксировали в парах формалина в течение 15 мин, после чего исследовали ферментативную активность клеток.

Цитохимическую активность фагоцитов определяли по пяти показателям: продукция супероксид-аниона в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), активность миелопероксидазы, кислой фосфатазы (КФ) и 5'-нуклеотидазы (фермента цитоплазматической мембраны), внутриклеточное содержание неферментных катионных белков (КБ) [9]. Количество

Таблица 1

Показатели функциональной активности фагоцитов индуцированной мокроты при легком течении пневмонии

| Критерий | ПВР фагоцитов, % | | |
|------------------|------------------|------------------------|---------------|
| | Контроль | Больные (n=27) | |
| | | до лечения | после лечения |
| 5'-нуклеотидаза | -5,0±0,9 | -19,7±1,8 ¹ | -7,1±1,3 |
| НСТ-тест | 21,0±2,3 | 47,3±2,4 ¹ | 23,0±1,7 |
| Миелопероксидаза | 3,6±0,8 | 14,3±1,1 ¹ | 5,1±0,9 |
| КФ | 6,3±0,8 | 10,7±2,2 ¹ | 7,1±0,3 |
| КБ | 19,2±2,4 | 17,8±1,2 | 16,9±0,9 |

¹ Разница с контролем статистически значима.

продуктов реакции выявляли по величине оптической плотности на спектрофотометре Labsystem Multiscan RC (Финляндия) при соответствующих длинах волн. Исследование данных показателей функциональной активности фагоцитирующих клеток отличается достаточной простотой и скоростью выполнения.

Для оценки эффективности фармакологических препаратов использовали ПВР фагоцитов, который рассчитывали в процентах по формуле:

$$\text{ПВР} = (\text{ОПР}_{\text{опыт}} - \text{ОПР}_{\text{исх}}) / \text{ОПР}_{\text{исх}} \times 100,$$

где ОПР_{опыт} – оптическая плотность суспензии фагоцитов, стимулированных бактериями (OD10⁻³), ОПР_{исх} – исходная оптическая плотность суспензии нестимулированных фагоцитов (OD10⁻³) [9].

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 6. Вычисляли среднюю арифметическую и ее стандартную ошибку. Для оценки значимости различий показателей использовали парный Т-критерий Вилкоксона для зависимых выборок.

Результаты исследования. При легком течении ВП метаболическая активность клеток индуцированной мокроты характеризовалась достоверным (по отношению к показателям здоровых) увеличением ПВР, рассчитанным по НСТ-тесту, миелопероксидазе и КФ и снижением – по активности 5'-нуклеотидазы. ПВР фагоцитов относительно КБ достоверно не отличался от нормы. После антибактериальной терапии ПВР фагоцитов по НСТ-тесту, миелопероксидазе и КФ имели стойкую тенденцию к снижению, а по 5'-нуклеотидазе – к повышению. В конце срока наблюдения тестируемые показатели достоверно не отличались от таковых у группы здоровых (табл. 1).

У всех больных со среднетяжелым течением ВП значения ПВР по НСТ-тесту, активности миелопероксидазы и КФ были достоверно выше, чем у здоровых, тогда как по КБ и 5'-нуклеотидазе отмечено их снижение (табл. 2). После лечения у пациентов 2-й подгруппы все изучаемые показатели приблизились к значениям здоровых доноров и достоверно от них не отличались. Функциональную активность фагоцитирующих клеток и их резервные возможности у больных этой подгруппы мы расценили как достаточные и не требующие, кроме стандартной антибактериальной, дополнительной терапии.

Таблица 2

Показатели функциональной активности фагоцитов индуцированной мокроты больных среднетяжелой пневмонией при поступлении

| Критерий | ПВР фагоцитов, % | | |
|------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | Все больные (n=60) | 1-я подгруппа (n=38) | 2-я подгруппа (n=22) |
| | | | |
| НСТ-тест | 37,3±2,1 ¹ | 12,0±1,2 | 49,1±1,8 ¹ |
| Миелопероксидаза | 14,1±2,1 ¹ | 1,3±0,7 | 23,1±2,2 ¹ |
| КФ | 9,7±0,9 | 3,7±0,7 | 13,4±0,9 ¹ |
| КБ | 11,1±1,6 | 17,9±1,4 | 17,4±1,8 |

¹ Разница с контролем (см. табл. 1) статистически значима.

Таблица 3

Показатели функциональной активности фагоцитов индуцированной мокроты больных среднетяжелой пневмонией после лечения

| Критерий | ПВР фагоцитов, % | | |
|------------------|-----------------------|----------|----------------------|
| | 1-я подгруппа | | 2-я подгруппа (n=22) |
| | А (n=19) | Б (n=19) | |
| 5'-нуклеотидаза | -1,6±0,7 ¹ | -4,3±0,8 | -4,2±2,1 |
| НСТ-тест | 16,1±1,2 ¹ | 22,2±1,9 | 19,1±1,8 |
| Миелопероксидаза | 2,1±0,3 ¹ | 4,1±1,1 | 3,1±1,2 |
| КФ | 5,1±1,1 | 6,6±0,5 | 5,4±0,9 |
| КБ | 18,9±1,5 | 20,9±1,4 | 17,4±1,8 |

¹ Разница с контролем (см. табл. 1) статистически значима.

Уменьшение ПВР фагоцитов по НСТ-тесту, миелопероксидазе и КФ и, напротив, увеличение по 5'-нуклеотидазе у больных 1-й подгруппы свидетельствовало, по нашему мнению, об отсутствии адекватного местного иммунного ответа. У пациентов субподгруппы А 1-й подгруппы после стандартной антибактериальной терапии значения ПВР по трем параметрам (НСТ-тест, миелопероксидаза и 5'-нуклеотидаза) не достигли показателей здоровых доноров. У пациентов же субподгруппы Б после лечения, дополненного ликопидом, отмечалось достоверное увеличение ПВР фагоцитов, который после лечения не отличался от соответствующего показателя в группе доноров (табл. 3).

Обсуждение полученных данных. Исследование позволило установить неравнозначную, разнонаправленную метаболическую активность фагоцитирующих клеток при различной тяжести ВП, а также зависимость показателей функциональной активности этих клеток от проводимой терапии.

Выявленные изменения метаболизма клеток индуцированной мокроты больных при легком течении пневмонии, на наш взгляд, связаны с закономерной активацией фагоцитов на присутствие в очаге воспаления возбудителей заболевания. Характер изменений параметров ПВР клеток у таких больных после антибактериальной терапии свидетельствует о благоприятном течении заболевания, что является косвенным критерием бактериальной эрадикации, в условиях которой отпадает необходимость реализации резервных возможностей фагоцитирующих клеток.

У больных ВП со среднетяжелым течением иммунный ответ характеризовался как умеренным повышением реактивности фагоцитирующих клеток, так и снижением их функциональной активности. Приближение уровня изучаемых показателей к значениям здоровых лиц у пациентов с повышенным уровнем реактивности клеток индуцированной мокроты после традиционного лечения говорит о достаточной активности местного иммунитета на фоне адекватной терапии и не требует, на наш взгляд, дополнительных назначений.

Отсутствие адекватного местного иммунного ответа свидетельствует об истощении резервных возможностей фагоцитирующих клеток. В этих условиях на фоне только антибактериального лечения не происходит восстановления их функциональной активности, что требует, на наш взгляд, назначения иммунокорректирующей терапии дополнительно к стандартной антибактериальной. Выбор препарата должен быть обусловлен его действием на те звенья иммунной системы, в функциональной активности которых выявлены дефекты. Ликопид оказывает корректирующее влияние на показатели функциональной активности фагоцитов, повышая или понижая их исходные значения, что в конечном итоге приводит их в соответствие с показателями здоровых доноров. Этот препарат прост в применении, не имеет тяжелых побочных эффектов даже при очень высоких дозах (в десятки раз превышающих терапевтические) [5]. После антибактериальной терапии в сочетании с ликопидом достоверное увеличение ПРВ в сравнении со значениями до начала терапии и с показателями у доноров свидетельствует о восстановлении функциональных резервов иммунных фагоцитов и, соответственно, нормализации факторов местной защиты легких.

Таким образом, анализ динамики показателей резервных возможностей фагоцитирующих клеток локального звена иммунной системы у больных внебольничной пневмонией позволяет в короткие сроки не только объективно оценить эффективность стандартной антибактериальной терапии, но и служить критерием для назначения иммуномодулирующих препаратов.

Преимуществами предложенного способа оценки эффективности воздействия на факторы местной защиты у больных ВП являются:

1. Объективность – проводится комплексная оценка функциональной активности фагоцитов очага воспаления по пяти показателям, что отражает состояние местной защиты дыхательной системы;

2. Возможность непосредственно судить о резервных потенциях клеток врожденного иммунитета путем исследования активности фагоцитов индуцированной мокроты под влиянием стимулирующего агента *in vitro*;

3. Достоверность интерпретации результатов (использование формулы определения ПРВ фагоцитов);

4. Дифференцированный подход к назначению иммуномодулирующих препаратов с учетом исходных показателей резервных возможностей фагоцитов очага воспаления.

References

1. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for diagnosis, treatment and prevention / Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Strachunskij L.S. et al. M.: M-Vesti, 2006. 76 p.
2. Zholondz N.N. Clinic and community-acquired pneumonia in young adults with underweight: abstracts. Vladivostok, 2003. 22 p.
3. Nevzorova V.A., Pazych S.A., Konovalova E.N. et al. The induced sputum research in respiratory diseases: methodic materials for doctors. Vladivostok: Medicina DV, 2003. 116 p.
4. Lebedev K.A., Ponjakina I.D. Immune deficiency (detection and treatment). M.: Medicinskaja kniga, 2003. 443 p.
5. Likopid – new opportunities to reduce the seasonal incidence in children and adults: a miscellany of scientific articles. M: Taktik-Studio, 2009. 48 p.
6. Mavzjutova G.A., Fazlyeva R.M., Tjurina E.B. et al. The features of immune disorders in community-acquired pneumonia, *Medicinskaja immunologija*. 2007. Vol. 9, No. 6. P. 605–612.
7. Makarova O.P. The role of mononuclear phagocytes in the regulation of cellular responses by development of acute inflammation in the lung: abstracts. Novosibirsk, 2002. 39 p.
8. Panfilov D.V. Local cellular immunity in patients with lower respiratory tract infections: abstracts. M., 2000. 30 p.
9. Somova L.M., Plehova N.G., Kondrashova N.M. et al. The way to assess the effect of pharmacological agents on the local body protect factors on example of bronchopulmonary diseases. Patent No. 23376620 S1; Bul. 2008, no. 31.
10. Haitov R.M., Ignateva G.A., Sidorovich I.G. Immunology: norm and pathology. M.: Medicina, 2010. 752 p.
11. Haitov R.M., Pinegin B.V., Jarilin A.A. The diagnosis of immune system diseases: a manual for doctors. M.: GEOTAR-Media, 2009. 352 p.
12. Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Chernehovskaja N.E. Pneumonia. M.: Jekonomika i informatika, 2002. 408 p.
13. Pin I., Gibson P.G., Kolendowicz R. et al. Use of induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1992. Vol. 47. P. 25–29.
14. Popov T.A., Pizzichini M.M., Kolendowicz R. et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis, *Ibid.* 1995. Vol. 8. P. 559–565.

Поступила в редакцию 01.04.2011.

OPTIMISING ESTIMATION OF PARAMETERS DESCRIBING FUNCTIONAL ACTIVITY OF INNATE IMMUNE CELLS IN CASE OF INFLAMMATORY LUNG DISEASES

N.M. Kondrashova¹, N.G. Plekhova², L.M. Somova², A.V. Kostyushko¹, B.I. Geltser¹

¹Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation)

Summary – The authors have applied their own method of estimating functional activity of innate immune cells in the areas of inflammation in an effort to optimise treatment of patients diagnosed with community-acquired pneumonia. As confirmed, in order to identify the state of tissue immune response, it is expedient to examine functional activity of cells from induced sputum cells known to most actively respond to the bacterial agents. It is desirable to study a number of parameters of functional activity of phagocytes and test their reserve capacities in order to improve objectiveness and reliability of the results. The proposed method allows to estimate effects from the treatment on the local defence of respiratory system, and therefore in a differentiated manner arrive at administering immunomodulating drugs.

Key words: community-acquired pneumonia, induced sputum, immunotherapy, reserve capacities of phagocytes.

УДК 616.12-005.4-072:577.112.4

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

И.В. Чикаловец, О.В. Черников, В.И. Молчанова

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: С-реактивный белок, лектины, ишемическая болезнь сердца.

На основе нового аффинного сорбента разработана схема выделения С-реактивного белка (СРБ). В качестве источника для получения СРБ использовался пул сывороток больных с ишемической болезнью сердца. С использованием углеводсвязывающих белков-лектинов было показано, что углеводные цепи СРБ содержат моносахаридные остатки N-ацетилгалактозамина, галактозы, маннозы, N-ацетилглюкозамина и фукозы. Интенсивность связывания лектинов с иммобилизованным на планшете СРБ уменьшалась в ряду «галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный – N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный – LAA – конканавалин А». Константы связывания для галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичного и N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичного лектинов составляли 1,17 и 0,72 мкМ⁻¹ соответственно.

С-реактивный белок (СРБ) – наиболее характерный представитель семейства острофазных белков человека. Уровень СРБ быстро и многократно увеличивается при воспалении различной природы и локализации, паразитарных инфекциях, травмах и опухолях. Выявлена положительная корреляция уровня СРБ с тяжестью и динамикой клинических проявлений воспаления, где этот белок является наиболее специфичным и чувствительным клинико-лабораторным индикатором патологического процесса [1].

Постоянный мониторинг уровня СРБ, проведенный в последнем десятилетии для целей клинической диагностики и контроля эффективности лечения ишемической болезни сердца, онкологических заболеваний, а также изучение его структуры и многочисленных функций, привели к новым представлениям как о диагностической ценности этого белка, так и о его возможном участии в возникновении и развитии ряда заболеваний. Особенно многообещающим представляется изучение механизмов модификации СРБ, в частности, его гликозилирование при различных патологических процессах.

До недавнего времени считалось, что субъединицы СРБ не гликозилированы, и только в 2003 г. факт модификации был установлен при туберкулезе, висцеральном лейшманиозе, синдроме Кушинга, остеогенной саркоме [8]. Возможно, что модифицированные формы СРБ имеют такие измененные функциональные характеристики, как, например, эффективность связывания с вирусами, бактериями и другими патогенами и, может быть, разную способность активировать комплемент. Функциональное значение гликозилирования субъединиц

СРБ, которое происходит при разных патологических процессах, пока не выяснено и представляет несомненный интерес. К настоящему времени показано, что структура углеводных цепей ряда гликоконъюгатов в значительной степени зависит от типа и тяжести патологического процесса [14]. В связи с этим возникли принципиально новые подходы к дифференциальной диагностике заболеваний, которые основаны на выявлении изменений в углеводных структурах гликоконъюгатов. Наметились два пути для выявления их углеводного профиля, которые могут быть полезным инструментом для изучения строения, свойств и функций гликоконъюгатов: использование моноклональных антител к углеводным детерминантам и использование лектинов [11]. Лектины – общее название белков, обладающих свойством избирательно и обратимо связывать углеводы. Было показано, что применение лектинов в сочетании с возможностями ранее разработанных методов, основанных на выявлении антигенных детерминант антителами, может существенно повысить чувствительность и специфичность различных диагностических тест-систем.

Целью данной работы был анализ гликозилирования СРБ в сыворотке крови пациентов с ишемической болезнью сердца.

Материал и методы. Сыворотки крови были получены в Медицинском объединении ДВО РАН и Приморской краевой клинической больницы № 1 (г. Владивосток). В работе использовались лектины, выделенные нами из морских беспозвоночных [3], а также коммерчески доступные лектины конканавалин А из канавалии мечевидной *Canavalia ensiformis* и LAA из бобовника альпийского *Laburnum alpinum* (Sigma, USA). Концентрацию СРБ в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов СРБ-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия). Электрофорез в 15% полиакриламидном геле выполняли по методу Лэммли [10] с использованием прибора MV-III (Jim-X Scientific Instruments, China). Вестерн-блоттинг осуществляли с помощью системы ST-I (Jim-X Scientific Instruments, China), проявляя гликоформы СРБ лектинами или иммуноглобулинами, полученными против СРБ и мечеными пероксидазой хрена. Конъюгаты иммуноглобулинов и лектинов с ферментом получали периодатным методом Накане [13]. Содержание углеводов определяли фенолосерноокислотным методом [9].

Получение аффинного сорбента на основе полихрома («Реахим», Россия) и 3-Sn-лизофосфатидилхолина

Чикаловец Ирина Владимировна – канд. хим. наук, старший научный сотрудник лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОУХ; e-mail: ivchik6@mail.ru

(Sigma, USA) проводили сорбцией 20 мг фосфолипида на 4 мл сорбента в градиенте концентрации этанола в воде от 96 % (20 мл) до 10 % (200 мл) в замкнутом цикле в течение ночи с дальнейшей отмывкой сорбента водой (40 мл) и блокировкой неспецифических сайтов связывания сорбента бычьим сывороточным альбумином (40 мг в 10 мл дистиллированной воды) в течение 2 часов. Для подготовки к работе сорбент отмывали цитратным буфером (0,05 М лимонно-кислый натрий, 0,02 М Трис, 0,14 М NaCl, pH 7,8) и уравнивали Ca²⁺-содержащим буфером (0,02 М Трис, 0,14 М NaCl, 0,002 М CaCl₂, pH 7,8). Сорбент готовили к работе перед каждым циклом выделения СРБ.

Для выделения СРБ пул сывороток пациентов с ишемической болезнью сердца с высоким содержанием этого белка (от 10 до 10⁹ мг/л) пропускали через колонку с аффинным сорбентом. После отмывания несвязанных белков Ca²⁺-содержащим буфером СРБ элюировали цитратным буфером, объединенные фракции подвергали гель-фильтрации на колонке с Superdex 75 10/30 в TBS (0,02 М Трис, 0,14 М NaCl, pH 7,8). Дальнейшую очистку СРБ-содержащих фракций проводили ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50. Элюцию связанного с сорбентом белка осуществляли с помощью линейного градиента NaCl (0,14–0,75 М) в цитратном буфере.

Для твердофазного лектиноферментного анализа на 96-луночный планшет (Costar Corning Inc., USA) адсорбировали выделенный СРБ – по 0,1 мл в лунку в натриево-фосфатном буфере (0,01 М NaH₂PO₄, 0,15 М NaCl, pH 7,5) в концентрации 5 мкг/мл. Инкубировали ночь при 4 °С, после чего планшет промывали три раза раствором натриево-фосфатного буфера, содержащим 0,05 % твин-20 (отмывочный буфер). Для забивки свободных мест связывания на планшете во все лунки добавляли по 0,25 мл раствора бычьего сывороточного альбумина в концентрации 3 мг/мл, инкубировали два часа при 37 °С с перемешиванием. Избыток альбумина удаляли отмывочным буфером. На планшет двойными разведениями добавляли по 0,1 мл конъюгатов лектинов или иммуноглобулинов в концентрации от 1:100 до 1:6400 в отмывочном буфере. Инкубировали 1 час при 37 °С. Отмывали планшет, как описано выше. Для определения ферментативной активности пероксидазы в каждую лунку добавляли по 0,1 мл субстрата тетраметилбензидина. Планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре 10 мин и останавливали реакцию добавлением 0,05 мл 5 % серной кислоты. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре μ Quant (Bio-Tek Instrument Inc., USA) при 450 нм.

Результаты исследования. При выделении СРБ в каждой фракции методом иммуноферментного анализа определяли его уровень. После аффинного сорбента, полученного на основе полихрома и 3-Sn-лизофосфатидилхолина, удалось получить фракцию, содержащую почти 90 % СРБ от его количества в исходном образце.

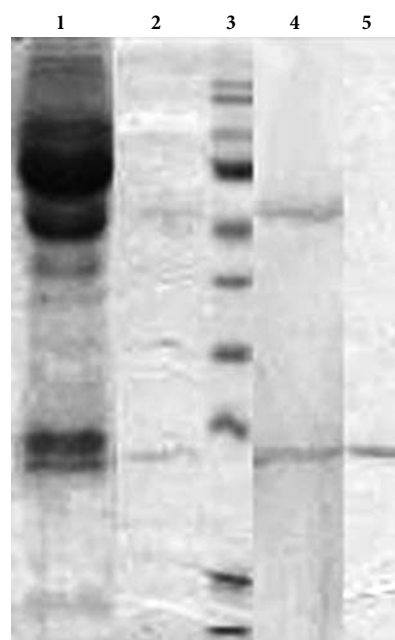


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия:

1 – суммарная сыворотка, 2 – СРБ после аффинной хроматографии, 3 – маркеры молекулярных масс (11, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130 и 170 кДа), 4 – СРБ после гель-фильтрации, 5 – СРБ после ионообменной хроматографии.

Очисткой гель-фильтрацией с выходом СРБ до 77 % была получена фракция, в которой, по данным электрофореза, содержалось два белка (рис. 1), поэтому полученную фракцию подвергали дальнейшей очистке ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50. СРБ был выделен с выходом 69 % как гомогенный препарат.

Для определения взаимодействия СРБ с иммуноглобулинами и углеводсвязывающими белками использовались иммуноглобулины G_{СРБ} и лектины, выделенные нами из морских беспозвоночных (галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин из мидии *Crenomytilus grayanus*, N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин из асцидии *Didemnum ternatanum*) [7, 12], а также коммерческие глюкоза/маннозоспецифичный конканавалин А и фукозоспецифичный LAA лектины. Интенсивность связывания лектинов с иммобилизованным на планшете СРБ, определенная методом твердофазного лектиноферментного анализа, была различной и уменьшалась в ряду лектинов: «галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный – N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный – LAA – конканавалин А». Причем связывание с LAA и конканавалином А было незначительным (рис. 2). Константы связывания, рассчитанные по методу Чипмана [15], для галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичного и N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичного лектинов составляли 1,17 и 0,72 мкМ⁻¹ соответственно. Кроме того, методом вестерн-блоттинга с использованием этих же конъюгатов была проверена специфичность связывания лектинов с выделенным СРБ (рис. 3).

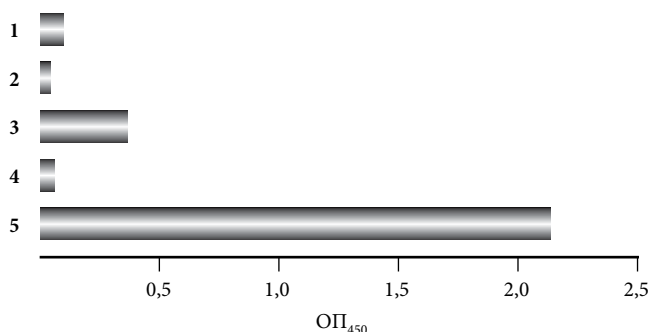


Рис. 2. Связывание СРБ, адсорбированного на полистирольном планшете, с лектинами и иммуноглобулином $G_{\text{СРБ}}$, мечеными ферментной меткой:

1 – иммуноглобулин G, 2 – конканавалин А, 3 – N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин, 4 – LAA, 5 – галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин.

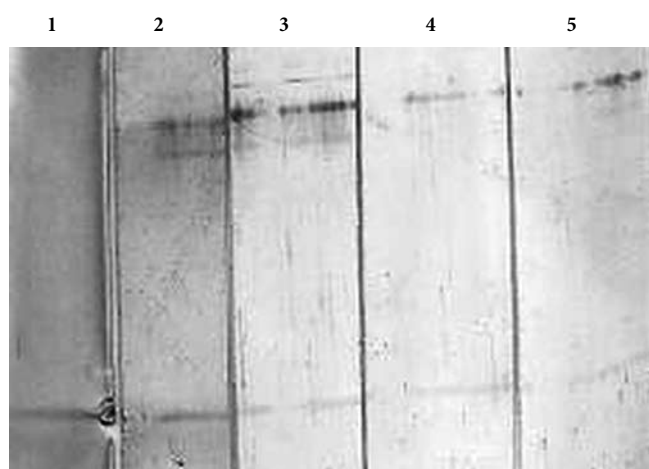


Рис. 3 Иммуноблоттинг:

частично очищенный СРБ после электрофореза и переноса на нитроцеллюлозную мембрану был обработан конъюгатами, содержащими ферментную метку, и проявлен субстратом диаминобензидином (1 – иммуноглобулин $G_{\text{СРБ}}$, 2 – галактоза/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин, 3 – конканавалин А, 4 – LAA, 5 – N-ацетилглюкозамин/N-ацетилгалактозаминспецифичный лектин).

Обсуждение полученных данных. Известно несколько способов выделения СРБ в нативном состоянии [2]. Нами были опробованы некоторые из них, но ни один не позволил получить белок в чистом виде и с хорошим выходом. Для выделения СРБ была разработана новая схема с использованием лизолецитина на гидрофобном носителе «Полихром». В результате удалось получить гомогенный препарат, по молекулярной массе соответствующий мономерной форме СРБ. Методом фенолосернокислотного анализа было показано наличие углеводов в выделенном образце.

Поскольку количество выделенного белка не было достаточным для определения моносахаридного состава общепринятыми методами, нами был использован оригинальный подход, заключающийся в применении лектинов – углеводсвязывающих белков с различной углеводной специфичностью [4]. Методами твердофазного лектиноферментного анализа и вестерн-блоттинга была выявлена различная реактивность лектинов в отношении СРБ, что

свидетельствует о наличии в углеводной части этого белка моносахаридов, специфичных для данных лектинов. Из этого следует, что углеводные цепи СРБ содержат значительное количество концевых моносахаридных остатков N-ацетилгалактозамина и, возможно, галактозы. Остатки маннозы, N-ацетилглюкозамина и фукозы находятся, скорее всего, в середине углеводной цепи, либо их содержание незначительно.

Ранее нами была показана микрогетерогенность СРБ в сыворотках крови здоровых лиц, а также пациентов с ишемической болезнью сердца, онкологическими заболеваниями и неязвенным колитом [5, 6]. Было установлено, что уровень лектин-реактивных гликоформ СРБ повышается с увеличением тяжести патологического процесса. В настоящей работе на примере СРБ, выделенного из сывороток больных ишемической болезнью сердца, убедительно показано не только наличие гликозилирования этого острофазного белка, но и определены моносахаридные остатки, входящие в состав его углеводных цепей. Данные результаты могут существенно повысить значимость СРБ как потенциального клинического маркера. Не исключено, что разные модифицированные формы СРБ удастся соотнести с конкретными формами патологии и/или с их количественными проявлениями, что позволит повысить прогностическую значимость тест-систем определения СРБ.

Работа выполнена при поддержке гранта ДВО РАН по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (09-1-П21-05) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

References

1. Velkov V.V. C-reactive protein - structure, function, methods of determination, the clinical significance, *Laboratornaja medicina*. 2006. No. 8. P. 1–7.
2. Zotova E.G., Mysjakin E.B., Toksambaeva S.Zh. et al. C-reactive protein: structure, properties, and methods of allocation, *Bioorganicheskaja himija*. 1995. Vol. 21, No. 10. P. 739–751.
3. Lukjanov P.A., Chernikov O.V., Kobelev S.S. et al. The carbohydrates binding proteins of marine invertebrates, *Bioorganicheskaja himija*. 2007. Vol. 33, No. 1. P. 172–181.
4. Chikalovec I.V., Molchanova V.I., Bulgakov A.A. et al. The usage of marine aquatic lectins for the diagnosis number of socially significant diseases in human, *Vestnik DVO RAN*. 2010. No. 5. P. 125–130.
5. Chikalovec I.V., Skiba M.A., Chernikov O.V. et al. Determination by glycoform of C-reactive protein as a marker of ulcerative colitis, *Vestnik Uralskoj medicinskoj akademicheskoi nauki*. 2009. No. 2/1 (24). P. 184–185.
6. Chikalovec I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Lukjanov P.A. Microheterogeneity of C-reactive protein in patients with coronary heart disease, *Vestnik Uralskoj medicinskoj akademicheskoi nauki*. 2010. No. 2/1 (29). P. 232.
7. Belogortseva N.I., Molchanova V.I., Kurika A.V. et al. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*, *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1998. Vol. 119 (1). P. 45–50.
8. Das T., Sen A., Kempf T. et al. Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological condition, *Biochem. J*. 2003. Vol. 373. P. 345–355.

9. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton I.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 1956. Vol. 28. P. 350–358.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of the bacteriophage T4, *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
11. Lis H., Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, *Chem. Rev.* 1998. Vol. 98. P. 637–674.
12. Molchanova V., Chikalovets I., Li W. et al. New GlcNAc/GalNAc-specific lectin from ascidian *Didemnum ternatanum*, *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1723. P. 82–90.
13. Nakane P.K., Lavoie A. Peroxidase-labeled antibody – new method of conjugation, *J. Histochem. Cytochem.* 1974. Vol. 22, No. 12. P. 1084–1091.
14. Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, *Cell.* 2006. Vol. 126, No. 5. P. 855–867.
15. Shoshan V., Shavit N., Chipman D.M. Kinetics of nucleotide binding to chloroplast coupling factor (CF1), *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. Vol. 504. P. 108–122.

Поступила в редакцию 18.03.2011.

GLYCOSYLATION IN C-REACTIVE PROTEIN IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

I.V. Chikalovets, O.V. Chernikov, V.I. Molchanova

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The new affine sorbent allowed to develop C-reactive protein excretion scheme. The pool of serum from patients with ischemic heart disease was used as source to obtain CRP. The carbohydrate-binding proteins – lectins – allowed to find out that the CRP carbohydrate chains contained the monosaccharide residues of N-acetylgalactosamine, galactose, mannose, N-acetylglucosamine, and fucose. The lectin binding intensity with immobilised on the CRP plate decreased in the line galactose/N-acetylgalactosamine-specific – N-acetylglucosamine/N-acetylgalactosamine-specific – LAA – concanavallin A. The binding constants with respect to galactose/N-acetylgalactosamine-specific and N-acetylglucosamine/N-acetylgalactosamine-specific lectins were 1.17 and 0.72 μm^{-1} , respectively.

Key words: C-reactive protein, lectins, ischemic heart disease.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 87–90.

УДК 616.24-007.271-036.12:612.127.2:616.747-009.1

РОЛЬ ГИПОКСЕМИИ В РАЗВИТИИ ДИСФУНКЦИИ МУСКУЛАТУРЫ ВЕРХНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Г.И. Суханова¹, М.Ф. Киняйкин¹, Н.Ю. Рассохина², А.В. Крамар³

¹Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ²Владивостокский филиал Дальневосточного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения (690105 г. Владивосток, ул. Русская, 73г), ³Дальневосточный окружной медицинский центр ФМБА России (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 161)

Ключевые слова: дисфункция скелетной мускулатуры, гипоксемия, хроническая обструктивная болезнь легких, сердечно-сосудистые заболевания.

У 68 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких 42–77 лет анализировалась сила мускулатуры верхних конечностей в зависимости от наличия гипоксемии и кардиальной патологии. Показано, что у лиц с гипоксемией дисфункция скелетной мускулатуры выраженнее, чем у больных без гипоксемии. Сопутствующая сердечно-сосудистая патология усугубляет эти изменения. Делается вывод, что своевременное назначение кислородной терапии имеет большое значение в устранении гипоксемии и предотвращении развития дисфункции скелетной мускулатуры у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.

Одним из внелегочных системных проявлений хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) являются дисфункция скелетных мышц и развитие сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ишемической болезни сердца и гипертонической болезни [5]. Дисфункция скелетных мышц характеризуется функциональными (снижение силы и выносливости) и анатомическими (атрофия, нарушение соотношения миофибрилл) изменениями, которые приводят к снижению физической работоспособности пациентов [3]. Патофизиологические механизмы, лежащие в основе этой дисфункции, изучены недостаточно, высказывались предположения о ведущей роли гипоксемии и системного воспаления [3,

6]. Кроме этого в качестве причин дисфункции скелетных мышц у больных ХОБЛ называют малоподвижный образ жизни, оксидативный стресс, низкий питательный статус, гиперкапнию, влияние лекарственных препаратов (кортикостероиды) и электролитных нарушений. О значении гипоксемии говорят результаты работ, выявивших тесную взаимосвязь между парциальным напряжением кислорода в артериальной крови и долей миофибрилл I типа в широчайшей мышце [9]. Гипоксемия ингибирует синтез протеинов в скелетных мышцах, приводит к Ca^{2+} -зависимому протеолизу миофибрилл [8]. Об участии системного воспаления в патогенезе дисфункции скелетной мускулатуры свидетельствуют исследования, выявившие взаимосвязь между степенью атрофии поперечно-полосатых мышц и уровнем маркеров воспаления (интерлейкинами 1 и 6, фактором некроза опухоли) [7].

Дисфункция скелетных мышц у больных ХОБЛ имеет важные медицинские и социальные последствия. Доказано, что она является причиной низкой толерантности пациентов к физическим нагрузкам и низкой повседневной активности, снижения качества жизни, значительного повышения затрат на лечение, а также снижения выживаемости [10, 11, 14, 15].

Показано, что сердечно-сосудистые заболевания обостряются не менее чем у 50% больных ХОБЛ [13].

Киняйкин Михаил Федорович – канд. мед. наук, доцент кафедры госпитальной терапии ВГМУ; e-mail: 589014@bk.ru

В то же время наличие ХОБЛ повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний в 2–3 раза [12]. Частота госпитализаций больных ХОБЛ по поводу инфекций нижних дыхательных путей в 3 раза ниже, чем частота госпитализаций вследствие сердечно-сосудистых событий [4]. В настоящее время доказано, что персистирующее системное воспаление, присутствующее при ХОБЛ, вносит свой вклад в патогенез атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [12]. В последние годы проведены исследования, показавшие важную роль гипоксемии в развитии системного воспаления при ХОБЛ [1, 2].

Исходя из вышеизложенного, можно говорить о единых патогенетических механизмах развития дисфункции скелетных мышц и сердечно-сосудистых поражений при ХОБЛ и предположить наличие взаимосвязи между уровнем гипоксемии, степенью дисфункции мышц и наличием сердечно-сосудистых заболеваний.

Цель исследования: оценить силу мышц верхних конечностей у больных ХОБЛ, в том числе при сочетании ее с ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью, в зависимости от наличия гипоксемии.

Материал и методы. Обследовано 68 пациентов с ХОБЛ в возрасте от 42 до 77 лет (средний возраст – $60,2 \pm 6,8$ года). Все пациенты курили: индекс курящего человека составил $270,4 \pm 23,2$, количество пачко-лет – $46,3 \pm 2,8$. ХОБЛ средней стадии (по GOLD, 2009) определялась в 13, тяжелой – в 44 и крайне тяжелой – в 11 случаях. У 18 пациентов имелась сопутствующая ишемическая болезнь сердца, у 16 – ишемическая болезнь сердца в сочетании с эссенциальной гипертонией II ст. Ишемическая болезнь сердца клинически проявлялась у 21 больного в виде стенокардии напряжения II–III функционального класса по Канадской классификации (в 3 случаях определялась постоянная форма фибрилляции предсердий). У 24 больных имелись признаки хронической сердечной недостаточности II функционального класса по Нью-Йоркской классификации. Верификация диагноза стенокардии напряжения выполнялась на амбулаторном этапе с использованием нагрузочных тестов. 7 пациентам со II стадией и 8 пациентам с III стадией ХОБЛ проводилась велоэргометрия, 6 пациентам с ХОБЛ III–IV стадии – чреспищеводная электрокардиостимуляция, 13 пациентам с ХОБЛ III–IV стадии – холтеровское мониторирование (зарегистрирована безболевого ишемия миокарда).

Все пациенты были условно разделены на четыре группы:

- 1-я группа (18 человек) – больные ХОБЛ без гипоксемии;
- 2-я группа (16 человек) – больные ХОБЛ с явлениями гипоксемии;
- 3-я группа (19 человек) – больные ХОБЛ с сопутствующими ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью без гипоксемии;
- 4-я группа (15 человек) – больные ХОБЛ с сопутствующими ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью с явлениями гипоксемии.

Таблица 1

Распределение больных по стадиям ХОБЛ

| Группа | Стадия ХОБЛ | | | | | | ОФВ ₁ , % к должному |
|------------|-------------|------|------|------|------|------|------------------------------------|
| | II | | III | | IV | | |
| | абс. | % | абс. | % | абс. | % | |
| 1-я (n=18) | 6 | 33,3 | 12 | 66,7 | – | – | 40,65±4,87 |
| 2-я (n=16) | – | – | 8 | 50,0 | 8 | 50,0 | 39,55±3,55 |
| 3-я (n=19) | 7 | 36,8 | 12 | 63,2 | – | – | 39,27±2,49 |
| 4-я (n=15) | – | – | 12 | 80,0 | 3 | 20,0 | 35,28±2,45 |

Распределение больных по стадиям ХОБЛ с указанием средней величины объема форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ₁) показано в табл. 1. Контрольную группу составили 15 некурящих мужчин сопоставимого возраста.

Помимо общеклинического обследования при поступлении больным определяли парциальное напряжение газов артериальной крови (PaO₂, PaCO₂) с помощью аппарата Blood Easy Gas (США), насыщение гемоглобина артериальной крови кислородом (SaO₂) с помощью пульсоксиметра Nonin oxux (США). Критерием наличия гипоксемии считали снижение PaO₂ ниже 80 мм рт. ст., SaO₂ – ниже 95%. Мышечную силу верхних конечностей измеряли в единицах мышечной силы (daN) с помощью кистевого динамометра ДК-50 на правой и левой руках.

Полученные результаты обработаны статистически при помощи пакета прикладных программ Excel 7.0 и Statistica 6.0 с использованием непараметрических и параметрических критериев. Подсчитывались средние величины и стандартные отклонения.

Результаты исследования. Во всех группах больных ХОБЛ отмечено достоверное снижение мышечной силы мускулатуры верхних конечностей, причем в группах с явлениями гипоксемии (2-я и 4-я) – более выраженное. Во 2-й группе мышечная сила была достоверно ниже на правой и левой руках по сравнению с 1-й группой. В 4-й группе по сравнению с 3-й мышечная сила была достоверно ниже только на правой руке.

У больных ХОБЛ с сопутствующей сердечно-сосудистой патологией как с явлениями гипоксемии (4-я группа), так и без них (3-я группа) отмечалось достоверное снижение силы мускулатуры обеих рук по сравнению с пациентами без сопутствующей сердечно-сосудистой патологии и гипоксемии (1-я группа). В то же время этот показатель достоверно не отличался от показателя, полученного у больных ХОБЛ без коморбидной сердечно-сосудистой патологии, но с гипоксемией (2-я группа). Наименьшая мышечная сила верхних конечностей зарегистрирована в 4-й группе, здесь же отмечены и самые низкие показатели SaO₂ и PaO₂ (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Снижение силы рук во всех группах больных свидетельствует, что ХОБЛ является непосредственной причиной развития дисфункции мускулатуры верхних конечностей. Более низкие показатели динамометрии у больных с гипоксемией указывают на ее важную патогенетическую роль в формировании развития миопатии. При сравнении

Таблица 2
Сила мускулатуры верхних конечностей и уровень гипоксемии у больных ХОБЛ

| Группа | Динамометрия, daN | | Инструментальные показатели | |
|----------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | правая рука | левая рука | SaO ₂ | PaO ₂ |
| 1-я | 34,66±2,10 ¹ | 32,73±1,79 ¹ | 96,80±0,15 | 79,20±2,2 ¹ |
| 2-я | 24,45±2,80 ^{1,2} | 24,72±2,44 ^{1,2} | 92,30±0,50 ^{1,2} | 65,80±2,67 ^{1,2} |
| 3-я | 27,80±2,18 ^{1,2} | 23,36±3,01 ^{1,2} | 96,70±0,32 | 78,20±2,63 |
| 4-я | 21,01±2,51 ^{1,2,3} | 20,40±3,10 ^{1,2} | 90,40±1,01 ^{1,2,3} | 56,10±3,76 ^{1,2,3} |
| Контроль | 42,67±3,01 | 40,73±2,31 | 97,80±0,51 | 79,50±2,68 |

¹Разница с контролем статистически значима.

²Разница с 1-й группой статистически значима.

³Разница с 3-й группой статистически значима.

двух групп с нормальными показателями сатурации и парциального напряжения кислорода в артериальной крови выявлено достоверное снижение силы мышц у лиц с коморбидной патологией. Это свидетельствует о том, что сердечно-сосудистые заболевания вносят определенный «вклад» в формирование скелетной миопатии. Наиболее низкие показатели динамометрии у пациентов с ХОБЛ, патологией сердечно-сосудистой системы и гипоксемией свидетельствуют о взаимном усилении отрицательного влияния этих факторов на состояние скелетной мускулатуры. Следует отметить, что у этих больных зарегистрированы самые низкие SaO₂ и PaO₂. Возможно, гипоксемия, активируя процессы системного воспаления, способствует развитию скелетной миопатии и поражению сердечно-сосудистой системы. Для подтверждения взаимосвязи между развитием дисфункции скелетной мускулатуры и степенью гипоксемии проведен корреляционный анализ, получена прямая достоверная связь между показателями динамометрии и SaO₂: на правой (r=0,462), на левой (r=0,460) руках.

Таким образом, у больных ХОБЛ имеется взаимосвязь между выраженностью дисфункции скелетной мускулатуры, наличием гипоксемии и сопутствующей сердечно-сосудистой патологии. Гипоксемия играет важную роль в развитии дисфункции скелетной мускулатуры: чем она выраженнее, тем значительнее дисфункция мускулатуры, особенно у лиц с сопутствующей кардиальной патологией. На основании проведенного исследования можно заключить, что своевременное назначение длительной кислородной терапии имеет большое значение в устранении гипоксемии и предотвращении развития дисфункции скелетной мускулатуры.

References

1. Avdeev S.N. Chronic obstructive pulmonary disease as a systemic inflammatory, *Hronicheskaia obstruktivnaja bolezn legkih* / ed. A.G. Chuchalin. M.: Atmosfera, 2008. P. 131–149.
2. Kinjajkin M.F., Suhanova G.I., Besednova N.N., Kuznecova T.A. Role of hypoxemia and systemic inflammation in the formation of pulmonary hypertension and chronic pulmonary heart disease in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Dalnevostochnyj med. zhurnal*. 2010. No. 1. P. 6–8.
3. Agusti A.G.N., Noguera A., Saulea J. et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease // *Eur. Respir. J.* 2003. Vol. 21. P. 347–360.

4. Anthonisen N.R., Connett J.E., Enright P.L., Manfreda J. Lung health study research group. Hospitalizations and mortality in the lung health study, *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. Vol. 166. P. 333–339.
5. Barnes P.J., Celli B.R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD, *Eur. Respir. J.* 2009. Vol. 33. P. 1165–1185.
6. Decramer M., De Benedetto F., Del Ponte A., Marinari S. Systemic effects of COPD, *Respir. Med.* 2005. Vol. 99. P. S3–S10.
7. Di Francia M., Barbier D., Mege J.L., Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease, *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994. Vol. 150. P. 1453–1455.
8. Jagoe R.T., Engelen M.P. Muscle wasting and changes in muscle protein metabolism in chronic obstructive pulmonary disease, *Eur. Respir. J. Suppl.* 2003. Vol. 46. P. 52–63.
9. Jakobsson P., Jorfeldt L., Brundin A. Skeletal muscle metabolites and fibre types in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), with and without chronic respiratory failure, *Eur. Respir. J.* 1990. Vol. 3. P. 192–196.
10. Jarratt J.A., Morgan C.N., Twomey J.A. et al. Neuropathy in chronic obstructive pulmonary disease: a multicentre electrophysiological and clinical study, *Eur. Respir. J.* 1992. Vol. 5. P. 517–524.
11. Joppa P., Petrasova D., Stancak B., Tkacova R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension, *Chest*. 2006. Vol. 130. P. 326–333.
12. Sin D.D., Man S.F. Why arc patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease, *Circulation*. 2003. Vol. 107. P. 1514–1519.
13. Sin D.D., Wu L., Man S.F. The relationship between reduced lung function and cardiovascular mortality: a population-based study and a systematic review of the literature, *Chest*. 2005. Vol. 127. P. 1952–1959.
14. Suggett A.J., Jarratt J.A., Proctor A., Howard P. Almitrine and peripheral neuropathy, *Lancet*. 1985. No. 2 (8459). P. 830–831.
15. Takabatake N., Nakamura H., Minamihaba O. et al. A novel pathophysiologic phenomenon in cachexic patients with chronic obstructive pulmonary disease: the relationship between the circadian rhythm of circulating leptin and the very low-frequency component of heart rate variability, *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001. Vol. 163. P. 1314–1319.

Поступила в редакцию 13.04.2011.

ROLE OF HYPOXEMIA IN FORMATION OF UPPER LIMB MUSCLE DYSFUNCTION IN CASE OF CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE

G.I. Sukhanova¹, M.F. Kinyaikin¹, N.Yu. Rassokhina², A.V. Kramar³
¹Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Breathing of the Siberian Branch of RAMS – Research Institute of Medical Climatology and Restorative Treatment (73g Russkaya St. Vladivostok 690105 Russian Federation), ³Far Eastern Regional Medical Centre of the Federal Medical Bio-logical Agency of Russia (161 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Summary – The authors have analysed muscular strength of upper limbs depending on hypoxemia and cardiac pathology in 68 patients with chronic obstructive lung disease aged 42 to 77 years and found out that the muscular dysfunction was more evident among the patients diagnosed with hypoxemia than among those without hypoxemia. The associated cardiovascular pathology aggravated these affections. The authors consider the proper administration of oxygen therapy is of great importance to eliminate hypoxemia and prevent skeletal muscles dysfunction in patients diagnosed with chronic obstructive lung disease.

Key words: skeletal muscles dysfunction, hypoxemia, chronic obstructive lung disease, cardiovascular pathology.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 90–92.

УДК 616-022.7:612.112.91:578.223

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ, ЗАРАЖЕННЫХ РНК-СОДЕРЖАЩИМИ ВИРУСАМИ

И.Н. Ляпун¹, Н.Г. Плехова^{1,2}, Л.М. Сомова¹, Е.И. Дробот¹, Н.В. Крылова¹, И.Г. Максема¹¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),²Дальневосточный федеральный университет (690091 г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27)**Ключевые слова:** нейтрофилы, ферменты, вирус клещевого энцефалита, хантавирус.

Приведены данные по определению функциональной активности нейтрофилов, зараженных вирусом клещевого энцефалита и хантавирусом. Установлено, что вирус клещевого энцефалита оказывает более выраженное действие на кислородообразующую активность нейтрофилов, чем хантавирус. Так, в клетках инфицированных возбудителем клещевого энцефалита, обнаружена тенденция к анаэробному пути энергопродукции, что согласовалось с повышением активности лактатдегидрогеназы. При этом сниженная активность миелопероксидазы указывала на подавление защитной реакции клетки в ответ на внедрение вируса.

В защите организма от вирусных заболеваний принимают участие клеточные элементы врожденного иммунитета – моноциты/макрофаги и нейтрофилы, которые играют ключевую роль в развитии раннего противоинфекционного ответа. Иммунная функция нейтрофилов при инфекционных заболеваниях главным образом ассоциируется с фагоцитозом и продукцией цитотоксических компонентов, в том числе нитроксидных и кислородных радикальных соединений [12]. Нарушение функциональной активности нейтрофилов может развиваться вследствие нерегулируемого апоптоза [6, 9]. Известно, что это явление может инициироваться внеклеточным воздействием фактора некроза опухоли- α или FAS-лиганда либо внутриклеточным путем, например, повышенным количеством кислородных радикалов [11]. Спектр биологически активных веществ нейтрофилов включает свободные кислородные радикалы, протеиназы, бактерицидные протеины и цитокины, которые как по отдельности, так и в совокупности, оказывают влияние на регуляцию иммунного ответа организма [5].

На данный момент для нейтрофилов обозначены три основные бактерицидные системы: 1) кислород-зависимая система, в состав которой входит ряд ферментов дыхательной цепи: никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидазный комплекс, сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, цитохромоксидаза и миелопероксидазная система; 2) нитроксидобразующая система, включающая реактивные посредники азота, производные нитроксидазсинтазы; 3) система белков нейтрофильных гранул (антимикробные белки, протеазы, серинпротеиназы, металлопротеиназы) [14].

Присутствие в периферической крови достаточного количества нейтрофилов и их наличие практически во всех органах обуславливает вероятность для этих

клеток одними из первых взаимодействовать с вирусами. Ранее сообщалось о способности нейтрофилов взаимодействовать с вирусом иммунодефицита человека, вирусами гриппа и Эпштейна–Барр и была установлена индукция апоптоза нейтрофилов данными вирусами [9, 10].

Вирусы рода *Hantavirus* относятся к семейству Bunyaviridae и передаются в основном воздушно-пылевым путем [13]. Хантавирусы патогенны для человека, и в данный момент известны два тяжелых заболевания человека, вызываемых ими: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и хантавирусный легочный синдром. Вирус клещевого энцефалита относится к семейству Flaviviridae. Геном у представителей этого семейства образует односторонняя отрицательная молекула РНК, заключенная в нуклеокапсид с икосаэдральным типом симметрии, репродукция флавивирусов происходит в цитоплазме [3, 7].

Целью нашего исследования являлось определение влияния РНК-содержащих вирусов на функциональную активность нейтрофилов.

Материал и методы. Первичную культуру нейтрофилов морских свинок получали, вызывая внутрибрюшинное воспаление, путем введения стерильного 1 % мясopептонного бульона (5 мл). Через 18 часов перитонеальную полость промывали 10 мл холодной среды 199 с гепарином (5 ед./мл). В полученном лейкоконцентрате число клеток доводили до 4×10^6 /мл, разносили во флаконы с покровными стеклами по 1 мл и плоскодонные планшеты по 100 мкл на лунку. Для адгезии взвесь нейтрофилов оставляли в CO_2 -инкубаторе, через 40 мин монослой клеток отмывали дважды от неадгезированных элементов.

Для заражения макрофагов были использованы культуральный штамм 9990 хантавируса, выделенный на клетках Vero-6 из суспензии легких инфицированной полевой мыши, и штамм Primorye-73 вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа, полученный на культуре клеток СПЭВ. В экспериментах использовали супернатантную вируссодержащую жидкость культуры клеток Vero-6 и СПЭВ, включавшую не менее 5 инфекционных единиц на нейтрофил, исходя из посадочной концентрации клеток и величины титра вируса, используемого для заражения. Затем вирусы продолжали инкубировать в среде 199, содержащей 20 % эмбриональной сыворотки коровы, 2 μM глутамина, 0,2 μM гентамицина и 100 ед./мл пенициллина. Время контакта нейтрофилов с вируссодержащей

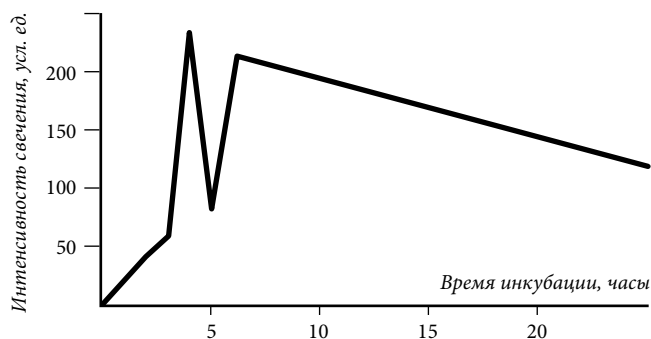


Рис. 1. Содержание антигена вируса клещевого энцефалита в нейтрофилах, спектрофотометрия с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

жидкостью составило от 5 до 60 мин, после чего монослой клеток дважды отмывался средой 199 для удаления внеклеточных вирусных частиц, и продолжалась инкубация в течение 15 мин, 45 мин, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 24, 48 и 72 часа.

Предметные стекла с адгезированными на них клетками высушивали на воздухе и фиксировали в течение 30 с по собственной модификации в холодном 96° этаноле. Это позволило сохранить вирусный антиген на плазматической мембране клеток. Затем применяли стандартную постановку непрямого метода флуоресцирующих антител. Интенсивность специфического свечения оценивали в условных единицах. Для определения вирусного антигена монослой зараженных клеток обрабатывали гомологичной иммуноасцитической жидкостью к штамму Primorye-73 вируса клещевого энцефалита и к штамму ПМ-Т79-95 вируса Хантаан в разведении 1:64 и объеме 5–20 мкл. В качестве флуоресцирующей сыворотки для выявления антигена вируса использовали Zenon Labeling Kit Alexa Fluor 546 против иммуноглобулина G1 мыши (Sigma, USA).

Для выявления апоптотически измененных клеток применяли метод окрашивания клеточного осадка Hoechst 333258 (Sigma, USA). Препараты исследовали в системе LSM510META при возбуждении 556 нм, подсчитывали 100 клеток и по наличию специфического свечения определяли долю апоптотически измененных клеток, которую выражали в виде индекса апоптоза.

Определение активности аденозин-моно-5'-нуклеотидазы (АМН) проводили путем добавления к монослою клеток 20 мкл субстрата для АМН (4 мг аденозин-5-трифосфата на 1 мл трис-НСI-буфера при рН 7,8, содержавшего 87 мг NaCl, 70 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$). Выявление активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) проводили по методу Лойда в собственной модификации [4].

Активность миелопероксидазы (МПО) определяли путем добавления к монослою клеток 100 мкл раствора (4 мг о-фенилендиамина на 10 мл фосфатно-цитратного буфера с рН 5,0 и добавлением 500 мкл 0,33 % перекиси водорода). Выявление активности катионных белков проводили путем добавления к монослою клеток 50 мкл раствора зеленого прочного

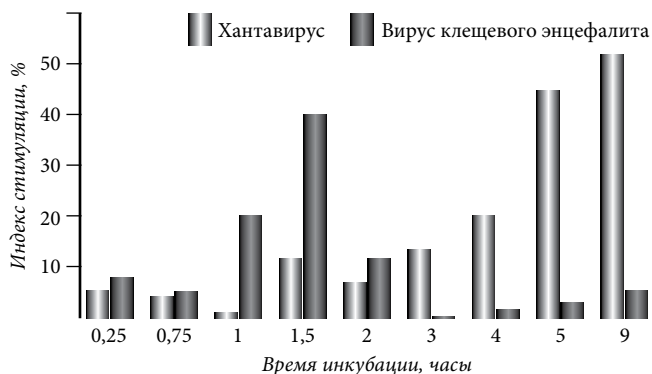


Рис. 2. Изменение активности АМФ в инфицированных вирусами нейтрофилах первичной культуры.

(1 мг зеленого прочного на 1 мл метанолового трис-буфера с рН 8,0–8,2)

Количество продуктов реакции вычисляли по поглощению раствора на спектрофотометре Labsystem Multiscan RC (Финляндия) при соответствующих для определяемых субстратов длинах волн.

Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимуляции, который вычислялся в процентах как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции зараженных нейтрофилов и интактных клеток, к среднему показателю оптической плотности раствора для интактных клеток.

Результаты исследования. С помощью непрямого флуоресценции после 1 часа контакта вируса клещевого энцефалита с нейтрофилами определялось специфическое свечение цитоплазмы, преимущественно диффузного характера. Через 2 часа инкубации появлялось внутриклеточное свечение в виде глыбок, и его интенсивность достигала $42,6 \pm 5,6$ усл. ед. (рис. 1), максимальные показатели составили $234,6 \pm 15,7$ усл. ед. после 4 часов инкубации, затем они кратковременно снижались (через 5 часов) и вновь нарастали, до 24 часов наблюдения оставаясь на значительном уровне. В дальнейшем, ко 2-м суткам наблюдения, количество антигенпозитивных нейтрофилов было минимальным вследствие деградации клеток. Подобная же динамика показателей наблюдалась при исследовании нейтрофилов, инфицированных хантавирусом.

Установлено, что вирус клещевого энцефалита способен индуцировать апоптоз нейтрофилов в большей степени, чем хантавирус. Так, индекс апоптоза для нейтрофилов, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, через 8 часов составил $48,0 \pm 5,3$ %, тогда как при заражении клеток хантавирусом этот показатель в тот же срок равнялся $35 \pm 3,1$ %.

АМН является основным ферментом пуринового катаболизма, играющим важную роль в восприятии клетками внешних сигналов. Она локализуется на наружной мембране клеток и является регулятором уровня циклического аденозинмонофосфата. Нами установлено повышение активности АМН в нейтрофилах после заражения хантавирусом в течение всего периода наблюдения (рис. 2). Показатели активности

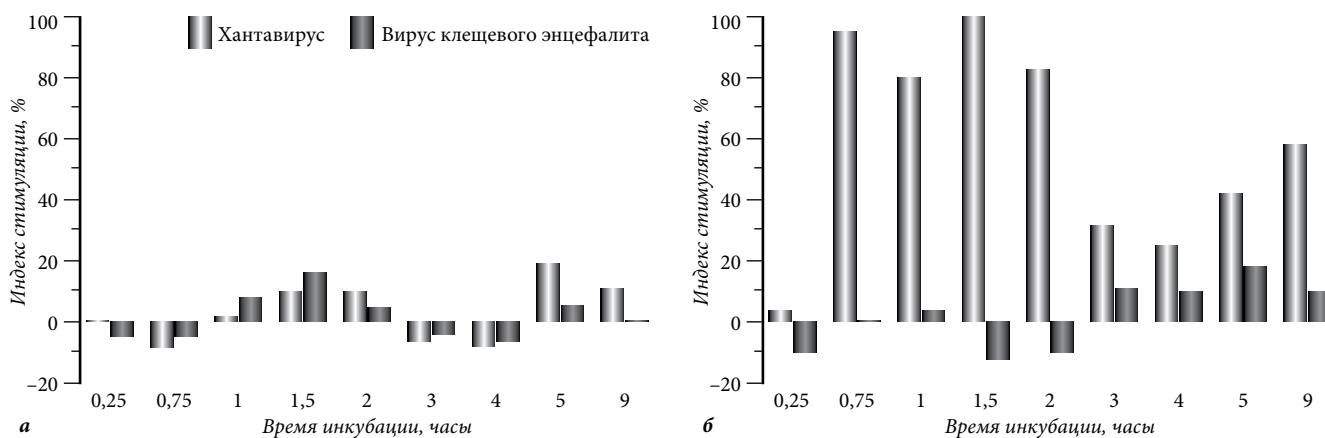


Рис. 3. Изменение активности ЛДГ (а) и МПО (б) в инфицированных вирусами нейтрофилах первичной культуры.

этого фермента составили от $1,5 \pm 0,5$ до $51,2 \pm 1,3$ % относительно контроля, который был принят за 0. В нейтрофилах, зараженных вирусом клещевого энцефалита, показатели активности АМН в начальные сроки заражения (до 1,5 часа) повышались до $40,2 \pm 0,9$ %, затем отмечалось их снижение (до $5,9 \pm 0,3$ %) до конца срока наблюдения (рис. 2). Таким образом, данные по активности АМН указывают на выраженную стимуляцию нейтрофилов при заражении их вышеуказанными вирусами. При этом стимуляция нейтрофилов, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, происходила в начальные сроки после заражения, тогда как реакция нейтрофилов на введение хантавируса регистрировалась на 9-м часу наблюдения.

Характерной особенностью метаболизма нейтрофилов является их способность под влиянием различных факторов мгновенно генерировать кислородные радикалы. В образовании реактивных продуктов кислорода при переносе водорода от субстрата, подвергающегося окислению – «донора водорода», на другой субстрат – «акцептор водорода» принимает участие ЛДГ, которая катализирует заключительный этап гликолиза – обратную реакцию восстановления пирувата в лактат.

При заражении нейтрофилов динамика показателей активности ЛДГ носила волнообразный характер (рис. 3, а). Так, после заражения хантавирусом индекс стимуляции для ЛДГ достигал минимального значения через 45 мин и 4 часа и составлял $-8,8 \pm 0,7$ %. Максимальное значение индекса стимуляции получено через 5 часов – $19,6 \pm 0,5$ %. При заражении вирусом клещевого энцефалита в начальные сроки индекс стимуляции для ЛДГ снижался до $-4,5 \pm 0,3$ % (45 мин), затем повышался до $16,5 \pm 0,8$ % (1,5 часа), повторное его понижение отмечалось через 4 часа ($-6,5 \pm 1,2$ %) с последующим повышением до конца срока наблюдения ($9,5 \pm 0,9$ %).

МПО – это гемопротейн, присутствующий в азурофильных гранулах нейтрофилов, выходящий при активации клетки в фаголизосоме. Этот фермент принимает участие в преобразовании супероксидного аниона в следующий мощный окислительный компонент – гипохлорную кислоту, осуществляя таким образом защиту клетки от избыточного количества реактивных посредников кислорода [14].

При заражении нейтрофилов хантавирусом активность МПО имела высокие значения на протяжении всего срока наблюдения (рис. 3, б). Так, в начальные сроки заражения (45 мин – 2 часа) отмечен максимальный индекс стимуляции ($100,0 \pm 2,3$ %), через 4 часа он снижался (до $25,6 \pm 0,2$ %), а через 9 часов – вновь увеличивался (до $58,4 \pm 0,7$ %). При инфицировании же вирусом клещевого энцефалита показатели активности МПО имели низкие значения на протяжении всего срока наблюдения, незначительно повышаясь к его концу.

Катионные белки относятся к специфическим маркерам нейтрофилов, и выявление их активности при патологических состояниях дает представление об активации кислороднезависимой бактерицидной системы. Нами установлено, что активность катионных белков в нейтрофилах, зараженных хантавирусом, достоверно не отличалась от контроля, тогда как при заражении вирусом клещевого энцефалита она возрастала через 1 час до $18,5 \pm 1,3$ %, а затем снижалась до $-17,9 \pm 0,2$ % к концу срока наблюдения. Эти данные указывают на первоначальную стимуляцию кислороднезависимой системы нейтрофилов в ответ на внесение вируса с последующей катионизацией.

Обсуждение полученных данных. Известно, что 5'-нуклеотидаза катализирует гидролиз преимущественно аденозинмонофосфатов и инозинмонофосфатов и может также катализировать гидролиз дезоксирибонуклеозидмонофосфатов. Причем при вирусных инфекциях нуклеозидтрифосфаты, которые синтезируются при участии 5'-нуклеотидаз, служат строительными блоками для вирусной РНК или функционируют в качестве коферментов. Поэтому в случае повышения общей синтетической активности клетки выявляется повышение внутриклеточного содержания 5'-нуклеотидаз [2]. На наш взгляд, зарегистрированное повышение внутриклеточного содержания АМН в зараженных нейтрофилах можно связать с выработкой нуклеозидтрифосфатаз и нуклеотидаз, используемых при синтезе вирусных компонентов. Обнаруженные временные различия максимальной активности этого фермента вполне объяснимы с учетом того, что патологический процесс при клещевом энцефалите развивается быстрее, чем при хантавирусной инфекции.

Нарушение передачи электронов по электронно-транспортной цепи митохондрий и клеточных мембран при стимуляции нейтрофила приводит к появлению активных метаболитов кислорода, которые нестабильны и реактивны [4]. Их действие улавливается теми мишенями, которые находятся в непосредственной близости. К таким мишеням относят различные соли тетразолия, используемые в качестве субстратов для определения активности ферментов. При анализе активности ЛДГ нами установлена более ранняя стимуляция нейтрофилов в ответ на введение вируса клещевого энцефалита. Это свидетельствует в пользу того, что вирус клещевого энцефалита оказывает более выраженное действие на кислородобразующую активность нейтрофилов, чем хантавирус. Нейтрофилы относятся к клеткам с преимущественно аэробным типом обмена, тем не менее повышение в них активности ЛДГ связывают с изменениями интенсивности гликолиза [1]. Так, образование богатых энергией фосфорных соединений путем анаэробного гликолиза свидетельствует об интенсификации энергообеспечения нейтрофилов. Этот путь окисления может быть расценен как компенсаторный механизм адаптивной реакции этих клеток на воздействие стимула. Обнаруженную в начальные сроки после заражения клещевым энцефалитом повышенную активность ЛДГ в нейтрофилах, на наш взгляд, следует расценивать как увеличение энергетического потенциала клетки, который является проявлением ее адаптивной реакции на внедрение возбудителя. На наличие относительной стабильности энергетического гомеостаза нейтрофилов, вероятно, указывали данные о внутриклеточном содержании ЛДГ после заражения клеток хантавирусом, т.к. повышенная активность этого фермента выявлялась в конце срока наблюдения.

Известно, что до 90% потребленного нейтрофилами кислорода идет на образование супероксидного радикала, а затем перекиси водорода [8]. Для ликвидации превышающего количества вредных окислителей клеточных компонентов, к которым относят активные метаболиты кислорода, в фагоцитах существует ряд ферментных систем-антиокислителей. К числу таковых принадлежит МПО, субстратом для которой является перекись водорода. Выявленная в начальные сроки контакта повышенная активность МПО в зараженных хантавирусом нейтрофилах отражает их защитную реакцию на внедрение данного инфекта. В то же время в нейтрофилах, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, активация данного фермента не наблюдалась.

Таким образом, полученные результаты показывают, что вирус клещевого энцефалита оказывает более выраженное действие на кислородобразующую активность нейтрофилов, чем хантавирус. При этом в клетках обнаружена тенденция к анаэробному пути энергопродукции, что согласуется с повышением активности ЛДГ. Малая же активность МПО в нейтрофилах, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, указывает на подавление защитной реакции клетки на внедрение этого возбудителя. Как показано

в настоящем исследовании, в конечном итоге это приводит к гибели нейтрофилов путем апоптоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.740.11.0182).

References

- Zenkov N.K., Menwikova E.B. Activated oxygen metabolites in biological systems, *Uspehi sovremennoj biologii*. М., 1993. Vol. 113, No. 3. P. 286–296.
- Kolman Ja., Rem K.-G. Visual biochemistry. М: Mir, 2000. 469 p.
- Pletnev A.G. The structure, organization and detection of genome-borne encephalitis virus: abstrakts. М., 1990. 304 p.
- Plehova N.G., Somova L.M., Drobot E.I. et al. The change in the metabolic activity of macrophages under the influence of tick-borne encephalitis, *Biohimija*. 2007. Vol. 72, No. 2. P. 236–246.
- Shepelev A.P., Kornienko I.V., Shestopalov A.V. et al. The free radical oxidation role in the infectious diseases pathogenesis, *Voprosy medicinskoj himii*. 2000. No. 2. P. 12–26.
- Arruda M.A., Barja-Fidalgo C. NADPH-oxidase activity: in the crossroad of neutrophil life and death, *Frontiers in Bioscience*. 2009. Vol.14. P. 4546–4556.
- Brinton M.A., Dispoto J.H. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA, *Virology*. 1988. Vol. 162. P. 290–299.
- Cross A.R., Jones O.T.G. Enzymic mechanisms of superoxide production, *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. Vol. 1057. P. 281–298.
- Elbim C., Monceaux V., Mueller Y.M. et al. Early Divergence in Neutrophil Apoptosis between Pathogenic and Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections of Nonhuman Primates, *J. Immunol*. 2008. Vol. 181. P. 8613–8623.
- Engelich G., White M., Hartshorn K.L. Role of the respiratory burst in co-operative reduction in neutrophil survival by influenza A virus and *Escherichia coli*, *J. Med. Microbiol*. 2002. Vol. 51. P. 484–490.
- Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J. Cell. Biol*. 2007. Vol. 176, No. 2. P. 231–241.
- Kennedy A.D., DeLeo F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection, *Immunol. Res*. 2009. Vol. 43. P. 25–61.
- Schmaljohn C., Schmaljohn A., Dalrymple J. Hantaan virus M RNA: Coding strategy, nucleotide sequence, and gene order, *Virology*. 1987. Vol. 157. P. 31–39.
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha L., et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects, *Laboratory Invest*. 2000. Vol. 80. P. 617–653.

Поступила в редакцию 18.04.2011.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS INFECTED BY RNA VIRUSES

I.N. Lyapun^{1,2}, N.G. Plekhova^{1,2}, L.M. Somova¹, E.I. Drobot¹, N.V. Kryilova¹, I.G. Maksema¹

¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ²Far Eastern Federal University (27 Ok-tyabrskaya St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Summary – The paper comprises the findings related to the functional capacity of neutrophils infected by tick-borne encephalitis virus and Hantavirus. The authors found that tick-borne encephalitis virus have taken more significant effect on the oxygen-generating capacity of neutrophils rather than Hantavirus. As such, in the cells infected by causative agent of the tick-borne encephalitis virus, there was a tendency to anaerobic way of energy production that corresponded to an increase of the lactate de-hydrogenase activity. Thus, the reduced capacity of myeloperoxidase showed to suppression of cell protective potency in response to virus infiltration. **Key words:** neutrophils, enzymes, tick-borne encephalitis, Hantavirus.

Pacific Medical Journal, 2011, No. 1, p. 93–96.

УДК 616.153.915:611.018.74:616.13-004.6

РАЗВИТИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ*Е.П. Турмова¹, П.А. Лукьянов², А.А. Григорюк¹, Е.А. Бычков¹, А.В. Цыбульский³*¹ Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),³ Дальневосточный федеральный университет (690091 г. Владивосток, ул. Суханова, 8)*Ключевые слова: гиперлипидемия, цитокины, эндотелиальная дисфункция, эксперимент.*

Оценивались содержание некоторых цитокинов, НАДФ-диафоразы и показатели общей оксидантной и антиоксидантной активности в стенках аорты и бедренных артерий у крыс линии Вистар при экспериментальной гиперлипидемии. Зарегистрированы снижение уровня НАДФ-диафоразы в эндотелии. И в эксперименте, и в интактном контроле уровень интерлейкина-4 в аорте оказался значительно ниже, чем в бедренной артерии. При гиперлипидемии в бедренных артериях отмечалось снижение содержания интерлейкина-4, а в стенке аорты – увеличение уровней интерлейкина-4 и γ -интерферона и уменьшение оксидантной и антиоксидантной активности с низким оксидантным индексом. Установлено стимулирующее влияние интерлейкина-4 и ингибирующее действие γ -интерферона на общую оксидантную и антиоксидантную активность в стенке аорты.

С современных позиций ключевым звеном в патогенезе атеросклероза считается эндотелиальная дисфункция с дисбалансом между основными функциями эндотелия: вазодилатацией и вазоконстрикцией, ингибированием и содействием пролиферации, антитромботической и протромботической, антиокислительной и проокислительной активностью [1, 4, 5, 11, 14]. Показано, что при атеросклерозе наблюдается интенсификация процессов перекисного окисления липидов и снижение уровня антиоксидантной защиты [2, 4, 7].

Повреждение эндотелия сопровождается активацией (праймаингом) полиморфно-ядерных лейкоцитов (нейтрофилов), усилением секреции ими активных форм кислорода (синглетного кислорода и перекиси водорода) и интенсификацией перекисного окисления белков и жирных кислот [7]. Оксид азота – сигнальная молекула, которая осуществляет межклеточные взаимодействия и регулирует перекисное окисление липидов. В физиологических условиях оксид азота выступает в роли антиоксиданта, тормозит радикальные окислительные реакции, связываясь со свободными ионами двухвалентного железа, входящими в состав гема. При гиперпродукции активных форм кислорода происходит окисление липопротеидов, что способствует повышению синтеза кавеолина-1 и приводит к снижению образования оксида азота эндотелием [4, 7]. При активации свободнорадикальной активности происходит реакция супероксид-аниона с оксидом азота и образуется пероксинитрит, который служит пусковым фактором в развитии воспаления и повреждения тканей, по токсичности значительно превосходит оксид азота и лишает его биологического действия как фактора релаксации [4]. Пероксинитрит стимулирует

апоптоз и некроз клеток эндотелия и повышает их чувствительность к другим повреждающим факторам. Свое действие пероксинитрит реализует за счет инициации перекисного окисления липидов в мембранах и липопротеинах [2, 4]. Синтез оксида азота в организме катализируется семейством нитроксид-синтаз. Последние используют L-аргинин в качестве субстрата и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафору (НАДФ-диафору) в качестве кофактора. НАДФ-диафору участвует в транспортировке электронов к простетической группе энзима [9].

Выработка цитокинов эндотелиальными клетками, лимфоцитами и клетками моноцитарно-макрофагального звена, участвующими в воспалительном процессе в артериальной стенке при ее повреждении, является ведущим патофизиологическим механизмом эндотелиальной дисфункции [6, 8, 11, 12]. При этом значительная роль в патогенезе атеросклероза отводится γ -интерферону (ИФН- γ). Этот цитокин служит локальным кофактором в направлении дифференцировки «наивных» Т-хелперов в Т-хелперы 1-го типа [6, 8], является сильным активатором макрофагов, их деструктивных функций в отношении артериальной стенки (выделение кислородных радикалов, оксида азота, гидролитических ферментов) по типу реакции гиперчувствительности замедленного типа с формированием гранулематозного воспалительного очага [6]. Кроме этого ИФН- γ активирует натуральные киллеры, индуцирует экспрессию на макрофагах и гладкомышечных клетках белков главного комплекса гистосовместимости I и II классов и липопротеиновых рецепторов на гладкомышечных клетках, а также способствует снижению экспрессии липопротеиновых рецепторов на макрофагах [6, 8]. Показано, что ИФН- γ индуцирует образование VCAM-1 эндотелием артериальной стенки. Известно, что при добавлении к нагруженному холестерином макрофагам ИФН- γ способен существенно влиять на соотношение холестерина и его эфиров в сторону накопления последних, тормозить захват и удаление холестерина из клеток с помощью липопротеинов высокой плотности, что приводит к трансформации макрофагов в пенные клетки [6, 8].

Противоречивая роль отводится и интерлейкину-4 (ИЛ)-4, который обладает как антиатерогенными, так и проатерогенными свойствами. Известно, что ИЛ-4 способствует Т-хелперному ответу 2-го типа (частично за счет аутокринной активации), приводит в действие иммуносупрессивные системы, направленные

на макрофаги, включая подавление продукции провоспалительных цитокинов и стимулируя выработку рецепторного антагониста ИЛ-1. ИЛ-4 способствует переключению иммунной системы с клеточного на гуморальный ответ [3, 6, 8, 13]. ИЛ-4 подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток и адгезивность макрофагов, влияет на индуцированную модифицированными липопротеинами низкой плотности аккумуляцию холестерина в макрофагах. При этом показано, что у мышей с дефицитом ИЛ-4 отмечается низкая чувствительность к атерогенной диете, у них обнаружена относительная устойчивость к прогрессированию жировой полоски под влиянием белка теплового шока микобактерий туберкулеза [6]. К проатерогенным эффектам ИЛ-4 относятся индукция им экспрессии Р-селектина и 15-липооксигеназы эндотелиальными клетками, экспрессии VCAM-1 и металлопротеиназы 1-го типа гладкомышечными клетками, а также усиление экспрессии рецепторов мембранных белков и этерификации холестерина в макрофагах [6, 8, 10]. Этот цитокин обнаруживается в атеросклеротически поврежденных артериях человека и мышей, нокаутированных по апопротеину E [3, 6].

Однако взаимосвязь цитокинов с нарушениями оксидантного статуса артериальной стенки остается до конца не выясненной и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования: оценить оксидантный статус, содержание НАДФ-диафоразы артерий и уровень цитокинов (ИЛ-4 и ИФН- γ) при длительной экспериментальной гиперлипидемии у крыс.

Материал и методы. Для индукции гиперлипидемии у 15 крыс линии Вистар, массой 200–250 г (1-я группа), использовали метод К.А. Мещерской и Н.П. Королевой в модификации с добавлением в корм холестерина, мерказолила и витамина D в течение 6 месяцев (180 суток) [5]. Эксперимент проводился со строгим соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В постановке опытов руководствовались требованиями Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Исследование одобрено междисциплинарным этическим комитетом (протокол № 4, дело № 21 от 24.01.2011 г.). Контролем в ходе эксперимента служили 15 здоровых крыс, находившихся на обычном рационе (2-я группа). Через 6 месяцев животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом путем декапитации. Проводили забор фрагментов аорты и бедренных артерий.

Определение общей оксидантной и антиоксидантной активности проводили спектрофотометрическим методом, разработанным в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН с использованием индикатора – пигмента морского ежа *Scaphechinus mirabilis* – гистохрома [4]. Оксидантную и антиоксидантную активность оценивали по

показателю коэффициента оптической плотности, вычисляемого по формулам:

$$OOA=(E_1-E_2):K,$$

где OOA – общая оксидантная активность, E_1 и E_2 – экстинкции проб при первом и втором измерении, $K=0,27$ (при этом поглощение контрольной пробы при первом измерении – 0,427);

$$AOA=(E_o-E_{\min}):(E_{\max}-E_{\min}),$$

где AOA – антиоксидантная активность, E_{\max} , E_{\min} , E_o (E_2-E_1) – экстинкции соответственно контрольной и опытной проб.

Для суждения о дисбалансе антиоксидантной и оксидантной систем определялся оксидантный индекс по формуле: OOA/AOA.

Определение концентрации цитокинов в надосадке биоптатов артерий проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов Rat ELISA Set BD OptEIA™ (BD Biosciences, США).

Метод определения НАДФ-диафоразы основан на образовании диформаза в присутствии эндогенного β -НАДФ и солей тетразолия. НАДФ-диафораза осуществляет перенос протонов от НАДФ к нитросинему тетразолию. Восстановленный нитросиний тетразолий превращается в нерастворимый продукт – диформазан, его расположение указывает на локализацию активности нитроксидсинтазы.

Фрагменты сосудов фиксировали в холодном 4 % растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2) в течение 4 часов. Затем промывали 0,1М фосфатным буфером (рН 7,2) в течение 6 часов и помещали в раствор 20 % сахарозы на ночь. Серийные срезы толщиной 50 мкм (для гистохимической реакции на НАДФ-диафорузу) изготавливали во фронтальной плоскости на замораживающем микротоме. Срезы в планшетах помещали в инкубационную среду и термостатировали 1 час при 37 °С. Состав инкубационной среды был следующим: 50 мМ Трис-буфер, 0,2 % Тритон X-100, 0,8 мг/мл НАДФ, 0,4 мг/мл НСТ; рН 8,0. После инкубации срезы трехкратно промывали в дистиллированной воде, помещали на предметные стекла, обезвоживали в спиртах и заключали в балзам. Интенсивность окрашивания эндотелия соответствовала активности энзима и позволяла выделить три группы НАДФ-диафоразопозитивных клеток с высокой, умеренной и низкой активностью фермента. Активность фермента определяли при помощи программы ImageJ 1.37 и выражали в единицах оптической плотности.

Для математической обработки полученных данных использовали программу SPSS 16. Сравнение средних значений в выборках осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты исследования. В аорте 1-й группы крыс показатели общей оксидантной и антиоксидантной активности были ниже, чем у контрольных животных.

Таблица 1

Показатели общей оксидантной и антиоксидантной активности артерий крыс

| Группа | Общая оксидантная активность | | | | Антиоксидантная активность | | | | Оксидантный индекс | | | |
|--------|------------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| | аорта | | бедренная артерия | | аорта | | бедренная артерия | | аорта | | бедренная артерия | |
| | Me ¹ | 0,25–0,75 ² | Me ¹ | 0,25–0,75 ² | Me ¹ | 0,25–0,75 ² | Me ¹ | 0,25–0,75 ² | Me ¹ | 0,25–0,75 ² | Me ¹ | 0,25–0,75 ² |
| 1-я | 0,28 ^{3,4} | 0,21–0,32 | 0,53 | 0,48–0,55 | 0,33 ^{3,4} | 0,31–0,35 | 0,47 | 0,42–0,53 | 0,84 ^{3,4} | 0,82–0,87 | 1,13 | 1,10–1,18 |
| 2-я | 0,69 | 0,62–0,73 | 0,61 | 0,58–0,64 | 0,51 | 0,46–0,54 | 0,46 | 0,44–0,55 | 1,35 | 1,31–1,40 | 1,32 | 1,18–1,41 |

¹ Здесь и в табл. 2: медиана.² Здесь и в табл. 2: интерквартильный размах.³ Разница со 2-й группой статистически значима.⁴ Разница с бедренной артерией статистически значима.

Таблица 2

Уровень цитокинов в артериях крыс при экспериментальной гиперлипидемии

| Группа | ИЛ-4, пг/мл | | | | ИФН-γ, пг/мл | | | |
|--------|---------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------|-----------|-------------------|-----------|
| | аорта | | бедренная артерия | | аорта | | бедренная артерия | |
| | Me | 0,25–0,75 | Me | 0,25–0,75 | Me | 0,25–0,75 | Me | 0,25–0,75 |
| 1-я | 17,4 ^{1,2} | 16,4–21,9 | 44,5 ¹ | 30,1–44,5 | 3,9 ¹ | 3,6–4,7 | 3,6 | 3,1–4,2 |
| 2-я | 10,2 ² | 7,9–11,1 | 63,9 | 59,4–64,1 | 3,0 | 2,2–3,3 | 3,4 | 2,8–4,0 |

¹ Разница со 2-й группой статистически значима.² Разница с бедренной артерией статистически значима.

Таблица 3

Корреляционные связи (r) между содержанием цитокинов и показателями оксидативной активности в аорте крыс

| Группа | ИЛ-4 ОАА ¹ | ИЛ-4 ОИ ² | ИЛ-4 АОА ³ | ИФН-γ ОАА ¹ | ИФН-γ ОИ ² | ИФН-γ АОА ³ |
|--------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1-я | 0,62 | 0,64 | 0,57 | -0,46 | -0,48 | -0,38 |
| 2-я | -0,56 | -0,56 | -0,54 | 0,32 | 0,36 | 0,72 |

¹ Общая оксидантная активность.² Оксидантный индекс.³ Антиоксидантная активность.

Во фрагментах бедренных артерий эти показатели не имели достоверных различий с контролем. В сосудах животных опытной группы оксидантный индекс был ниже, чем в контроле, при этом в аорте крыс с гиперлипидемией он был ниже, чем в бедренных артериях (табл. 1).

Анализ цитокинов в сосудах крыс показал достоверные различия в содержании ИЛ-4 в зависимости от их морфологии (аорта – сосуд эластического типа, бедренная артерия – сосуд мышечного типа): уровень этого цитокина в аорте крыс обеих групп был значительно ниже, чем в бедренных артериях. В аорте животных с моделью гиперлипидемии значения ИЛ-4 были выше, чем в аорте контрольных животных (табл.2), что отражало активацию гуморальных механизмов локального иммунного реагирования и соответствовало данными литературы. Известно, что на ранних стадиях атеросклероза у апоЕ-нокаутированных мышей в результате активации Т-хелперного ответа 1-го типа образуются иммуноглобулин-G-антитела к окисленным липопротеидам низкой плотности, тогда как на поздних стадиях атеросклероза происходит экспрессия иммуноглобулинов класса G, характерных для Т-хелперного ответа 2-го типа с участием ИЛ-4 [3].

Во фрагментах бедренных артерий опытных крыс, напротив, регистрировалось снижение уровня ИЛ-4. Противоположная картина наблюдалась в отношении ИФН-γ: отмечалось увеличение его уровня в аорте крыс 1-й группы, тогда как в бедренных артериях контрольных животных содержание цитокина не изменилось, что, вероятно, характеризовало преимущественное повреждение аорты в модели гиперлипидемии на протяжении 6 месяцев исследования (табл. 2). Однако при

этом было отмечено значительное увеличение медианы индекса ИЛ-4/ИФН-γ в аорте 1-й группы крыс по сравнению с контрольной группой: 4,46 (4,39–4,65) против 3,5 (3,5–3,36) соответственно – и снижение этого индекса в бедренных артериях: 10,0 (9,70–10,5) против 18,7 (16,0–21,2) соответственно. Это характеризовало повреждение бедренных артерий как опосредованное активацией клеточных иммунных механизмов.

Обсуждение полученных данных. Патогенетическая роль ИФН-γ в атерогенезе подтверждается данными литературы. У апоЕ-нокаутированных мышей с перекрестным нокаутом рецептора ИФН-γ наблюдается снижение размера повреждения артерий, липидных включений и клеточной активности. После того как апоЕ-нокаутированным мышам вводили рекомбинантный ген ИФН-γ на протяжении 30 дней, у них увеличивался размер атеросклеротического повреждения восходящей аорты [6]. Известно, что добавление к макрофагам рекомбинантного ИФН-γ существенно ингибирует деградацию ацетилированных липопротеинов низкой плотности, уменьшает количество связывающих сайтов на клеточной мембране, снижает скорость интернализации и транспортировки липопротеинов в лизосомы без изменения их деградации в самих лизосомах [6].

Нами выявлены прямые корреляционные связи между ИЛ-4 и показателями оксидации в аорте опытных крыс, тогда как в группе здоровых животных корреляционные связи между данными показателями были обратные. В отношении ИФН-γ определены противоположные результаты (табл. 3).

Зарегистрировано снижение содержания НАДФ-диафоразы в аорте и бедренных артериях у крыс с гиперлипидемией: медиана уровня этого фермента в аорте – 27

(24–31) против 60 (58–61) в контроле, в бедренных артериях – 11 (11–13) против 29 (25–32) в контроле. При этом в бедренных артериях содержание НАДФ-диафоразы было достоверно ниже, чем в аорте, как в 1-й так и во 2-й группах животных, что, вероятно, можно объяснить анатомическими особенностями данных сосудов.

В 1-й группе установлена прямая корреляционная связь ($r=0,74$) между антиоксидантной активностью и уровнем НАДФ-диафоразы в аорте. Выявлена обратная корреляционная связь ($r=-0,64$) между уровнями ИФН- γ и НАДФ-диафоразы в бедренных артериях крыс с гиперлипидемией.

Таким образом, при длительной экспериментальной гиперлипидемии у крыс наблюдается низкий уровень оксидантной и антиоксидантной активности в аорте. Наличие прямой корреляционной связи между показателями антиоксидантной активности и уровнем НАДФ-диафоразы в аорте подтверждает, что длительная гиперлипидемия вызывает угнетение функции эндотелия и, возможно, способствует апоптотической гибели эндотелиоцитов, приводя к снижению активности их антиоксидантных ферментов и ферментов семейства нитроксидсинтаз.

Установлены изменения локальной продукции цитокинов в зависимости от структурных особенностей артерий, что отражает функциональную специфику реагирования эндотелия определенных сосудов на патогенные влияния. В бедренных артериях к 6-му месяцу эксперимента определено снижение концентрации ИЛ-4, при неизменном уровне ИФН- γ , тогда как только в аорте крыс зарегистрировано увеличение концентрации ИЛ-4, и ИФН- γ , что, вероятно, свидетельствует о преимущественном цитокиноопосредованном повреждении именно данного сосуда в результате длительной гиперхолестеринемии. Увеличение соотношения ИЛ-4/ИФН- γ в аорте крыс 1-й группы свидетельствует о локальной активации гуморальных механизмов иммунного реагирования и их угнетающем влиянии на клеточный иммунный ответ, опосредованный ИФН- γ , или о повышении рецепторного связывания ИФН- γ и/или его инактивации.

В условиях длительной гиперлипидемии наблюдается противоположное влияние цитокинов на показатели оксидации в аорте крыс – стимулирующее влияние ИЛ-4 как на про-, так и на антиоксидантную активность, и отрицательное влияние ИФН- γ на данные показатели. Отмечено ингибирующее влияние ИФН- γ на активность НАДФ-диафоразы в эндотелии бедренных артерий опытной группы крыс. Выявленная специфика требует дальнейшего изучения содержания цитокинов и системы оксидантной и антиоксидантной активности сосудов с учетом морфологических и функциональных параметров артериальной стенки.

References

1. Vorobeva E.N., Shumaker G.I., Osipova I.V. et al. The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis, *Kardiologičeskaja terapija i profilaktika*. 2006, No. 5 (6). P. 129–136.
2. Zotova I.V., Zatejwiko D.A., Sidorenko B.A. Synthesis of nitric oxide and the development of atherosclerosis, *Kardiologičeskaja*. 2002, No. 4. P. 57–67.

3. Kozlov V.A., Dushkin M.I., Verewagin E.I. Vaccine against atherosclerosis: Facts and Perspectives, *Citokiny i vospalenie*. 2008. No. 1. P. 8–13.
4. Lupach N.M., Hludeeva E.A., Lukjanov P.A. et al. Matrix metalloproteinases, oxidative status and endothelial dysfunction with hiperholestrinemy in patients with various forms of ischemic heart disease, *Rossijskij medicinskij zhurnal*. 2010, No. 4. P. 71–74.
5. Mewerskaja K.A., Borodina G.P., Koroleva N.P. About the method of agents selection, affecting on the cholesterol metabolism, *Jeleuterokokk i drugie adaptogeny iz dalnevostochnyh rastenij* / ed. K.A. Mewerskoj. Vladivostok, 1966. P. 289–294.
6. Cytokine system: theoretical and clinical aspects / ed. V.A. Kozlova, S.V. Sennikova. Novosibirsk: Nauka, 2004. 324 p.
7. Titov V.N. The generality of atherosclerosis and inflammation: the specificity of atherosclerosis as an inflammatory process (hypothesis), *Kliničeskaja laboratornaja diagnostika*. 2006. No. 4. P. 310.
8. Haitov R.M. Immunology. Normal and pathological conditions: a textbook. M.: Medicina, 2010. 752 p.
9. Shumatova T.A., Prihodchenko N.G., Grigorjan L.A. et al. Nitroindergic mechanisms in the pathogenesis of persistent diarrhea in infants in the first year, *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 3. P. 59–61.
10. Shljahto E.V., Gavrishcheva N.A., Ovchinnikova O.A. et al. The effect of inflammation induction on the metabolism of collagen in atherosclerotic plaques in mouse, *Medicinskaja immunologija*. 2008. No. 6. P. 507–512.
11. Allison B.R., Amy D.G. Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects, *Journal of investigative medicine*. 2006. Vol. 54, No. 3. P.123–131.
12. Huber S.A., Sakkinen P., David C. T-helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia, *Circulation*. 2001. No. 103. P. 2610–2616.
13. Georg J., Shoenfeld Y. Requisite role for interleukin-4 in the acceleration of fatty streaks induced by heat shock protein 65 of Mycobacterium tuberculosis, *Circ. Res. J*. 2000. No. 86. P. 1203–1210.
14. Park I.K., Son H., Kim S.W., Paick J.-S. Initial validation of a novel rat model of vasculogenic erectile dysfunction with generalized atherosclerosis International, *Journal of Impotence Research*. 2005. Vol.17. P. 424–430.

Поступила в редакцию 15.04.2011.

PROGRESSION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION DURING EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMIA

E.P. Turmova¹, P.A. Lukyanov², A.A. Grigoryuk¹, E.A. Byihkov¹, A.V. Tsyulskiy³

¹Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anni-versary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation), ³Far Eastern Federal University (8 Suhanova St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Summary – The authors evaluated the content of some cytokines, NADPH-diaphorase and the indices of oxidative and anti-oxidative activity in walls of aorta and femoral arteries of wistar rats during experimental hyperlipidemia. The levels of NADPH-diaphorase in endothelium decreased. Both during the experiment and intact control, the level of interleukin-4 in aorta was significantly lower than that in femoral artery. With the hyperlipidemia in femoral arteries, the authors have registered a decrease of interleukin-4, but an increase of interleukin-4 and γ -interferon and decrease of oxidative and anti-oxidative activity with low oxidative index in the aorta wall. The authors prove a stimulating effect of interleukin-4 and inhibitory action of γ -interferon upon general oxidative and anti-oxidative activity in the wall of aorta.

Key words: hyperlipidemia, cytokines, endothelial dysfunction, experiment.

УДК 616.832-004.2:616.89-008.6

СТРУКТУРА НЕЙРОПСИХОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

М.А. Короткова, С.Е. Гуляева, А.А. Овчинникова, А.В. Овчинников

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: рассеянный склероз, тип течения, нейропсихология.

Изучена структура нейропсихологического дефекта у 86 больных с разными типами течения цереброспинальной формы рассеянного склероза. Независимо от типа течения ядро психопатологических расстройств составляет триада синдромов: когнитивный дефицит, эмоционально-волевые расстройства и вегетативные дисфункции. В основе когнитивного дефицита лежит нарушение двигательного контроля, эмоционально-волевые нарушения отличаются формированием тревожно-депрессивных состояний, а вегетативные дисфункции – крайним разнообразием и лабильностью проявлений. Степень выраженности психопатологического дефекта зависит от стадии заболевания и расположения очагов демиелинизации. В развитии психологического дефекта ведущую роль играет разрушение связей в системах, обеспечивающих контроль за регуляцией психической деятельности, – надсегментарных вегетативных аппаратах.

Рассеянный склероз (РС) остается одной из основных социально-значимых патологий нервной системы [2–5]. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные РС, вопросы его происхождения и критериев темпов прогрессирования остаются нерешенными [6–9, 11]. В настоящее время сформировано представление о РС как об аутоиммунном процессе, который развивается в организме с генетически детерминированным дефектом иммунного ответа [3, 4]. Значение экзогенного фактора риска развития заболевания определяется сочетанием силы и времени внешнего воздействия с наследственной предрасположенностью. Имеются доказательства, что особое место в инициации данной патологии занимает хронический психоэмоциональный стресс, который при наличии определенных личностных особенностей и характерном типе реагирования (вероятно, наследственно обусловленном) резко повышает риск развития этого заболевания [1, 10].

Внедрение в клинику магнитно-резонансной томографии открыло новую эру в диагностике РС. Однако успехи этого метода не только позволили усовершенствовать стандарты обследования больных, но и показали, что в головном мозге максимально поражается перивентрикулярная зона – область надсегментарных вегетативных центров, т.е. те структуры организма, которые, являясь источником функциональной регуляции психической деятельности и поведения, формируют адекватный ответ на экзогенное воздействие. Это диктует необходимость изучения психопатологического статуса больных РС и выяснения механизмов развития нейропсихологического дефекта в случаях с разным типом течения патологии для проведения дифференцированных реабилитационных мероприятий и расширения возможностей медико-социальной помощи.

Короткова Мария Александровна – ассистент кафедры неврологии и нейрохирургии ВГМУ; e-mail: darwell@mail.ru

Целью настоящего исследования явилось уточнение клинических особенностей и топической основы нейропсихологических синдромов, а также возможности их коррекции у больных РС.

Материал и методы. Проведено комплексное обследование 86 пациентов с РС, верифицированным с помощью диагностических критериев McDonald (2001, 2005). Средний возраст больных на момент начала обследования составил 37 лет (от 18 до 58 лет), средний возраст начала заболевания – 26,3±6,4 года, длительность болезни – 11,3±6,2 года (от 2 до 18 лет).

Выраженность неврологического дефекта оценивалась по функциональным шкалам J.F. Kurtzke (1983) [11] с определением суммы баллов неврологического дефицита (Functional System scales – FS) и степени инвалидизации (Expanded Disability Status Scale – EDSS).

Суммарный неврологический дефицит подсчитывали как сумму баллов, характеризующих повреждение по восьми функциональным системам – FS шкалам [11]. Скорость прогрессирования РС определялась как отношение баллов по шкале EDSS к длительности заболевания. Критериями исключения являлись низкий исходный уровень образования (ниже среднего) и интеллекта и утрата способности к самостоятельному передвижению и обслуживанию (более 7 баллов по EDSS).

Были выделены две группы больных:

- 1-я (основная) – 75 человек с ремитирующим типом течения (средний возраст – 32,0±1,7 г, средний возраст дебюта РС – 21 г);
- 2-я (группа сравнения) – 11 человек с вторично-прогрессирующим течением (средний возраст – 53,0±0,6 г, средний возраст дебюта РС – 45 лет).

Больные 1-й группы были подразделены на три подгруппы в зависимости от наличия и вида иммуномодуляторов в составе медикаментозной терапии: подгруппа А – 17 пациентов, получавших бетаферон; подгруппа В – 25 пациентов, получавших копаксон; подгруппа С – 33 пациента, не получавших иммуномодулирующих препаратов.

Пациентам 2-й группы иммуномодулирующая терапия не назначалась.

Обследования проводились ежегодно в динамике 4-летнего наблюдения и лечения. При оценке нейропсихологических синдромов анализировались:

- скрининговый тест MMSE (мини-тест оценки психического состояния);
- мнестические функции (кривая запоминания и объем произвольной памяти);
- оптико-пространственные расстройства и дефекты праксиса;

Таблица
Нейропсихологические синдромы у больных РС

| Синдром | Частота развития, % | | | | Всего |
|-----------------------------------|---------------------|------|------|------------|-------|
| | 1-я группа | | | 2-я группа | |
| | А | Б | С | | |
| Астено-невротический | 52,9 | 40,0 | 9,1 | – | 25,6 |
| Эмоционально-волевые расстройства | 29,4 | 40,0 | 45,4 | 54,5 | 53,4 |
| Ипохондрический | 11,7 | 12,0 | 21,2 | 18,1 | 16,3 |
| Когнитивные расстройства | 5,8 | 8,0 | 24,2 | 18,1 | 15,1 |
| Деменция | – | – | – | 9,1 | 9,1 |

- степень нарушения объема активного внимания (таблицы Шульте);
- устойчивость внимания и счетных навыков (тест вычитания из 100 по 7);
- коммуникативные и интеллектуальные проблемы (индекс функциональной независимости FIM и тест Pulses);
- эмоционально-волевые расстройства (шкала Гамильтона HDRS или HAM-D и шкала самооценки на тревогу Спилберга).

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica, версия 6.0 (StatSoft Inc., 2001). Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента и с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок.

Результаты исследования. В 1-й группе суммарный неврологический дефицит составил $6,5 \pm 0,4$, оценка по шкале EDSS – $3,2 \pm 1,4$, скорость прогрессирования – $0,4 \pm 0,1$, степень инвалидизации (по шкале Kurtzke) – $2,3 \pm 1,2$ балла. Клинические проявления РС были представлены весьма широким спектром неврологических расстройств (пирамидные, сенсорные, мозжечковые, глазодвигательные, бульбарные, псевдобульбарные расстройства, нарушения статики и ходьбы) с индивидуальным набором симптомов. Однако все больные этой группы сохраняли двигательную активность и способность к самообслуживанию.

У больных 2-й группы неврологический дефицит составил $15,0 \pm 0,4$, средняя оценка по шкале EDSS – $9,1 \pm 1,0$, скорость прогрессирования – $0,9 \pm 0,1$, степень инвалидизации (по шкале Kurtzke) – $4,3 \pm 0,7$ балла.

46 пациентов 1-й группы в течение времени наблюдения находились в ремиссии, у 29 человек были зарегистрированы единичные обострения. У 9 больных 2-й группы за период наблюдения неоднократно возникали обострения, 6 из них обслуживать себя не могли из-за дефектов в двигательной сфере.

Независимо от типа патологии и характера терапии лидировали два нейропсихологических синдрома: астенический и синдром эмоционально-волевых дисфункций с аффективными расстройствами. Когнитивные нарушения носили специфический характер,

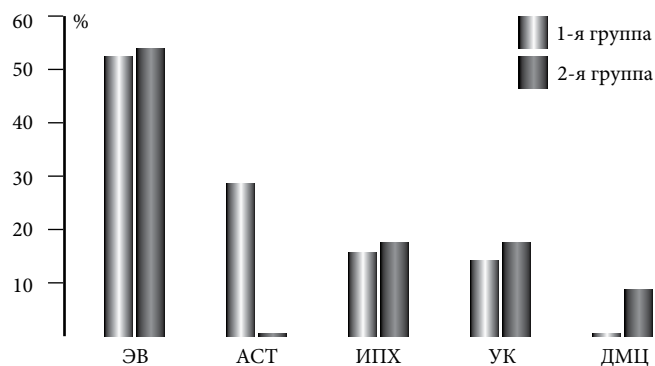


Рис. Характеристика частоты развития нейропсихологических синдромов у больных РС:

ЭВ – эмоционально-волевые, АСТ – астения, ИПХ – ипохондрия, УК – умеренные когнитивные нарушения, ДМЦ – деменция.

но ограничивались степенью умеренных расстройств у 58% пациентов. Только в 1,6% случаев их уровень достигал деменции (во 2-й группе). Несмотря на лидирующее положение одного из указанных синдромов, они всегда сочетались (табл.).

Сопоставление частоты и характера сочетаний нейропсихологических синдромов с типом течения РС не только выявило преобладание психопатологического дефекта при вторично-прогрессирующем течении заболевания, но и степени их выраженности (рис.).

Обсуждение полученных данных. Анализ анамнестических данных показал, что задолго до появления очаговой неврологической симптоматики (за 2–5 лет) возникал комплекс расстройств в системах, формирующих и контролируемых когнитивные функции. Наиболее демонстративными были колебания темпа психической деятельности: изменялась скорость обработки информации, возникали неустойчивость объема активного внимания и колебания в возможности его переключения. Формировалась неравномерность выраженности мыслительных процессов или своеобразная их инертность.

Диспраксия, дислексия, дискалькулия наряду с преходящими изменениями артикуляции опережали иные проявления когнитивных дисфункций. Они длительно вызывали у больного недоумение по поводу факта возникновения и колебаний выраженности, зависимости от физических и эмоциональных перегрузок, погодных факторов и интеллектуальной деятельности. Такие дефекты выступали в обрамлении невротических расстройств, всегда сопровождалась вегетативными дисфункциями и нарушением в системе «сон–бодрствование».

Постепенно появлялась заниженная самооценка, нарастала импульсивность, терялась дистанция с окружающими, нарушался контроль за ответными действиями и речью даже в случаях несущественных замечаний, нарастала ранимость, обидчивость, появлялись конфликты в быту и на производстве. Постепенно перечисленные расстройства трансформировались в тревогу, формирование «ценных идей и мыслей», возникали индивидуальные пристрастия к пищевым продуктам, поиск лиц, понимающих происходящие явления. На

первый план выступали эмоционально-личностные расстройства в виде смены периодов эйфории депрессивными состояниями. Им сопутствовали нарушение контроля движений (походка приобретала «пружинящий» характер, движения утрачивали плавность, регуляция тазовых функций приобретала самые разнообразные патологические формы), критика к дефекту снижалась, появлялись неопрятность и неряшливость в быту, периоды апатии и злобности. При этом грубое органическое снижение качества личности возникало редко.

Детальный анализ индивидуального набора нейropsychологических синдромов в динамике болезненного процесса показал, что они зависели от формы патологии и максимальной локализации очагов демиелинизации, стадии болезни и ее тяжести. Так, если в остром периоде заболевания когнитивный дефицит был выявлен в 63,3 % случаев (у 53 больных), то на этапе ремиссии его регресс возник у 50 % этих пациентов. Кроме этого, в 39,5 % наблюдений в 1-й группе он ограничивался легкой степенью. Во 2-й группе на этапе обострения преобладали когнитивные расстройства средней степени (в 55,5 %) и выраженные дефекты психики (в 36,6 %).

Дифференцированный анализ синдромов позволял вычленивать симптомы, отражающие поражение глубоких структур полушарий. Для левого (доминантного) полушария характерными становились затруднения в выполнении тестов, требующих схематического восприятия (пробы с рисованием часов и их переворачиванием), элементы семантической и амнестической афазии. При этом не нарушался наглядный анализ пространственных ситуаций, сохранялось узнавание окружающих лиц и обстановки. Для преимущественного поражения правого (субдоминантного) полушария характерным оказывалось игнорирование своего дефекта, нарушение схемы тела, затруднение в распознавании графических изображений и конструктивная апраксия.

Иммуномодулирующая терапия позволяла сохранять трудоспособность и профпригодность. Отсутствие ее лишало пациента этой возможности. Так, в 1-й группе за 4-летний период 20 пациентов (26,6 %) продолжали трудиться на том же производстве (из них 8 – в той же должности), 32 человека (42,6 %), не потеряв профессиональных навыков, были вынуждены перейти на работу, требовавшую более низкой квалификации, и только 3 больных (4 %) прекратили трудовую деятельность. Во 2-й группе лишь 1 пациент продолжал трудиться, потеряв профессиональные навыки.

Проведенные исследования показали, что ядро психопатологических проявлений при рассеянном склерозе составляет триада нейropsychологических синдромов: когнитивный дефицит, эмоционально-личностные дефекты и вегетативные дисфункции. В основе когнитивного дефицита лежат нарушения двигательного контроля и эмоционально-личностные дефекты. Вегетативные дисфункции отличаются крайним разнообразием и лабильностью. Степень выраженности

психопатологического дефекта зависит от стадии заболевания, его формы и области максимального расположения очагов демиелинизации. В развитии психопатологического дефекта ведущую роль играет разрушение связей в системах, обеспечивающих контроль за регуляцией психической деятельности – надсегментарных вегетативных центрах. Своевременное назначение иммуномодулирующей терапии при рассеянном склерозе раскрывает широкие перспективы в сохранении физической активности и психического здоровья при РС.

References

1. Alekseeva T.G., Bojko A.N., Gusev E.I. The spectrum of neuropsychological symptoms in multiple sclerosis, *Zhurn. psichiatrii*. 2000. No. 100. P. 15.
2. Gusev E.I., Bojko A.N. Multiple sclerosis: from study of immunopathogenesis to new treatments. M.: Gubernskaja medicina, 2001. 543 p.
3. Gusev E.I., Bojko A.N., Smirnova N.F. Risk factors for multiple sclerosis in the Moscow population. I. Exogenous risk factor, *Zhurn. nevrologii i psichiatrii*. 1999. No. 5. P. 32–40.
4. Gusev E.I., Bojko A.N., Demina T.L. Risk factors for multiple sclerosis in the Moscow population. II. The combination of exogenous and genetic factors, *Zhurn. nevrologii i psichiatrii*. 1999. No. 6. P. 47–52.
5. Gusev E.I., Demina T.L., Bojko A.N. Multiple sclerosis. M.: Neft i gaz, 1997. 463 p.
6. Krotenko N.V. Indicators of oxidative stress in different types of MS disease: abstracts. Irkutsk, 2011. 22 p.
7. Markina O.L. Clinical features of multiple sclerosis in relation to structural and functional changes in lymphocyte membranes: abstract. Novosibirsk, 2005. 24 p.
8. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles problems and perspectives [Invited review], *Brain*. 1997. Vol. 120. P. 865–916.
9. Lucchinetti C., Brueck W., Rodriguez M. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis, *Brain Pathol.* 1996. Vol. 6. P. 259–274.
10. Mohr D.S., Goodkin D.E., Bacchetti P. Psychological stress and the subsequent appearance of new brain MRL lesions in MS // *Neurology*. 2000. Vol. 55. P. 55–61.
11. Multiple sclerosis / eds D. Paty, G.S. Ebers. Philadelphia: FA Dav. Comp., 1998. 572 p.

Поступила в редакцию 26.05.2011.

STRUCTURE OF NEUROPSYCHOLOGICAL DEFECT OF DISSEMINATED SCLEROSIS PATIENTS

M.A. Korotkova, S.E. Gulyaeva, A.A. Ovchinnikova, A.V. Ovchinnikov
Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The authors have studied the structure of neuropsychological defect of 86 patients with various types of the course of cerebrospinal disseminated sclerosis. Regardless of the course type, the core of psychopathologic disorders is composed of triad of symptoms, among which are cognitive deficiency, emotional-volitional disorders, and vegetative dysfunctions. The cognitive deficiency comes from disorder of motor control. The emotional-volitional disorders are characterized by forming of anxiodepressive states, while the vegetative dysfunctions cover the utter variety and lability of manifestations. The degree of manifestations of psychopathologic defect depends on the disease state and location of demyelination focuses. The destruction of ties in the systems supporting control over regulation of mental activity, which are suprasegmental vegetative apparatus, plays a key role in the development of psychological deficiency.

Key words: disseminated sclerosis, type of course, neuropsychology.

УДК 616.831-005.1-073.756.8

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ У КРЫС С ИНДУЦИРОВАННЫМ ОСТРЫМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ МЕТОДОМ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ

И.Г. Агафонова¹, Н.Г. Колосова², В.А. Рассказов¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),

²Институт цитологии и генетики СО РАН (690030 г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 10)

Ключевые слова: мозг, ишемия, магнитно-резонансная томография.

Целью данной работы явилась постановка метода для исследования изменений мозгового кровенаполнения у крыс на фоне ишемии, индуцированной левосторонней перевязкой сонной артерии. В эксперимент были взяты две линии крыс, для одной из которых (OXYS) характерно преждевременное старение, связанное с генетически обусловленным дефектом метаболизма. У животных линии OXYS реакция на острое нарушение мозгового кровообращения проявилась в более тяжелой форме. Показано, что магнитно-резонансная ангиография может успешно использоваться для поиска и изучения эффектов новых противоишемических препаратов.

Одной из ведущих причин летальности и главной причиной инвалидизации населения является церебральный инсульт – одно из наиболее частых сосудистых заболеваний головного мозга. Сосудистые заболевания мозга занимают второе место в мире в структуре смертности от болезней системы кровообращения (39 %) и в общей смертности населения (23,4 %) [2]. Ежегодная смертность от инсультов в России – одна из наиболее высоких в мире. Показатели заболеваемости и смертности от инсульта среди лиц трудоспособного возраста в нашей стране увеличились за последние 10 лет более чем на 30%.

По данным некоторых авторов, не менее 50% пациентов, перенесших инсульт, остаются нетрудоспособными вследствие сенсорного, моторного или когнитивного дефицита [9]. Высокий уровень постинсультной инвалидизации имеет место практически при любых формах расстройств церебрального кровотока. Особенно драматическая ситуация возникает при стойком постинсультном очаговом неврологическом дефиците у больных молодого возраста. Высокий процент летальности и инвалидизации при цереброваскулярных заболеваниях обусловил понимание того, что инсульт, как и хроническую ишемию головного мозга, легче предупредить, чем лечить. Поэтому в настоящее время большое внимание уделяется вопросам профилактики этой группы нозологий.

Установлено, что тромбообразование – причина не только острых состояний, но и прогрессирования хронической ишемии. Об этом свидетельствует факт обнаружения фибрина и скопления тромбоцитов в атеросклеротических бляшках, а также микроэмболизация микроциркуляторного русла фрагментами разрушающейся «тромбоцитарной пробки», что может

привести к развитию сердечной недостаточности и сосудистой деменции [4–6]. В связи с этим применение препаратов, ингибирующих функцию тромбоцитов и каскад коагуляции, теоретически обосновано для профилактики и лечения всех проявлений атеротромбоза. В то же время эффективность непрерывной антиагрегантной терапии на сегодняшний день доказана лишь при вторичной профилактике ишемического инсульта и асимптомных каротидных стенозах и должна осуществляться с учетом факторов риска и особенностей гемостаза у конкретного пациента, а также анализа данных об эффективности, безопасности и переносимости выбранного антиагрегантного препарата [5–8]. С целью дальнейшего поиска новых лекарств, обладающих противоишемическим действием, мы попытались использовать метод магнитно-резонансной ангиографии высокого разрешения для определения изменений мозгового кровенаполнения сосудов мозга крыс на фоне индуцированного нарушения мозгового кровообращения.

Материал и методы. В исследование были включены 36 крыс-самцов линии Wistar и 36 крыс-самцов линии OXYS, в возрасте 6 месяцев и массой 200 г. Для второй группы крыс характерно преждевременное старение, связанное с генетически обусловленным дефектом метаболизма, выражающимся в повышенной чувствительности к окислительному стрессу [1, 3]. Животные, размещенные по 2 особи в клетке, находились в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Индукцию острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) у экспериментальных животных вызывали окклюзией левой сонной артерии: путем оперативного вмешательства на сосуд накладывалась постоянная лигатура.

Магнитно-резонансная томография была выполнена на томографе для экспериментальных исследований PharmaScan US 70/16 (Bruker, Germany) с напряженностью магнитного поля 7 Тл, частотой 300 МГц и катушкой типа BGA 09P. Перед сканированием животных усыпляли и обездвигивали внутривенной инъекцией раствора рометара в концентрации 5,5 мг/кг и раствора реланиума в концентрации 37 мг/кг. Первое сканирование проводили до операции, второе – сразу после операции и затем каждые последующие сутки, чтобы следить за проявлением признаков нарушения кровоснабжения и отека в головного мозга.

С помощью данной методики определяли изменения анатомо-топографического строения церебрального русла кровеносной системы. Послойные срезы во фронтальной, сагиттальной и аксиальной плоскостях с получением T_2 -томограмм и томограмм, взвешенных по протонной плотности, проводили с применением импульсной последовательности RARE_8 и MSME соответственно. Изображения были получены в последовательности со следующими параметрами: матрица 256×256 , толщина среза 1 мм, площадь обзора 4×4 см, T_2 -взвешенные изображения: TR/TE – 2579,8/44,5 мс и средневзвешенные изображения: TR/TE – 1500,8/20,0 мс.

Окципитальная трехмерная реконструкция сосудистого бассейна выполнялась с помощью программы 3D-TOF из лицензионного программного обеспечения ParaVision 3.0.1 (Bruker, Germany). Далее выполняли MIP-реконструкцию сосудов животных.

Для количественного определения степени изменения сосудов церебрального бассейна в течение эксперимента измеряли диаметр артерии с использованием двух точек, устанавливаемых магнитно-резонансным курсором: первая – на границе адвентиция/медия латеральной стенки артерии, вторая – на границе медиа/адвентиция медиальной стенки. Величину вазомоторной реакции оценивали в процентном соотношении изменения диаметра артерии и интеграла интенсивности сигнала в течение эксперимента. Также по интегралу интенсивности сигнала в течение эксперимента оценивали кровообращение в мелких сосудах.

Для определения устойчивости к эмоциональному стрессу все животные за 14 дней до операции были протестированы и на основании полученных результатов разделены на три группы: 1 – устойчивые, 2 – предрасположенные к стрессу, 3 – с промежуточной реакцией. Разделение осуществляли по поведению животных в тесте открытого поля [7].

Оценку неврологических нарушений проводили по шкале Menzes. Она включает следующие градации: отсутствие симптомов – 0 баллов; тоническая флексия передней противоположной лапы при подъеме за хвост – 1 балл; меньшее сопротивление пассивному движению, оказываемое противоположной передней лапой при потягивании за хвост – 2 балла; движение в противоположную очагу поражения сторону при удержании за хвост – 3 балла; спонтанное вращение крысы на горизонтальной поверхности в противоположную сторону – 4 балла. Оценку неврологических симптомов по шкале Menzes проводили за сутки до операции и после операции через 6, 12, 24, 48 и 72 часа и затем на 7, 14, 21 и 28-е сутки. Оценку нарушения поведенческой реакции экспериментальных животных проводили с помощью определения времени задержки выхода животного в центр исследуемого пространства при помещении в светлую камеру. Поведенческую оценку начинали выполнять через 24 часа после моделирования кровоизлияния.

Оценка неврологических нарушений и поведения в светлой камере проводилась сравнением с помощью t -теста для парных случаев и анализа переменной (ANOVA). Динамику объема гематомы и перифокального отека рассчитывали с использованием ROI – программного обеспечения томографа ParaVision 3.0.1. Количественный анализ полученных результатов был выполнен с использованием непараметрических критериев Kruskal–Wallis.

Результаты исследования. По мере нарастания симптомов нарушения мозгового кровообращения отмечено усиление когнитивных расстройств. Задержка латентного периода выхода животного в центр исследуемого пространства через 24 часа после операции у крыс линии Wistar составила 4–5 мин, у крыс линии OXYS – 8–12 мин. Через 48 часов после операции время латентного периода начинало уменьшаться: до 2–3 мин у крыс линии Wistar и до 5–8 мин у крыс линии OXYS. К 7-м и 14-м суткам оно существенно сократилось, приблизившись к нормальным значениям. В промежутках животные не тестировались, что исключало фактор тренировки. Через 21 сутки латентный период у всех крыс восстанавливался до нормы.

Через 6 часов после операции животные выглядели адинамичными, более чем у половины из них развивались неврологические нарушения средней тяжести по шкале Menzes, в частности, при удержании за хвост животное двигалось в противоположную очагу сторону (3 балла). В 30 % наблюдений отмечалось меньшее сопротивление пассивному движению (2 балла). Через 12 часов выраженность неврологических нарушений значительно уменьшалась, однако у всех крыс сохранялись неврологические симптомы, преимущественно с тяжестью 2–3 балла. Через 48 часов динамики неврологических нарушений не отмечалось. Через 72 часа неврологические нарушения становились меньше в сравнении с осмотром через 48 часов и в 60 % случаев были представлены нарушениями в пределах 1–2 баллов. Через неделю после операции неврологические симптомы значительно регрессировали. В дальнейшем их выраженность продолжала уменьшаться и симптомы полностью исчезали к 21-м суткам у крыс линии Wistar и 28-м суткам у крыс линии OXYS.

При сканировании животных после операции выявлен целый ряд морфологических признаков острого нарушения мозгового кровообращения, вызванного окклюзией сонной артерии. Это выражалось в визуализации на T_2 -ВИ-изображениях изменений размеров внутренних структур мозга – происходило расширение рогов желудочков, увеличивались ликворные пространства, смещались диэнцефальные структуры.

Магнитно-резонансная ангиография подтвердила наличие обескровленного участка левой сонной артерии (рис., а). Анализ результатов ангиографии средних и передних мозговых артерий показал, что у крыс линии Wistar в окклюзированной зоне в течение недели

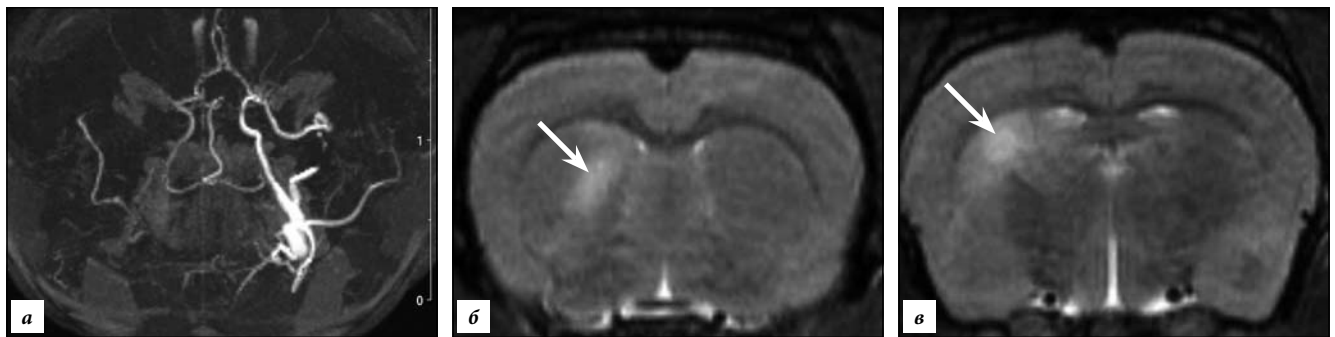


Рис. Магнитно-резонансная томография головного мозга крыс:

а – нарушение мозгового кровообращения в левом полушарии, вызванное механической окклюзией левой сонной артерии; б, в – гиперинтенсивные очаги в области гиппокампа (стрелки).

Таблица

Динамика морфометрических изменений головного мозга крыс на фоне индуцированного ОНМК

| Группа | Диаметр церебральных артерий, мм | | Общий объем ликвора, мм ³ | | Зона ишемии, мм ³ | |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------------|-----------|
| | Wistar | OXYS | Wistar | OXYS | Wistar | OXYS |
| Интактные 3-месячные крысы | 0,85±0,10 | 0,72±0,10 ² | 4,10±0,30 | 3,60±0,20 ² | – | – |
| Интактные годовалые крысы | 0,87±0,20 | 0,63±0,10 ^{1, 2} | 3,70±0,20 | 3,10±0,30 | – | – |
| Крысы с ОНМК | 0,92±0,10 ¹ | 0,68±0,30 ² | 4,30±0,10 | 4,70±0,10 | 1,50±0,20 | 7,80±1,20 |

¹ Значимые возрастные отличия.

² Значимые межлинейные отличия

происходило наполнение сосудов за счет включившихся коллатералей. Следует отметить, что процесс восстановления кровенаполнения в окклюзированной зоне у крыс линии OXYS протекал медленнее и восстанавливался через две недели. Изменение интенсивности сигнала от ткани у крыс линии Wistar в режиме T₂-SE (Spin Echo) левого полушария через неделю достоверно не отличалось от интенсивности сигнала ткани правого полушария (табл.). У крыс линии OXYS гиперинтенсивный очаг в области гиппокампа имел объем 7,8±1,2 мм³ (рис., б, в, табл.).

Обсуждение полученных данных. Можно предположить, что у крыс линии Wistar после операции коллатеральный кровоток компенсировал ОНМК. Более того, у крыс этой линии наблюдалась более быстрая по сравнению с животными линии OXYS редукция когнитивных расстройств, что также может быть связано с включением коллатерального кровотока.

У годовалых крыс линии OXYS изменения неврологического статуса и когнитивные расстройства были намного глубже. Морфометрический анализ показал, что появившийся гиперинтенсивный очаг в области гиппокампа подтверждает наличие ишемического повреждения ткани мозга животных. Известно, что необратимые изменения у человека при инфаркте мозга, так называемая «ядерная зона ишемии», формируются уже в первые 6–8 мин после прекращения кровотока. Изменения происходят в той части мозга, где скорость кровотока ниже 15–10 мл/100 г/мин.

Вокруг ядра находится большая по объему область «ишемической полутени», или пенумбры, с

кровотоком до 50–20 мл/100 г/мин, которая может сохранять жизнеспособность в среднем от 3 до 6 часов. Восстановление перфузии в зоне пенумбры в течение этого временного периода – «терапевтического окна» – дает возможность сохранить функцию определенной части мозговой ткани и, соответственно, уменьшить степень развития неврологического дефицита [4].

Таким образом, результаты эксперимента подтверждают, что использованная нами модель индуцированного острого нарушения мозгового кровообращения у старых крыс путем наложения постоянной лигатуры на сонную артерию с последующим наблюдением за состоянием головного мозга и изменением кровенаполнения сосудов мозга с помощью магнитно-резонансной томографии высокого разрешения может успешно использоваться для изучения новых потенциальных лекарств, обладающих противоишемическим действием по отношению к клеткам головного мозга [5, 6].

References

1. Agafonova I.G., Kolosova N.G., Miwenko N.P. et al. The Histo-chrome impact on the state cerebral vessels and search exploratory activity of premature aging rats OXYS, *Bjulleten jeksperimentalnoj biologii i mediciny*. 2007. V.143, No. 4. P. 446–450.
2. Gusev E.I., Skvorcova V.I., Stahovskaja L.V. Insult in the Russian Federation: the time of active actions, *Zhurnal nevrologii i psihiatrii*. 2007. No. 8. P. 5–10.
3. Kolosova N.G., Weglova T.V., Amstislavskaja T.G., Loskutova L.V. Comparative analysis for the content of lipid peroxidation products in the brain structures of Wistar rats and OXYS different ages, *Bjulleten jeksperimentalnoj biologii i mediciny*. 2003. Vol. 132, No. 8. P. 54–61.

4. The pathology of the carotid arteries and the problem of ischemic insult (clinical, ultrasound, and hemodynamic aspects) / ed. D.N. Dzhibladze. M.: NII nevrologii RAMS, 2002. 207 p.
5. Skvorcova V.I., Stahovskaja L.V., Prjanikova N.A. Cerebrovascular disease. How to choose the antiplatelet agents for secondary prevention of ischemic insult, *Consilium Medicum*. 2007. Vol. 9, No. 2. P. 4–10.
6. Suslina Z.A., Tanashjan M.M. Antiplatelet therapy in ischemic cerebrovascular disease: a manual for medics. M.: NII nevrologii RAMS, 2003. 40 p.
7. Hasanova D.R. Thrombolytic therapy ischemic insult, *Consilium Medicum*. 2010. No. 1. P. 4–9.
8. Hasanova D.R., Zhitkova Ju.V. The usage of the «Agrenoks» drug in patients with chronic ischemia of the brain on the wall-occluding process, *Consilium Medicum*. 2009. No. 2. P. 14–18.
9. Hennerici M.G. Insult: a clinical guide. M.: MEDpressInform, 2008. 224 p.

Поступила в редакцию 05.04.2011.

COMPARATIVE ANALYSIS OF CHANGING CEREBRAL CIRCULATION IN RATS WITH INDUCED ACUTE CEREBROVASCULAR ACCIDENT USING MAGNETIC RESONANCE IMAGING

I.G. Agafonova¹, N.G. Kolosova², V.A. Rasskazov¹

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of

Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation), ²Institute

of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of

Sciences (10 Lavrentyeva Av. Novosibirsk 630090 Russian Federation)

Summary – This paper aims to identify method for studying changing cerebral blood filling in rats against the ischemia induced by left-side carotid artery ligation. The experiment comprised 2 lines of rats, one of which (OXYS) was characterized by premature aging caused by genetically conditioned metabolic defect. The magnetic resonance angiography allowed to obtain images of brain arteries. The OXYS line animals responded to the acute cerebral accident in a more severe form. As reported, the magnetic resonance angiography can be successfully applied to search and study effects of new anti-ischemic drugs.

Key words: brain, ischemia, magnetic resonance imaging.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 104–107.

УДК 616.98:578.833.27(5-012)

КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ: АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ

А.А. Овчинникова¹, С.Е. Гуляева¹, С.А. Гуляев², Т.А. Захарычева³, Д.В. Новиков⁴

¹Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ²Институт неврологии РАМН (123367 г. Москва, Волоколамское шоссе, 80), ³Дальневосточный государственный медицинский университет (680000 г. Хабаровск ул. Муравьева-Амурского, 35), ⁴Приморская краевая клиническая больница № 1 (690091 г. Владивосток, Алеутская ул., 57)

Ключевые слова: клещевой энцефалит, заболеваемость, летальность.

Представлены сведения о динамике заболеваемости и летальности при клещевом энцефалите в Приморском крае и Дальнем Востоке за весь 75-летний период его изучения, изложены особенности проявлений данной нейроинфекции в каждом десятилетии и определены причины трансформации взаимоотношений в частоте регистрации различных форм.

Природно-очаговые клещевые трансмиссивные инфекции, такие как клещевой энцефалит (КЭ), клещевой боррелиоз, клещевой риккетсиоз и их сочетанные формы, представляют серьезную проблему для здравоохранения на большинстве территорий Российской Федерации. На протяжении последней четверти XX века и в первом десятилетии XXI века заболеваемость этими инфекциями достигла беспрецедентно высоких уровней. Возросший интерес к ним обусловлен не только ростом заболеваемости, но и внедрением в клинику новых диагностических технологий, эффективностью современных средств иммунопрофилактики и необходимостью преодоления недостаточной информированности врачей обо всех аспектах данной патологии [4, 5].

Целью настоящего исследования явилось изучение заболеваемости и летальности при КЭ в Приморском и Хабаровском краях на рубеже XX и XXI веков для совершенствования организационных мероприятий по профилактике и лечению КЭ в этом регионе РФ.

Овчинникова Анна Александровна – д-р мед. наук, профессор, кафедры неврологии и нейрохирургии ВГМУ; тел.: +7 (423) 245-37-93

Материал и методы. В основу работы положены данные государственной статистики, Центров клещевого энцефалита Приморского и Хабаровского краев и анализ обследования 3000 больных КЭ, госпитализированных в лечебные учреждения этих регионов за последние десятилетия.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. К началу 60-х годов XX века заболеваемость КЭ стала снижаться во всех эндемических регионах страны, одновременно возникли изменения в цикличности ее подъемов. Среди причин этого следует выделить две основных:

1. Под действием предложенных М.П. Чумаковым авиаопылений природных очагов КЭ препаратами ДДТ и широкого применения современных вакцин произошло изменение иммунных свойств не только самих вирусов, но и их прокормителей, и людей;

2. Изменение системы регистрации КЭ в условиях экологической перестройки препятствовало согласованности специалистов в постановке диагноза «клещевой энцефалит».

Последнее было обусловлено инициативой М.П. Чумакова, предложившего внедрить во все эндемические регионы новую двухэтапную систему диагностики КЭ: на 1-м этапе число заболевших определялось непосредственно лечебным учреждением, на 2-м – каждый случай КЭ подтверждался комиссией с участием эпидемиолога,

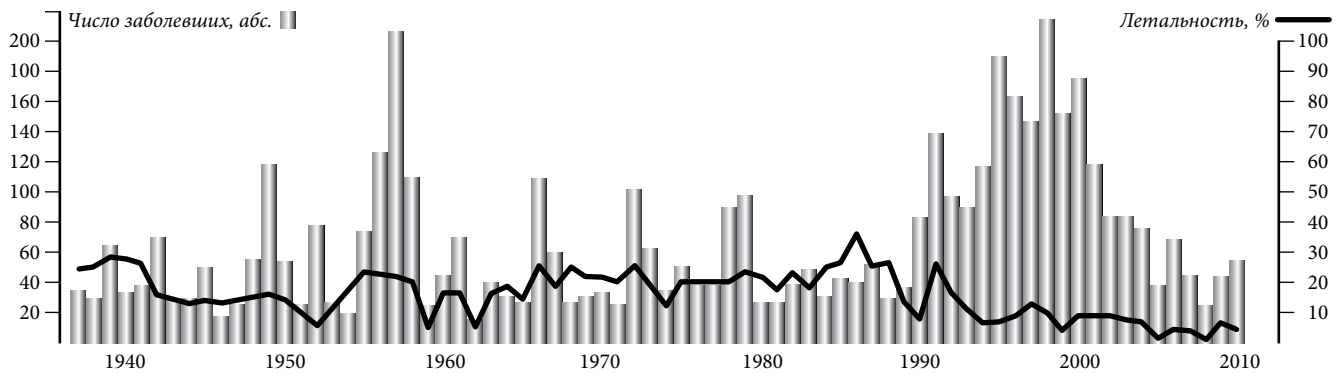


Рис. 1. 75-летняя (1937–2010) динамика заболеваемости и летальности при КЭ в Приморском крае.

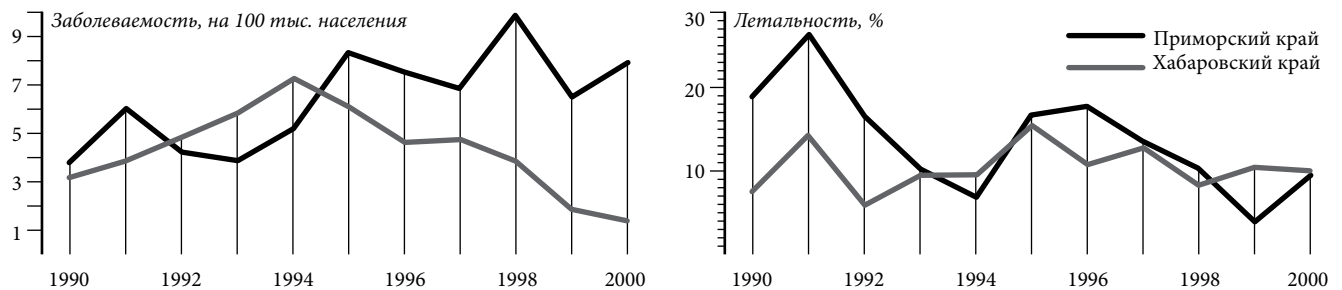


Рис. 2. Соотношения между заболеваемостью и летальностью при КЭ в Приморском и Хабаровском краях в 1990–2000 гг.

вирусолога, невролога, инфекциониста и паразитолога (различное понимание этими специалистами патологии и ее трансформации на этапе клинической диагностики затрудняло принятие окончательных решений). Такой подход обнаружил диссоциацию между показателями клиники и данными серологического подтверждения в остром периоде заболевания. Обнаружился большой процент так называемых серонегативных форм, стали учитываться только тяжелые очаговые формы патологии, имеющие серологическое подтверждение. Последние нередко заканчивались смертью, увеличивая показатели летальности. В результате доля очаговых форм КЭ достигла 60 %, а уровень летальности приблизился к подобным величинам довоенных лет (рис. 1).

До 70-х годов XX века сохранялась прежняя цикличность в динамике подъемов заболеваемости (они возникали на каждый 5–6-й год), а ее общее снижение объяснялось внедрением в клинику новых методов профилактики и научными достижениями.

К началу 80-х годов XX века частота регистрации КЭ повсеместно упала до критического уровня. В Приморье выявлялись единичные случаи заболевания (не более 18–23 в год). На Северном Урале этот показатель составлял 4,8 на 100 тыс. населения, а средний показатель по России ограничивался 0,9 на 100 тыс. населения. В это же время в Приморском крае частота регистрации очаговых форм КЭ продолжала увеличиваться (до 80 %), а летальность достигла максимального уровня за всю историю наблюдений – 39,1 % (рис. 1). В этот период изменился и состав заболевших, на смену сельским жителям и работникам лесопромышленных предприятий пришли жители городов.

К исходу 80-х годов в России наступил новый этап, при котором к 1990 г. уровень заболеваемости КЭ

увеличился в 3,5 раза (3,7 на 100 тыс. населения). А за последующее десятилетие (1990–1999) он вырос до 6,6 на 100 тыс. населения. Наряду с ростом заболеваемости намечилось утяжеление клинических проявлений КЭ. В 90-е годы XX века появились и новые разработки в серологической диагностике. В их основу был положен метод иммуноферментного анализа. За 1990–1999 гг. на территории Приморья было зарегистрировано 1555 случаев КЭ (36,1 % от всех случаев, зарегистрированных в крае за всю историю наблюдения), из которых 13,8 % закончились летальным исходом. Заболеваемость составила 9,9 на 100 тыс. населения, что сократило разрыв с аналогичными данными по Западной Сибири в 2 раза и превысило средние показатели по России в 1,3 раза. Одновременно до 4,9 % снизилась летальность. Впервые в истории наблюдений на Дальнем Востоке была зарегистрирована диссоциация между высоким уровнем заболеваемости и низкой летальностью. Такое изменение эпидемиологических данных потребовало более углубленных исследований. С 1990 г., несмотря на увеличение заболеваемости в 1,5–2 раза, значительных изменений в показателях цикличности инфекции (по сравнению с предыдущим десятилетием) не возникало до 1995 г.

К 1998 г. заболеваемость достигла самого высокого уровня за всю историю наблюдений. При этом если структура очаговых форм не претерпела сколько-нибудь значительных изменений, то уровень регистрации лихорадочных (неочаговых) форм необычайно вырос.

Сравнение с показателями заболеваемости КЭ и смертности от него в соседнем Хабаровском крае не выявляло существенных различий в уровнях летальности, но отражало преобладание заболеваемости в Приморье (рис. 2).

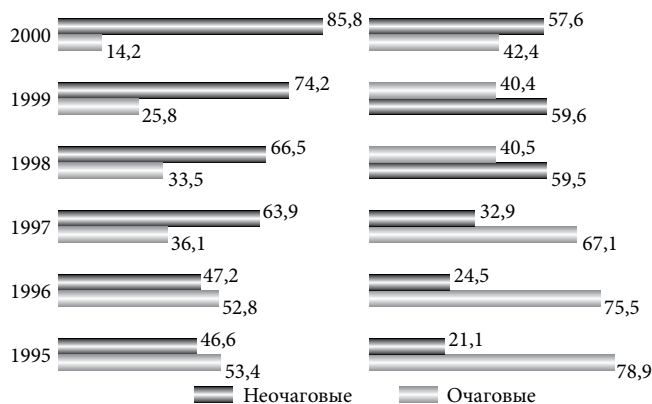


Рис. 3. Соотношения между неочаговыми и очаговыми формами КЭ до (слева) и после (справа) исключения из общего числа наблюдений инаппарантных форм заболевания в Приморском крае в 1995–2000 гг., %

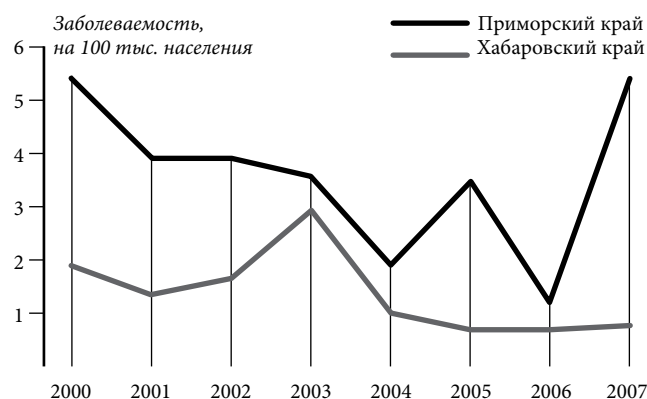


Рис. 4. Соотношение динамики заболеваемости КЭ в Приморском и Хабаровском краях в начале XXI века.

Анализ эпидемиологических особенностей КЭ в Приморском крае за 1995–2000 гг. показал, что всего с указанием на факт присасывания клеща было зарегистрировано 4058 обращений, но только в 1026 случаях (25,3 %) были установлены признаки инфицирования КЭ, несмотря на положительные иммуноферментные реакции. Причем в 45 % случаев у таких пациентов не удавалось выявить и каких-либо клинических проявлений поражения нервной системы, поэтому данные наблюдения были отнесены к инаппарантным формам заболевания (71 %). Анализ очаговых форм КЭ в этот же период не выявил сколько-нибудь существенных различий между частотой регистрации различных очаговых синдромов, выявляемых в предыдущие годы. Было замечено, что если исключить из общего количества зарегистрированных в этот период случаев с так называемой инаппарантной (неочаговой) формой патологии, то соотношение между клиническими формами станет отражать традиционное для данного региона классическое преобладание очаговых форм (рис. 3). Это заставило усомниться в целесообразности использования для диагностики патологии в остром ее периоде такого чувствительного, но недостаточно информативного метода, как иммуноферментный анализ, сохранив принцип серологического подтверждения с помощью реакции прямой геммагглютинации [1, 2].

Первая декада нового века отличилась общим снижением заболеваемости КЭ на Дальнем Востоке. Это совпало с уменьшением численности населения за счет оттока в Европейскую часть страны, закрытием крупных лесопромышленных предприятий и перемещением сельских жителей в города. В Хабаровском крае намечилось постепенное снижение заболеваемости КЭ, с небольшим подъемом к 2003 г. (рис. 4).

В Приморском крае при общем нисходящем тренде за тот же период было зарегистрировано 582 случая КЭ с двумя подъемами заболеваемости в 2001 и 2006 гг. Цикличность подъемов заболеваемости и летальности сохранялась. Они возникали каждые 3–5 лет с максимальным однократным достижением в первое десятилетие (2001 г.). Показатели летальности продолжали коррелировать с уровнем заболеваемости и соответствовали аналогичным данным 40–50-х годов XX века [3].

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о том, что на протяжении всего 75-летнего периода наблюдений КЭ на Дальнем Востоке остается одной из наиболее значимых природно-очаговых инфекций региона и требует углубленного изучения всех аспектов патологии, диктуя необходимость постоянного совершенствования различных диагностических, лечебных и профилактических мероприятий.

References

- Guljaeva S.E., Ovchinnikova A.A., Afanaseva N.B., Guljaev S.A. Tick-borne encephalitis: principles of diagnosis and treatment. Vladivostok: Ussuri, 2004. 154 p.
- Guljaeva S.E. To the history of the Kozhevnikov epilepsy studying, *Zhurn. nevrologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova*. 1984. Vol. 84, No. 6. P. 919–929.
- Gurarij R.M. The clinical characteristics of tick-borne encephalitis in Primorye, *Trudy nauchnoj konferencii Vladivostokskogo instituta jepidemiologii, mikrobiologii i gigeny*. Vladivostok, 1958. P. 12.
- Zaharycheva T.A., Voronkova G.M., Mzhelskaja T.V. et al. Diagnosis, treatment and prevention of tick-borne encephalitis, Lyme disease, and their mixed infections. Khabarovsk, 2003. 64 p.
- Pokrovskij V.I., Oniwenko G.G., Cherkasskij B.L. The evolution of infectious diseases in Russia, twentieth century. M.: Medicina, 2003. 664 p.

Поступила в редакцию 03.06.2011.

TICK-BORNE ENCEPHALITIS IN THE FAR EAST: EPIDEMIOLOGY ASPECTS

A.A. Ovchinnikova¹, S.E. Gulyaeva¹, S.A. Gulyaev², T.A. Zaharyicheva³, D.V. Novikov⁴

¹Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Institute of Neurology RAMS (80 Volokolamskoye Sh. Moscow 123367 Russian Federation), ³Far Eastern State Medical University (35 Muravieva-Amurskogo St. Khabarovsk 680000 Russia), ⁴Primorsky Regional Clinical Hospital No. 1 (57 Aleutskaya St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Summary – The paper provides the information on dynamics of morbidity and lethality rates after tick-borne encephalitis in Primorskiy kray and the Far East over the whole 75-year period of its study, describes peculiarities of manifestations of this neuroinfection in each ten-year period and ascertains causes of transformation of interrelations in the frequency of registration of various forms. **Key words:** tick-borne encephalitis, morbidity, lethality.

УДК 616.12-009.72-085:615.1:33

ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ НИТРАТОВ В АНТИАНГИНАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИИ

Е.В. Соляник, Е.В. Елисева, Б.И. Гельцер

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: стенокардия, органические нитраты, «затраты–эффективность», «затраты–полезность».

При определении затратной эффективности органических нитратов разных форм высвобождения определены преимущества для изосорбид-5-моонитрата обычной и пролонгированной форм – коэффициент «затраты–эффективность» составил 17,5 и 13,9 соответственно. Для обеспечения относительного благополучия пациента при использовании нитратов обычной формы высвобождения требуется 71 721,5 руб, а при использовании пролонгированных нитратов – 55 458,1 руб. Значения коэффициента «затраты–полезность» на амбулаторном этапе существенно ниже, чем при лечении стабильной стенокардии в стационаре, и составляют 26 131,8 руб. при использовании пролонгированных нитратов и 39 654,7 руб. при использовании нитратов обычной формы высвобождения (разница между коэффициентами составляет 48,3% в пользу нитратов пролонгированных форм). Для того чтобы в полной мере оценить экономические преимущества той или иной программы терапии, даже если они не различаются по своему влиянию на прогноз у данной категории пациентов, необходимо комплексное фармакоэкономическое исследование. Применение нитратов обычной формы высвобождения в терапии стабильной стенокардии не оправдывает себя не только в плане экономического преимущества, но и с позиций полезности такого лечения для пациента.

В структуре сердечно-сосудистой патологии преобладает ишемическая болезнь сердца, и особенно ее хронические формы, в частности стабильная стенокардия, требующие длительного и затратного лечения, которое далеко не всегда является эффективным. В связи с этим не вызывает сомнения необходимость разработки концепции фармакоэкономического анализа стационарного и амбулаторного лечения больных стабильной стенокардией с учетом эффективности, доступности и рациональности лекарственной терапии.

Основой базисной терапии, направленной на предупреждение и купирование приступов стенокардии по-прежнему остаются нитроглицерин, или органические нитраты. Их выраженный антиангинальный и антиишемический эффект не позволяет отказаться от использования этой группы препаратов в длительной терапии стабильной стенокардии [7, 11]. Нет доказательств того, что терапия нитратами оказывает какое-либо влияние на прогноз жизни. Однако в недавно завершившемся исследовании METRO при использовании предсказательной модели GREACE выявлено снижение риска смерти в течение 6 месяцев после инфаркта миокарда на 48% у больных стабильной стенокардией, принимавших нитроглицерин [6, 8]. Влияние данных препаратов на самочувствие больных является настолько очевидным, что вряд ли можно

отказаться от их назначения [1, 5, 9]. Достаточное многообразие лекарственных форм органических нитратов, представленных на фармацевтическом рынке, делает актуальным проведение комплексного фармакоэкономического анализа именно этой группы лекарственных средств. Ключевым моментом метода является выбор утилитарных показателей, которые в количественной форме отражают обусловленное состоянием здоровья качество жизни (КЖ). Утилитарные показатели располагаются в порядке уменьшения КЖ от полного здоровья (1) до смерти (0) [4]. В настоящее время стоимость 1 года качественной сохраненной жизни (Quality Adjusted Life Years – QALY) часто используется для экономической оценки эффективности лечения [12]. Оценка рентабельности затрат, или коэффициент «затраты–выгода» (Cost-Benefit Analysis), используется для денежного выражения дополнительных расходов. Увеличение количества лет жизни можно рассматривать как стоимость продуктивной ценности этих лет в виде зарплаты или произведенных материальных благ или в виде налогов, полученных государством от пациента. Этот коэффициент является самым сложным для анализа ввиду крайней неоднородности групп наблюдения [10]. Тем не менее в США и большинстве развитых стран он достаточно давно применяется для определения выгоды от производимых вмешательств, и без получения данных этого анализа программы лечения каждого конкретного заболевания в большинстве случаев не рассматриваются. Считается, что стоимость лечения менее \$20 000/QALY является экономически эффективной, от \$20 000/QALY до \$40 000/QALY – приемлемой (именно такую стоимость имеют большинство методов лечения), от \$40 000/QALY до \$60 000/QALY – пограничной, а стоимость более \$60 000/QALY – чрезмерной. Стоимость лечения более \$100 000/QALY считается неприемлемой [3, 4].

Подобных исследований в нашей стране крайне мало. Финансовые преимущества не учитываются в составлении стандартов терапии, в частности стабильной стенокардии, что увеличивает расходы государства, страховых компаний и самих пациентов. Комплексный фармакоэкономический анализ позволяет выявить наиболее эффективные в плане экономических преимуществ программы лечения и использовать его результаты для оптимизации медикаментозного вмешательства. Среди антиангинальных препаратов, относящихся к органическим нитратам, в лечении стенокардии используются изосорбид динитраты

(ИСДН) и изосорбида-5-мононитраты (ИСМН) разных форм высвобождения, при этом как те, так и другие включены в региональные и общероссийские стандарты терапии стабильной стенокардии [2]. Настоящее исследование было проведено для определения программы антиангинальной терапии с использованием органических нитратов, обладающей высокой эффективностью и полезностью при наименьших затратах на лечение.

Анализ «затраты–эффективность»

Для определения экономической целесообразности разных программ лечения, обладающих сопоставимой клинической эффективностью, наиболее перспективным является расчет показателя «затраты–эффективность» (Cost-Effectiveness Analysis). Проведено простое открытое проспективное исследование в параллельных группах с рандомизацией по виду антиангинальной терапии. Было выделено две группы лиц с верифицированной стабильной стенокардией II–IV функционального класса; в 1-й группе (130 человек) пациенты в качестве антиангинального средства получали органические нитраты пролонгированной формы, во 2-й группе (129 человек) использовались органические нитраты обычной формы высвобождения. Группы были сопоставимы по клинико-демографическим параметрам. В качестве критерия эффективности определены суррогатные точки – разница между средним количеством приступов стенокардии до начала лечения и через 30 дней после приема препарата при условии поддержания больным более или менее одинакового уровня физической активности. Этот показатель определяли на этапе наиболее активной антиангинальной терапии в стационаре. Расчет проводился по формуле:

$$K_{\text{eff}} = P \times 30 / (N_2 - N_1),$$

где K_{eff} – коэффициент «затраты–эффективность», P – затраты на суточную дозу препарата ($P \times 30$ – стоимость курсового лечения), N_1 и N_2 – количество приступов стенокардии в неделю до и после лечения.

Анализ полученных данных показал, что наименьший коэффициент «затраты–эффективность» у ИСДН обычной формы, но при этом он обладал и минимальной клинической эффективностью. Разница между количеством приступов стенокардии до и после лечения оказалась недостоверной. Следовательно, для достижения клинически значимого результата необходимы либо большие дозы препарата, либо увеличение срока лечения. Следует учитывать и длительность антиангинального эффекта этих нитратов: она составляет в среднем 4 часа и требует, как минимум, четырехкратного приема в течение суток, что отрицательно сказывается на соблюдении назначенного режима и снижает комплаентность. ИСДН пролонгированной формы и ИСМН обычной формы высвобождения отличаются наиболее высокими

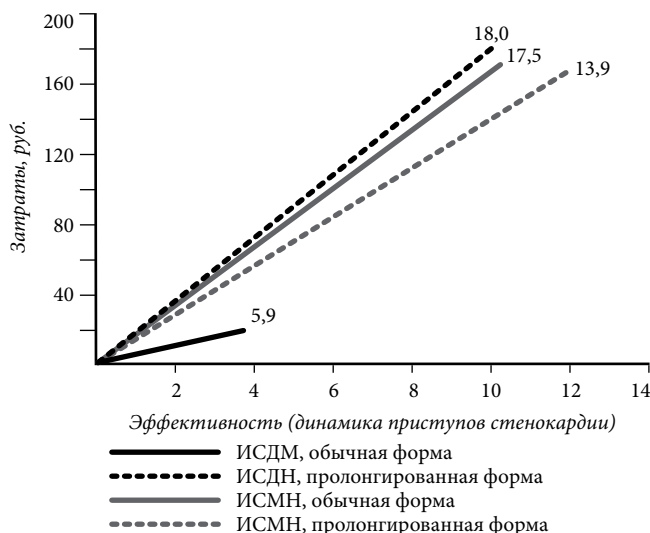


Рис. 1. Коэффициент «затраты–эффективность» при лечении различными формами ИСДН и ИСМН.

затратными коэффициентами при условии получения заданной антиангинальной эффективности, однако здесь более высокую позицию занимает ИСМН обычной формы, его коэффициент «затраты–эффективность» составил 17,5, что на 0,5 меньше, чем при применении ИСДН пролонгированной формы (рис. 1).

В последнее время большой популярностью пользуются пролонгированные ИСМН, которые обладают рядом преимуществ: быстрым и полным всасыванием после приема, отсутствием «эффекта первого прохождения» (first-pass effect), наличием только одного активного вещества, четкой корреляцией между дозой, концентрацией в крови и фармакологическим эффектом. Эти нитраты оказались самыми высокоэкономичными в лечении стабильной стенокардии. Коэффициент «затраты–эффективность» для них составил 13,9 при соответствующей клинической эффективности. Количество приступов стенокардии за исследуемый период в этой группе уменьшилось на 12,3%, что является наибольшим в целом по выборке. Экономичность применения исследованных нами ИСМН пролонгированной формы имеет одинаковые положительные тенденции как при анализе минимизации затрат, так и при анализе «затраты–эффективность». Это связано с высокой клинической эффективностью, хорошей переносимостью, а также сравнительно небольшой стоимостью этих препаратов.

Качество жизни

Изучение структуры расходов при том или ином варианте медикаментозного вмешательства на разных этапах лечения позволяет оценить более или менее затратный тип терапии, не учитывая при этом его эффективность и полезность для пациента и общества. Для устранения этого противоречия необходимо рассматривать не только количественную составляющую, определяемую как совокупность прямых и косвенных

Таблица
Качество жизни на разных этапах нитратной антиангинальной терапии

| Группа | Показатель КЖ, баллы (ср. арифметическая) | | | |
|-------------|---|---------------|----------------------------|----------------------------|
| | в начале терапии | после выписки | через 1 мес. после выписки | через 3 мес. после выписки |
| 1-я (n=130) | 3,5 | 6,9 | 6,5 | 7,4 |
| 2-я (n=129) | 3,3 | 6,8 | 6,0 | 6,1 |

затрат при том или ином виде терапии, но и качественный показатель, выраженный в QALY. В случае, когда значимой разницы между выживаемостью в результате двух различных видов медикаментозного вмешательства нет, основой адекватной оценки QALY будет компонент, оценивающий КЖ. Значения QALY лежат в диапазоне от 0 до 1, поэтому полезность любого состояния, отличного от состояния здоровья, всегда будет меньше единицы.

Определяя показатель КЖ по визуально-аналоговой шкале, пациент имеет возможность оценить свое состояние от наихудшего до наилучшего, какое он может себе представить, выраженное в числовом значении. Полезность в этом случае определяется как соотношение 1,0 и показателя КЖ [4]. Помимо обследования, предусмотренного стандартами диагностики стабильной стенокардии, проводилось анкетирование с использованием психометрической визуально-аналоговой шкалы для оценки КЖ, связанного со здоровьем с целью определения полезности терапии в начале курса, по окончании стационарного этапа и при амбулаторно-поликлиническом лечении через 1 и 3 мес. (табл.).

Используя полученные данные о стоимости разных видов терапии и значения показателя КЖ, определили коэффициент «затраты–полезность» (Cost-Utility Analysis) для каждого вида медикаментозного вмешательства на разных этапах лечения. Поскольку продолжительность такого лечения даже гипотетически сложно установить, использовали показатели КЖ, определенные непосредственно после выписки из стационара и через 3 месяца лечения: в первом случае – для определения соотношения затрат и полезности на стационарном этапе, во втором – на амбулаторном этапе, для 1 года QALY (рис. 2).

Коэффициент «затраты – полезность» (CUA) рассчитывался по формуле:

$$CUA=P/U,$$

где P – стоимость лечения, включающая прямые и косвенные затраты; U – полезность определенного вмешательства, выраженная стандартизированным показателем, помноженным на определенное количество QALY.

Коэффициент рассчитывали на этапе стационарного и амбулаторно-поликлинического наблюдения

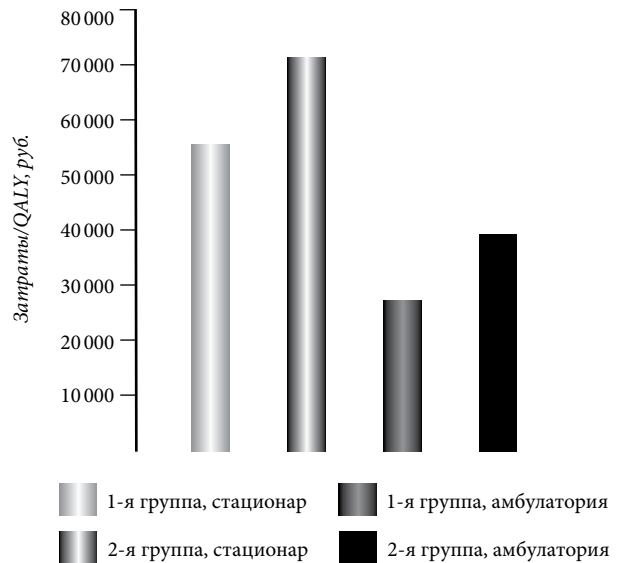


Рис. 2. Коэффициент «затраты–полезность» при использовании разных групп органических нитратов на стационарном и амбулаторном этапах лечения.

и лечения в двух исследуемых группах, получавших разные виды нитратов. Использовали также анализ приращения затрат на единицу полезности (CUA_{incr}) в зависимости от вида антиангинальной терапии. Расчет проводили по формуле:

$$CUA_{incr}=(PC_1+IC_1)/U_{t1}-U_{t2},$$

где PC_1 и IC_1 – прямые и косвенные затраты в разные временные промежутки, U_{t1} и U_{t2} – полезность на первом и втором этапах исследования. Затраты и результаты были сопоставимы по времени, поэтому необходимости в дисконтировании не было.

Между затратами и утилитарностью при лечении в стационаре установлена умеренная, а на амбулаторно-поликлиническом этапе – сильная взаимосвязь: коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0,40 и 0,75 соответственно. Таким образом, нельзя однозначно сказать, что чем больше расходов несет лечебно-профилактическое учреждение, тем полезнее для пациента проводимая терапия. В то же время при амбулаторном лечении стабильной стенокардии расходы более оправданы, поскольку между ними и полезностью для пациента существует тесная взаимосвязь.

Определенные преимущества зарегистрированы при использовании в программах терапии органических нитратов пролонгированной формы. Для обеспечения относительного благополучия пациента при использовании обычных форм нитратов требовалось 71 721,5 руб., а при использовании нитратов пролонгированной формы – 55 458,1 руб. Коэффициент «затраты–полезность» к концу стационарного лечения во 2-й группе, где пациенты получали органические нитраты обычной формы высвобождения, был на 21,3% выше, чем в 1-й группе. Такие же различия регистрировались и на этапе амбулаторного лечения.

В этом случае разница значений коэффициента между группами составляла 48,3% в пользу программы терапии, включающей пролонгированные нитраты. Значения коэффициента «затраты–полезность» на амбулаторном этапе были существенно ниже таковых при стационарном режиме и составляли 26 131,8 руб. при использовании пролонгированных нитратов и 39 654,7 руб. – при лечении нитратами обычной формы высвобождения (рис. 2). Различия регистрировались в обеих группах. При этом в 1-й группе показатель затрат, соотнесенных с утилитарностью, снизился более чем в два раза, а во 2-й группе разница значений составила 80,1%.

Это в большей степени обусловлено тем, что на амбулаторно-поликлиническом этапе существенная часть затрат на лечение приходится на долю самих пациентов, тогда как в условиях стационара практически все расходы несет лечебно-профилактическое учреждение. Если учитывать факт, что органические нитраты обычной формы высвобождения стоят меньше, то такие различия выглядят еще более существенными. Расчет приращения затрат на единицу утилитарности показал, что при использовании в лечении стабильной стенокардии органических нитратов пролонгированной формы необходимо дополнительно потратить 36 970 руб. Оценить размер дополнительных затрат во 2-й группе не представлялось возможным, поскольку прироста показателя полезности в данном случае не отмечено. Следовательно, какими бы ни были расходы на лечение при включении в программу терапии органических нитратов обычного высвобождения, они фактически являются бесполезными. При неравнозначности затрат, приходящихся на долю государства и пациентов на стационарном и амбулаторном этапах лечения, нельзя с уверенностью сказать, что если пациент продолжает лечение, то расходы снижаются.

Заключение

Для того чтобы в полной мере оценить экономические преимущества той или иной программы терапии, даже если они не различаются по своему влиянию на прогноз у данной категории пациентов, необходимо комплексное фармакоэкономическое исследование.

Каждый вид анализа отражает тот или иной аспект экономической целесообразности определенного вида медикаментозного вмешательства, но не позволяет соотнести финансовые приоритеты с необходимостью этих затрат и их полезностью для пациента. Как показало наше исследование, назначение органических нитратов пролонгированной формы является обоснованным в плане клинической эффективности и экономической целесообразности, а применение нитратов обычной формы в терапии стабильной стенокардии не оправдывает себя не только в плане экономического преимущества, но и с позиций полезности такого лечения для пациента.

References

1. Aronov D.M., Lupanov V.P. The nitrates usege in coronary heart disease, *Kardiologija*. 2006. No. 1. P. 83–85.
2. Karpov Ju.A. Treatment of patients with stable stenocardia: the issue of the new recommendations GFCF, *RMZh*. 2008. Vol. 16, No. 21. P. 1379–1384.
3. Koncevaja A.V., Kalinina A.M., Spivak E.Ju. The influence of learning in the School of Health for patients with coronary heart disease on the cost structure for medical treatment (ABC-and VEN-analysis), *Racionalnaja farmakoterapija v kardiologii*. 2008. no. 3. P. 59–64.
4. Jagudina R.I., Kulikov A.Ju., Litvinenko M.M. QALY: history, methodology and future methods, *Farmakojekonomika*. 2010. No. 1. P. 11–14.
5. Abrams J. How to use nitrates // *Cardiovasc. Drug Ther.* 2002. Vol.16, No. 6. P. 511–514.
6. ASC Risk Model // URL: <http://www.outcomes-umassmed.org/grase/ascrisk/asc/risk/content> (date 21.04.2011).
7. Cori T., Stolfo Di.G., Sicuro S. et al. Nitroglycerine protects the endothelium from ischemia and reperfusion: human mechanistic insight, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2007. Vol. 64. P. 145–150.
8. Iyenar S.S., Rosano G.M. Effect of antianginal drugs in stable angina on predicted mortality risk after surviving a myocardial infraction: a preliminary study (METRO), *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 2009. Vol. 9 (5). P. 293–297.
9. Jansen R., Cleophas T.J., Zwindermann A.H. et al. Chronic nitrate therapy in patients with angina and comorbidity, *Am. J. Ther.* 2006. Vol. 13, No. 3. P. 188–191.
10. Laher M., Vaughan A., Griffith C. et al. Cost-effective benefit and health economic of cardiac rehabilitation in elderly subject, *Abstracts EuroPrevent congress*. Madrid (Spain). 2007. P. 103.
11. Thomas G.R., Di Fabio M., Cori T. et al. Once daily therapy isosorbide-5-mononitrates causes endothelial dysfunction in humans: evidence of a free-radical-mediated mechanism, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007. Vol. 49. P. 1289–1295.
12. Weinstein M.C., Torrance G., McGuire A. et al. QALY: the basics, *Value and health*. 2009. Vol. 12. P. 5–9.

Поступила в редакцию 01.07.2011.

PHARMACOECONOMIC ANALYSIS OF ORGANIC NITRATES IN ANTIANGINAL THERAPY OF STABLE ANGINA

E.V. Solyanik, E.V. Eliseeva, B.I. Geltser

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – At determining cost efficiency of organic nitrates of various release forms, the authors have found the advantages for isosorbide-5-mononitrate of ordinary and prolonged forms: «cost-efficiency» coefficient was equal to 17.5 and 13.9, respectively. To ensure patient's relative well-being when using nitrates of ordinary release form, it costs 71,721.5 rubles; application of prolonged ni-trates requires 55,458.1 rubles. The «cost-utility» coefficient at outpatient stage is considerably lower than during treatment of stable angina in in-patient clinic and is 26,131.8 rubles with prolonged ni-trates and 39,654.7 rubles with nitrates of ordinary release form (difference in coefficients is 48.3 % in favour of nitrates of prolonged forms). To evaluate the economic advantages of one or another therapy program to the full extent, even if they do not have differences by their impact on prognosis at this category of patients, it is required to carry out complex pharmacoeconomic analysis. Applying of ni-trates of ordinary release form does not work well not merely in terms of economic advantage, but also from positions of utility of such treatments for the patient.

Key words: angina, organic nitrates, cost-efficiency, cost-utility.

УДК 546.657:53.082.56

ТОЛУИЛАТЫ НЕОДИМА (III) – ИНТЕНСИВНЫЕ ИНФРАКРАСНЫЕ ЛЮМИНОФОРЫИ.В. Калиновская¹, А.Н. Задорожная², В.Е. Карасев¹¹Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159), ²Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)*Ключевые слова:* неодим (III), люминесценция, инфракрасные люминофоры.

Изучены спектрально-люминесцентные характеристики разнолигандных соединений неодима (III) с толуиловой кислотой, азот- и фосфорсодержащими нейтральными лигандами. Установлено, что наиболее интенсивно люминесцирующим в инфракрасной области было соединение толуидата неодима (III) с трифенилфосфиноксидом.

На протяжении многих лет иммунохимический анализ, основанный на специфическом связывании определяемого антигена антителами, занимает прочное положение среди наиболее важных биохимических методов исследования. Он нашел широкое применение в медицинской практике для диагностики инфекционных и опухолевых заболеваний, аутоиммунных и эндокринных расстройств, в лекарственном, санитарно-эпидемиологическом и экологическом мониторинге.

Среди методов иммуноанализа, различающихся системой детекции, наряду с иммуноферментным и радиоиммунным широко используется иммунофлюоресцентный метод. Иммунофлюоресцентный метод отличает богатство и разнообразие меток, стабильных в течение длительного времени.

Применение флюоресцентных меток не ограничивается только иммунофлюоресцентным анализом. Многие флюоресцентные красители в литературе выступают под названием «молекулярные зонды». Приложение этих зондов и маркеров в различных областях исследований огромно. Наиболее актуальными современными задачами являются поиск новых высокочувствительных маркеров, в том числе на основе лантанидных хелатов, и увеличение чувствительности существующих.

Соединения неодима (III), имеющие люминесценцию в ближней инфракрасной области, представляют интерес в качестве преобразователей ультрафиолетового и видимого излучения [1, 3]. Изученные нами разнолигандные карбоксилаты европия обладают интенсивной люминесценцией в видимой области. В настоящее время актуальной задачей является расширение диапазона люминесценции от видимой области до ближней инфракрасной.

Цель настоящей работы – изучение спектрально-люминесцентных свойств разнолигандных соединений неодима (III) состава $[\text{Nd}(\text{C}_7\text{H}_7\text{COO})_3 \times \text{D}]_n$, где $\text{C}_7\text{H}_7\text{COO}^-$ – анион толуиловой кислоты, $n=2$,

$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ – D-1,10-фенантролин, $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$ – 2,2-дипиридил, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH})_2\text{C}=\text{NH}$ – дифенилгуанидин, $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{PO}$ – трифенилфосфиноксид.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Проведен анализ электронных спектров поглощения толуилата неодима (III) с азот- и фосфорсодержащими лигандами, максимум поглощения был сдвинут в длинноволновую область в случае с трифенилфосфиноксидом. Люминесценцию комплексных соединений в кристаллическом состоянии снимали при комнатной температуре. 4f-люминесценция синтезированных соединений неодима (III) наблюдалась в области 850–1100 нм в виде двух полос. Одна полоса небольшой интенсивности с центром тяжести около 905 нм соответствовала переходу ${}^4\text{F}_{3/2} - {}^4\text{I}_{9/2}$, вторая, интенсивная с центром около 1060 нм, – переходу ${}^4\text{F}_{3/2} - {}^4\text{I}_{11/2}$ (рис.).

В изучаемых рядах соединений наибольшей интенсивностью люминесценции обладал толуилат неодима (III) с фосфорсодержащим лигандом – трифенилфосфиноксидом. Замена нейтральных молекул в полученных карбоксилатах неодима (III) – трифенилфосфиноксида, 1,10-фенантролина и 2,2-дипиридила приводит к изменению интенсивности люминесценции. Интенсивность люминесценции с азотсодержащими нейтральными лигандами в ближней инфракрасной области была практически в два раза меньше. Было установлено, что изоструктурные m-толуилатам неодима (III) – m-толуилаты европия – обычно являются димерами. Координационный полиэдр толуилатов европия (III) представлен искаженной квадратной антипризмой с переломленными квадратными гранями [2]. При этом молекула нейтрального лиганда может как входить, так и не входить в координационную сферу иона европия (табл.).

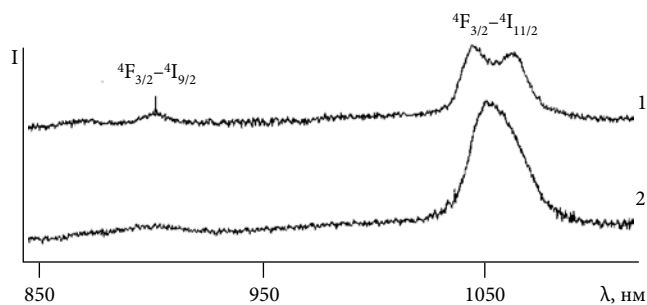


Рис. Спектры люминесценции $[\text{Nd}(\text{C}_7\text{H}_7\text{COO})_3]_n$ (1) и $[\text{Nd}(\text{C}_7\text{H}_7\text{COO})_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2]_2$ (2).

Таблица

Относительная интенсивность ${}^4F_{3/2}$ - ${}^4I_{11/2}$ перехода соединений неодима с толуиловой кислотой, азот- и фосфорсодержащими нейтральными лигандами

| Соединение | $I_{\text{отн.}} {}^4F_{3/2}-{}^4I_{11/2}$, % |
|--|--|
| $\text{Nd}(\text{C}_7\text{H}_7\text{COO})_3(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{PO}$ | 100 |
| $[\text{Nd}(\text{C}_7\text{H}_7\text{COO})_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2]_2$ | 65 |
| $[\text{Nd}(\text{C}_7\text{H}_7\text{COO})_3\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2]_2$ | 53 |
| $[\text{Nd}(\text{C}_7\text{H}_7\text{COO})_3]_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH})_2\text{C}=\text{NH}$ | 15 |

Таким образом, исследование люминесцентных свойств разнолигандных карбоксилатов неодима (III) показало, что наиболее интенсивно люминесцирующими соединениями в инфракрасной области среди синтезированных соединений являются толуилаты неодима (III) с трифенилфосфиноксидом.

Литература

1. Cvirko M.P., Meshkova S.B., Venchikov V.Ja., Bolshoj D.V. Spectra and quantum efficiency of the β -diketonates luminescence of ytterbium (III), *Optika i spektroskopija*. 1999. Vol. 87, No. 6. P. 950.

2. Li X., Jin L.P., Zheng X.J., Lu S.Z., Zhang J.H. Synthesis, structure and luminescence property of the three ternary and quaternary europium complexes, *J. Mol. Str.* 2002. Vol. 607. P. 59–67.
3. Shavaleev N.M., Scopelliti R., Gumy F., Bunli J.G. Near-Infrared Luminescence of Nine-Coordinate neodymium complexes with benzimidazole-substituted 8-Hydroxyguinolines, *Inorg. Chem.* 2008. Vol. 47, No. 19. P. 9055–9068.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

NEODYMIUM TOLUILATES (III) – INTENSIVE INFRARED LUMINOFORS

I.V. Kalinovskaya¹, A.N. Zadorozhnaya², V.E. Karasev¹

¹Institute of Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russian Federation), ²Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The paper provides the study of spectral and luminescent characteristics of neodymium (III) diverse-ligand compounds with toluic acid, nitrogen- and phosphorus-containing neutral ligands. As proved, that compound of neodymium (III) toluilate with triphenylphosphine oxide was the most intensively luminescent compound in the infrared area.

Key words: neodymium (III), luminescence, infrared luminofors.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 114–115.

УДК 616.248+616.24-007.271-036.12-079.4

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Ю.И. Гринштейн, В.А. Шестовицкий, А.В. Максимова

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660022 г. Красноярск, ул. Партизана Железняка 1), Городская клиническая больница № 20 им. И.С. Берзона (660022 г. Красноярск, ул. Инструментальная, 12)

Ключевые слова: бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, дифференциальная диагностика.

Изучены цитологические особенности и процессы свободнорадикального окисления по хемилюминесцентным показателям фагоцитирующих воспалительных клеток в дыхательных путях у пациентов с бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких. На материале 128 обследования больных получены достоверные различия, которые могут быть использованы как дополнительные критерии дифференциальной диагностики этих заболеваний. По материалам исследования получен патент РФ на изобретение № 2262095 от 10.10.2005 г.

Известно, что бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – два самостоятельных заболевания органов дыхания. Сближающим морфологическим субстратом этих заболеваний является хроническое воспаление дыхательных путей [1, 2]. Наиболее эффективным является лечение этих заболеваний при точно установленном диагнозе [8]. Однако по данным отдельных авторов и современной клинической практики в 20–25 % случаев здесь остаются значительные трудности дифференциальной диагностики. Более того, считается, что до 10 % случаев БА может сочетаться с ХОБЛ, что также снижает эффективность лечебного контроля над этими заболеваниями [6, 9, 11].

Гринштейн Юрий Исаевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой терапии Института последипломного образования КрасГМУ; тел. +7 (3912) 64-27-18, e-mail: grinst@online.ru

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ хемилюминесцентных показателей фагоцитирующих клеток бронхиального смыва при воспалении дыхательных путей у больных БА и ХОБЛ, а также разработка способа дифференциальной диагностики данных заболеваний.

Материал и методы. В исследование включены 128 пациентов с БА в стадии контролируемого течения (49 мужчин и 79 женщин) и 53 пациента с ХОБЛ в стадии купированного обострения (32 мужчины и 21 женщина) в возрасте до 75 лет. Верификация диагноза осуществлялась в соответствии с рекомендациями GINA и GOLD [1, 2]. Группу контроля составили 16 практически здоровых лиц.

Материалом для цитологического и хемилюминесцентного исследования фагоцитирующих клеток служила жидкость бронхиального смыва, которую получали по щадящей методике, с учетом международных рекомендаций по проведению бронхоальвеолярного лаважа [12]. Бронхоскопию проводили в утренние часы натощак под местной анестезией 2 % раствором лидокаина с использованием фибробронхоскопа фирмы Olympus (Япония). Через аспирационный канал бронхоскопа в сегментарный бронх вводили 10 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида, подогретого до

37°C. При аспирации получали 5–8 мл жидкости бронхиального смыва. Для получения клеточной суспензии проводили фильтрацию, отмывание клеток, повторное центрифугирование и ресуспендирование в растворе Хенкса. Концентрацию фагоцитов (альвеолярных макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов) в суспензии доводили до 2 млн/мл. Принцип хемилюминесцентного биотестирования заключался в автоматической регистрации квантов света, излучаемого фагоцитами при метаболизме активных форм кислорода. Тестирование проводили в двух параллельных пробах: спонтанной хемилюминесценции (СпХЛ) – естественная продукция активных форм кислорода фагоцитами и стимулированной хемилюминесценции (СтХЛ) – интенсивность свечения клеток в активированном состоянии. Поскольку амплитуда хемилюминесцентного ответа нефагоцитирующих клеток крайне мала, мы не учитывали их значимость в полученных результатах. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 40 мкл пуловой донорской сыворотки группы АВ0 (IV), 100 мкл люминола в концентрации 10^{-5} М, 350 мкл раствора Хенкса и 500 мкл клеточной суспензии (концентрация фагоцитов в пробе – 1 млн/мл). Оценка СпХЛ и СтХЛ проводилась в течение 90 мин на аппаратно-программном комплексе, включающем РС-управляемый 36-канальный Chemiluminometer 3604 (СКТБ «Наука», г. Красноярск). Определяли максимум интенсивности хемилюминесцентного свечения [5].

Результаты исследования. В жидкости бронхиального смыва у пациентов с БА в сравнении со среднестатистическими показателями в группе ХОБЛ и контроле выявлено более высокое содержание эозинофилов ($8,5 \pm 1,5$ против $2,6 \pm 0,8$ и $1,5 \pm 0,8$ % соответственно), достоверно пониженное содержание нейтрофилов ($60,6 \pm 3,5$ против $73,5 \pm 2,6$ и $27,8 \pm 3,5$ % соответственно). Различия в содержании альвеолярных макрофагов ($27,3 \pm 3,6$ против $19,7 \pm 2,3$ %) и лимфоцитов ($4,1 \pm 0,7$ против $4,2 \pm 0,5$ %) были статистически незначимы.

Хемилюминесцентная активность фагоцитирующих клеток в жидкости бронхиального смыва у больных ХОБЛ по показателям метаболизма активных форм кислорода достоверно превышала аналогичные показатели у больных БА и в еще большей степени – у пациентов контрольной группы. Статистически достоверные различия были получены в показателях СпХЛ, а также имелась тенденция к аналогичным изменениям в показателях СтХЛ (табл., рис.).

Клинический пример. Больной Г., 48 лет, поступил в пульмонологическое отделение с жалобами на одышку экспираторного характера с чувством тяжести в грудной клетке, сопровождающуюся сухими свистящими хрипами, периодические приступы удушья с затрудненным выдохом, кашель с умеренным количеством слизисто-гнойной мокроты. Ухудшение в состоянии связывал с перенесенной накануне острой респираторной вирусной инфекцией. Стаж курения – около 25 пачек/лет. Бабушка по материнской линии страдала бронхиальной астмой. С детских лет диагностировали частые респираторные инфекции, бронхит. Анализ крови: умеренный лейкоцитоз (12×10^9 : палочкоядерные – 3 %, сегментоядерные – 44 %, эозинофилы – 7 %, лимфоциты – 31 %,

моноциты – 9 %), СОЭ – 18 мм/час. При рентгенографии – умеренно выраженные пневмосклеротические и эмфизематозные изменения в легких. Данные функции внешнего дыхания: объем формированного выдоха за 1-ю с – 70 % от должной, обратимость бронхиальной обструкции – 15 %, отношение объема форсированного выдоха за 1-ю с к форсированной жизненной емкости легких – 66 %. Имеющиеся данные могли свидетельствовать как о диагнозе БА, так и о возможной ХОБЛ в стадии обострения. При исследовании бронхиального смыва получены следующие данные: количество лейкоцитов – $8,5 \times 10^6$ /мл, количество окрашенных клеток в тесте с трипановым синим – 3 %, значение максимума СпХЛ фагоцитирующих клеток – 8760 усл. ед., что позволило уверенно диагностировать ХОБЛ.

Обсуждение полученных данных. В основе как БА, так и ХОБЛ лежат воспалительные процессы. Но цели и стратегия терапии этих заболеваний различаются: достижение и поддержание контроля при БА, облегчение симптомов и предотвращение прогрессирования при ХОБЛ [4, 7, 13]. Проблема дифференциального диагноза этих заболеваний существует десятилетиями, остается актуальной и в настоящее время [9]. Об этой проблеме еще в начале 90-х годов XX века образно высказался один из ведущих современных отечественных пульмонологов академик А.Г. Чучалин: «Если Вы хотите ввергнуть аудиторию в бесконечную дискуссию, не имеющую своего однозначного разрешения, предложите обсудить проблему дифференциальной диагностики бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких».

В условиях современной клинической практики врач без специального лабораторного и инструментального обследования может провести дифференциальную диагностику БА и ХОБЛ, сформировав дифференциально-диагностическую концепцию, которая уточняется инструментальными и лабораторными методами [10]. Однако в клинической практике все еще остаются случаи, когда окончательный диагноз, по образному высказыванию С.П. Боткина, остается более или менее вероятной гипотезой.

Дифференциальная диагностика БА и ХОБЛ затрудняется в случаях обострения заболевания, связанного с респираторной инфекцией, при сочетании этих заболеваний с кардиальной патологией и недостаточностью кровообращения, при длительной, хронически тяжело протекающей и осложненной астме, при сочетании БА и ХОБЛ. В настоящее время не существует абсолютно достоверных лабораторных маркеров, позволяющих дифференцировать БА и ХОБЛ, поэтому приоритет в данной ситуации отдается клиническому анализу. Инструментальное и лабораторное обследование, несмотря на всю его важность, носит вспомогательный характер, уточняя диагностическую концепцию [10]. Однако научный поиск достоверных дифференциально-диагностических маркеров БА и ХОБЛ продолжается. Имеются единичные работы, посвященные лабораторной диагностике особенностей воспалительного процесса в бронхах при хроническом бронхите и БА, в которых изучалась люминолзависимая хемилюминесценция альвеолярных макрофагов. По количеству активных форм

Таблица

Хемилюминесцентные показатели фагоцитирующих клеток бронхиального смыва у больных БА и ХОБЛ ($M \pm m$)

| Группа | Показатель, усл. ед. | | |
|----------|----------------------|-----------|---------------|
| | СтХЛ | СпХЛ | Диапазон СпХЛ |
| БА | 7190±1102 | 3878±1147 | 2730–6200 |
| ХОБЛ | 10751±1354 | 8886±2672 | 6200 и более |
| Контроль | 608±228 | 530±96 | До 2730 |

кислорода, генерируемых альвеолярными макрофагами, авторы судили о степени и характере воспалительного процесса, протекающего в бронхолегочной системе [3]. Этот метод включает процедуру выделения чистой фракции альвеолярных макрофагов, что является достаточно трудоемким и затратным процессом и ограничивает применение метода в повседневной клинической практике. В нашем сравнительном исследовании изучены суммарные показатели хемилюминесцентной активности всех фагоцитирующих клеток бронхиального смыва у больных БА, ХОБЛ и в группе здоровых лиц. Полученные данные достоверно отличаются в группах больных и в контроле. При этом показатели спонтанного хемилюминесцентного ответа у пациентов с ХОБЛ достоверно и многократно превышают уровень спонтанного хемилюминесцентного ответа у больных БА, который, в свою очередь, достоверно превышает показатели в контрольной группе.

Таким образом, в реальной клинической практике для дифференциальной диагностики БА и ХОБЛ мы предлагаем использовать метод люминолзависимой хемилюминесценции, в которой анализируют суммарное свечение активных метаболитов кислорода всех фагоцитирующих клеток. При значениях максимума свечения СпХЛ в диапазоне от 2730 до 6200 усл. ед. диагностируют БА, от 6200 усл. ед. и выше – ХОБЛ. Значения максимума свечения СпХЛ фагоцитов бронхиального смыва до 2730 усл. ед. считают физиологичными [5]. Нами установлено, что свободнорадикальные изменения в показателях фагоцитарно-клеточного компонента местного иммунитета у больных, страдающих БА и ХОБЛ, различаются между собой и могут быть использованы как дополнительные критерии дифференциальной диагностики. Полученные данные позволяют в особо сложных случаях дифференциального диагноза использовать хемилюминесцентные показатели фагоцитирующих клеток как дополнительные лабораторные маркеры БА и ХОБЛ.

References

1. The global strategy for the treatment and prevention of asthma (GINA). М.: Atmosfera, 2007. 160 p.
2. The global strategy for the diagnosis, treatment and prevention of chronic obstructive pulmonary disease / ed. A.G. Chuchalina. М.: Atmosfera, 2007. 96 p.
3. Daniljak I.G., Kogan A.H., Bolevich S. et al. The generation of reactive oxygen species by alveolar macrophages in patients with bronchial asthma, *Problemy tuberkuleza*. 1993. no. 4. P. 55–58.
4. Clinical recommendations: asthma / ed. A.G. Chuchalina. М.: Atmosfera, 2008. 224 p.

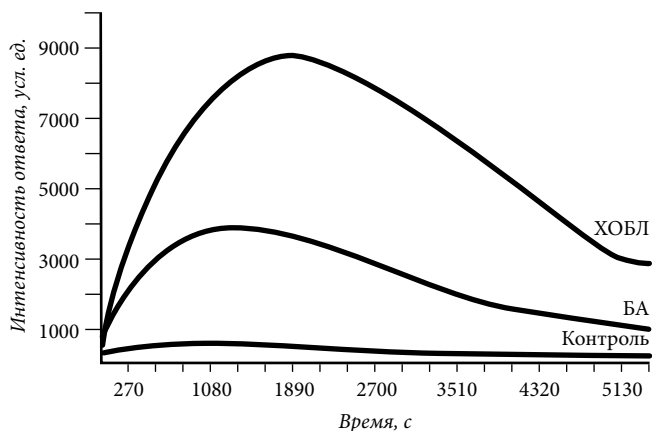


Рис. Люминограммы спонтанного хемилюминесцентного ответа.

5. Maksimova A.V., Grinshtejn Ju.I., Shestovickij V.A. The method of differential diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. Patent no. 2262095 at 10.10.2005.
6. Prozorova V.K., Karlov A. I., Arhipov V.V. How was the approach to the treatment of asthma in recent years, *Farmateka*. 2009. no. 5. P. 39–42.
7. The standards for the diagnosis and treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease / ed. A.G. Chuchalina. М.: Atmosfera, 2005. 96 p.
8. Tatarskij A.R. Diagnosis, differential diagnosis and treatment of bronchial obstruction syndrome: the place of combination pills $\beta/2$ -agonist and inhaled corticosteroids, *Pulmonologija*. 2011. No. 1. P. 89–98.
9. Shestovickij V.A., Grinshtejn Ju.I. Severe asthma. Krasnojarsk: Klaretianum, 2003. 148 p.
10. Shmelev E. I. A combination of asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Consilium medicum*. 2004. Vol. 6, No. 10. P. 754–757.
11. Bateman E.D., Boushey H., Bousquet J. et al. Stability of asthma control with regular treatment: an analysis of the Gaining Optimal Asthma control (GOAL) study, *Allergy*. 2008. Vol. 63. P. 932–938.
12. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO workshop report. Bethesda, National Heart, Lung and Blood Institute, update 2006 // URL: www.goldcopd.com (date 15.05.2010).
13. Rabe K.F., Atienza T., Magyar P. et al. Effect of budesonide in combination with formoterol for reliever therapy in asthma exacerbations: a randomised controlled, double-blind study, *Lancet*. 2006. Vol. 368. P. 744–753.

Поступила в редакцию 19.06.2011.

DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF BRONCHIAL ALLERGY AND CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE

Yu.I. Grinshtein, V.A. Shestovitskiy, A.V. Maksimova
Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voynov-Yasenetskiy (1 Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk 660022),
Nr. 20 Municipal Clinical Hospital named after I.S. Berzon (12 Instrumental Street, Krasnoyarsk 660022 Russian Federation)
Summary – The authors have studied cytological peculiarities and processes of free radical oxidation by chemiluminescent indices of phagocytizing inflammatory cells in breathing passages of patients suffering from bronchial allergy and chronic obstructive lung disease. Having examined 128 patients, they proved firm differences, which may be used as additional criteria for differential diagnostics of these diseases. Based on study materials, they received a patent of Russian Federation for invention Nr. 2262095 dated 10.10.2005.

Key words: bronchial allergy, chronic obstructive lung disease, differential diagnostics.

УДК [616.248+616.211-002+616.728.3-002]-085.814.1

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОЙ МЕТОДИКИ РЕФЛЕКСОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ДВУХ БОЛЬНЫХ С СОЧЕТАННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ – БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ И ГОНАРТРОЗОМ

П.Ю. Пономарев, Г.И. Суханова

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: имплантация микроигл, бронхиальная астма, аллергический ринит, остеоартроз.

Представлены результаты применения нового метода пролонгированной рефлексотерапии – имплантации кетгуттовых микроигл – в лечении сочетанной патологии у двоих больных с сочетанием бронхиальной астмы, аллергического ринита и остеоартроза. Показана высокая эффективность, клиническая и экономическая ценность нового метода.

Вопрос контроля бронхиальной астмы (БА) – заболевания с широчайшей распространенностью и возрастающим влиянием на экономически активное население и благополучие общества – вряд ли когда-нибудь перестанет волновать медицинское сообщество. Теоретически полностью контролируемое заболевание зачастую оказывается резистентным к терапии, поэтому любой эффективный метод, дополняющий фармакотерапию и приближающий больного к полному контролю БА, будет желанен и востребован. Не менее важна возможность снижения доз ингаляционных и пероральных глюкокортикостероидов и быстродействующих бронхолитиков, обладающих серьезными побочными эффектами и ухудшающих течение сопутствующей патологии [2, 5].

Представляют практический интерес сочетание БА с различными заболеваниями. Высока частота сочетания с патогенетически родственными БА аллергическим (вазомоторным) ринитом. Однако и совершенно неродственные заболевания могут существенно влиять на течение и прогноз БА, в частности, дегенеративная патология опорно-двигательного аппарата: остеоартроз и остеохондроз. Практически неизбежное при БА средней и тяжелой степени применение системных глюкокортикостероидов ускоряет прогрессирование остеоартроза и остеохондроза за счет снижения минеральной плотности кости и увеличения массы тела, ухудшая трудовой и жизненный прогноз [3, 4].

Несмотря на большой выбор действующих субстанций и их сочетаний в составе комбинированных препаратов, большое значение в лечении БА имеют и нелекарственные методики: элиминационная терапия, дыхательные упражнения в составе лечебной физкультуры, галотерапия и другие суховоздушные процедуры, рефлексотерапия (в том числе иглорефлексотерапия, поверхностная иглотерапия, фармакопунктура и др.) [1, 2, 5].

В настоящей статье представлены два наблюдения из практики, иллюстрирующие возможности новой

методики рефлексотерапии – имплантации хромированных кетгуттовых микроигл (ИКМ) – в лечении сочетания БА, круглогодичного аллергического ринита и гонартроза.

Метод воздействия – ИКМ по разработанной нами методике в область избранных точек акупунктуры (ТА) [6]. Топография проекции ТА определялась наиболее точным и широко применяемым на данный момент методом – с помощью пропорциональных отрезков и соответственно наружному ходу каналов и коллатералей, а глубина залегания точек – с учетом индивидуальных анатомических особенностей, главная из которых – толщина подкожной жировой клетчатки и мышечная масса [7–10].

Наблюдение 1. Больная Н., 46 лет, гиперстенического сложения, рост 168 см, вес 96 кг (индекс массы тела Кетле – 34). Обратилась в марте 2009 г. с жалобами на приступы затрудненного дыхания до 5–6 раз в неделю в дневное время и около 1 раза в неделю ночью, снимающиеся приемом сальбутамола. Отмечала постоянное затруднение носового дыхания. Пиковая скорость выдоха составила 320 л/мин (желтая зона), после 2 доз сальбутамола – 390 л/мин (обратимость обструкции – 22,5%); суточный разброс показателя составил 35%. По данным спирометрии, объем форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ₁) – 61% от должного. После вдыхания 2 доз сальбутамола он составил 82% от должного (прирост 34%). При пульсоксиметрии насыщение гемоглобина кислородом в артериальной крови – 99%, при тесте 6-минутной ходьбы больная прошла 387 метров, что соответствует дыхательной недостаточности 1-й ст. Пациентка страдала БА и аллергическим ринитом 11 лет, наибольшая интенсивность проявлений астмы приходилась на июль – середину сентября, в эти периоды длительность системных курсов преднизолона достигала 1 мес, а доза колебалась от 10 до 25 мг в сутки (последний прием – в начале января 2009 г., обратилась с обострением БА и гонартроза в марте 2009 г.). Кроме того, получала серетид 25/250 по 1 дозе 2 раза в день (в том числе на момент первого обращения). Лечение системными и ингаляционными глюкокортикостероидами не было упорядоченным и велось в неэффективных дозах, так как даже частичный контроль течения БА не был достигнут.

Со стороны коленных суставов больную в течение более чем 15 лет беспокоила боль механического ритма средней интенсивности (5–6 баллов по визуально-аналоговой шкале) и крепитация при движении, больше в левом коленном суставе, небольшой его отек. 5 лет назад в ходе всестороннего обследования в ревматологическом отделении ПМКБ № 1 был поставлен диагноз остеоартроза с преимущественным гонартрозом, по поводу чего больная периодически принимала нимесулид (найз) по 50–200 мг/сут, с неполным и нестойким эффектом.

Объективно – незначительная дефигурация левого колена за счет экссудативных проявлений, пальпация медиального

отдела суставной щели болезненна, объем пассивных и активных движений полный. По данным рентгенографии: явления гонартроза 2-й стадии по 4-ступенчатой классификации. Изменений в клиническом анализе крови и показателях острой фазы воспаления (ревматоидный фактор, С-реактивный протеин, фибриноген) не выявлено, при ультразвуковом исследовании коленных суставов определено незначительное превышение физиологического объема жидкости в супрапателлярной сумке слева, снижение высоты гиалинового хряща слева до 1,3 мм, справа – 1,7 мм.

Диагноз: БА, атопическая, обострение средней тяжести. Дыхательная недостаточность 1-й ст. Поллиноз. Круглогодичный аллергический ринит, обострение.

Сопутствующие заболевания: остеоартроз, полиостеоартроз с преимущественным гонартрозом, 2-я рентгенологическая стадия. Супрапателлярный бурсит левого коленного сустава. Поперечное плоскостопие 2-й ст. Нарушение функции суставов 1-й ст.

Была назначена лекарственная терапия обострения БА и ринита: симбикорт 160/4,5 мкг по 1 дозе 2 раза в день, беродуал 1–2 дозы при приступе, будесонид 50 мкг (тафен назаль) по 1 дозе 2 раза в день.

Так как были зарегистрированы неэффективность системных нестероидных противовоспалительных средств и развитие бурсита левого коленного сустава, а также неполный и некачественный контроль БА, принято решение о проведении в день обращения процедуры имплантации 18 микроигл в ТА, локальные для коленного сустава (ST 34–37, SP 8–10), сегментарные для коленного сустава и легких (CV 2–3, BL 24–26), канальные для легких (LU 1–3), ТА общего действия (ST 36, LI 10–11) и шу-точки (сочувственные) [11]. В качестве поддерживающей терапии остеоартроза применялись кетопрофен (2 мл внутримышечно 1 раз в день – 5 дней), в дальнейшем рекомендованы эпизодический прием нимесулида (апонил) по 50–200 мг в сутки при боли, глюкозамин сульфат (дона) по 400 мг внутримышечно через день курсом 12 инъекций с последующим приемом перорально в дозе 1200 мг 1 раз в день на срок 6 мес., препарат кальция, наружная терапия (1% гель нимесулида и аппликации геля долобене).

Было обращено внимание на то, что непосредственно после проведения процедуры, еще до приобретения медикаментов и начала лекарственной терапии, больная отметила свободное носовое дыхание, субъективное «облегчение дыхания»; пиковая скорость выдоха составила 420 л/мин, (87% от должного, прирост 6% по сравнению с показателем после двух доз салбутамола; от ингаляции до повторного измерения прошло 4 часа). Эту динамику можно однозначно интерпретировать только как проявление немедленных эффектов ИКМ.

Через неделю в связи с улучшением состояния больная отказалась от использования быстродействующих ингаляционных препаратов (эпизодов затруднения дыхания не было). Пиковая скорость выдоха находилась в зеленой зоне, обратимость обструкции держалась в пределах 6–8%, а суточный разброс сократился до 12–16%. Получив облегчение носового дыхания, больная на 4-й день после имплантации самостоятельно решила не принимать интраназальные глюкокортикостероиды. Со стороны коленного сустава отмечено снижение интенсивности боли – 2 балла по визуально-аналоговой шкале (только при спуске с лестницы и приседании на корточках), отек сустава практически исчез, системными нестероидными противовоспалительными средствами больная не пользовалась.

Повторное обращение по поводу обострения БА состоялось в ноябре 2009 г.: появились эпизоды затрудненного дыхания с кратностью 5 раз за последние 2 недели и однократно ночью. При расспросе выяснилось, что назначенную базисную терапию больная принимала 2 месяца, а период цветения основных растений-аллергенов (июнь–октябрь) прошел без приема базисных средств. Обострение БА началось позже, в ноябре, спустя 7 месяцев после имплантации микроигл. Пиковая скорость выдоха составила 370 л/мин (желтая зона), после двух доз салбутамола – 440 л/мин (обратимость обструкции 19%), суточный разброс этого показателя равнялся 23,5%. ОФВ₁ составил 76% от должного, прирост после салбутамола – 17%. Носовое дыхание оставалось свободным, хотя интраназальной терапии больная по-прежнему не получала. Что касается динамики гонартроза, следует отметить, что через 7 мес достигнутый в ходе первого курса лечения эффект остался стабильным: боль на уровне 1–2 баллов, отек сустава отсутствовал, системных нестероидных противовоспалительных препаратов больная не принимала.

Поскольку из наших ранее проводившихся наблюдений известно, что длительность действия процедуры ИКМ составляет от 4 до 7 мес, для поддержания эффекта было решено провести повторную процедуру по ходу канала легких (LU 1–2), а также в область спинки носа и повторный курс хондропротекторов. В качестве терапии БА были назначены симбикорт (80/4,5 по 1 дозе 2 раза в день) и беродуал при приступе.

После этого в течение 1 года усугубления симптомов гонартроза не зарегистрировано (боль на уровне 1–2 баллов, отек сустава отсутствовал, системных нестероидных противовоспалительных препаратов не принимала). Симптомы БА также отсутствовали, хотя доза ингаляционного глюкокортикостероида была минимальна (80 мкг будесонида 2 раза в сутки). Отсутствовали эпизоды обострения ринита даже на фоне острой респираторной вирусной инфекции.

Полученные результаты говорят о выраженном пролонгированном противовоспалительном действии микроигл, как при локальном воздействии, так и при использовании сегментарной и канальной зависимости. В данном случае длительность действия процедуры относительно дыхательной системы оказалась равна 5–6 мес, после чего диагностировано обострение БА, которое легко купировалось без использования системных глюкокортикостероидов и имело значительно менее выраженный характер, нежели до первой процедуры имплантации. Кроме того, впервые за все время заболевания появились длительные (3–4 мес) эпизоды полного контроля БА, даже в условиях нерегулярного приема базисных средств. Существенное улучшение качества жизни определило приверженность больной к повторным процедурам ИКМ.

Наблюдение 2. Больной Д., 34 лет, обратился в мае 2010 г. Диагноз БА установлен в возрасте 22 лет, течение интермиттирующее, адекватной терапии не получал. Затруднение носового дыхания в течение всего года, больше в июне–августе с 15–16 лет; периодически принимал назальные глюкокортикостероиды (мометазон фураат, будесонид) и адреномиметики (оксиметазолин, ксилометазолин) на фоне практически постоянного применения пероральных H₁-блокаторов (клемастин, дезлоратадин, эбастин). Последние 6 мес испытывал приступы удушья (1–2 в мес) в течение всего года, снимавшиеся салбутамолом, anosmia и затруднение (до полного отсутствия) носового дыхания.

Пиковая скорость выдоха составила 81 %, после сальбутамола – 108 % (обратимость 33 %), суточный разброс показателя – 28 %. ОФВ₁ составил 84 %, после двух доз сальбутамола – 98 % (скрытый бронхоспазм). Таким образом, явления БА были незначительными, но ринит – весьма выраженным.

Пациент предъявлял жалобы на боль в коленях механического ритма (4 балла по визуально-аналоговой шкале), после падения 2 недели назад возник еще и небольшой отек слева, прошедший самостоятельно на фоне наружной терапии (гель «Вольтарен»). В течение последних 5 лет больной неоднократно травмировал коленный сустав с последующим его отеком и болевым синдромом. Прошел всестороннее обследование в ревматологическом отделении ПМКБ № 1, где был поставлен диагноз посттравматического гонартроза. Применял системные нестероидные противовоспалительные препараты (нимесулид, диклофенак, напроксен) и различные наружные средства, трехкратно в полость сустава вводились глюкокортикостероиды. На момент осмотра коленные суставы визуально не изменены, движения в полном объеме.

Диагноз: БА, легкое персистирующее течение, неконтролируемая. Дыхательная недостаточность 0 ст. Поллиноз. Круглогодичный аллергический ринит, обострение.

Сопутствующие заболевания: посттравматический гонартроз с обеих сторон, 1-я рентгенологическая стадия. Поперечное плоскостопие 1 ст. Нарушение функции суставов 1 ст.

В день обращения до начала медикаментозной терапии больному проведена имплантация 14 микроигл; использованы локальные ТА коленного сустава (ST 34–37, SP 8–10, GB 33–34), локальные внеканальные (EX-NH 1, EX-NH 3) и отдаленные ТА канала легких (LU 1–2), а также точки общего действия (ST 36, LI 10–11). Назначены фексофенадин (телфаст) – 120 мг 1 раз в день, сальбутамол – 1–2 дозы при приступе и назальный спрей флутиказона фуората (авамис) – по 1 дозе 2 раза в день. В качестве терапии остеоартроза применялись нимесулид (нимесил) в дозе 100 мг 1 раз в день – 5 дней, глюкозамин сульфат (дона) – по 400 мг внутримышечно через день (курс 12 инъекций) с последующим пероральным приемом по 1200 мг в день в течение 6 мес. Наружная терапия проводилась аналогично описанной в предыдущем наблюдении.

Немедленный эффект имплантации проявился еще в ходе процедуры ИКМ и состоял в полном исчезновении боли и самостоятельном возобновлении носового дыхания без какого-либо фармакологического воздействия. Впоследствии больной выполнял назначения с видимым улучшением состояния. В июле 2010 г. (на 3-м месяце лечения) отменил назальную терапию полностью, так как носовое дыхание оставалось свободным. Приступов затруднения дыхания за весь период наблюдения не отмечал ни разу, ингаляционной терапии не использовал. Пиковая скорость выдоха составила 96 %, после сальбутамола – 102 % (обратимость 6 %), суточный разброс – в пределах 8–10 %; ОФВ₁ – 97 %, после сальбутамола – 101 % (прирост недостоверен). При контрольных осмотрах через неделю, месяц и шесть месяцев после ИКМ боль в коленном суставе пациента не беспокоила, несмотря на активные занятия спортом; местные и резорбтивные нестероидные противовоспалительные препараты не применял.

В направлении аллергического ринита ИКМ действовала вместе с назальными глюкокортикостероидами, и на фоне комбинированного воздействия достигнута стойкая и полная ремиссия. Что касается БА, в течение 6 месяцев наблюдения после ИКМ отсутствовали приступы удушья и отмечено улучшение объективных показателей функции внешнего дыхания в виде уменьшения степени бронхообструкции.

Описанный случай – пример успешного контроля легкой персистирующей БА без использования базисных препаратов в течение 10 месяцев. Подтверждается высокая эффективность новой методики в лечении и посттравматических гонартрозов в начальных стадиях.

Таким образом, ИКМ является малоинвазивной, простой, доступной и безопасной методикой контроля БА и аллергического ринита и лечения остеоартроза, в том числе посттравматического, характеризующаяся большой длительностью действия и немедленными эффектами (бронходилатирующим, деконгестивным и анальгетическим). Метод позволяет значительно снизить лекарственную нагрузку, создаваемую системными глюкокортикостероидами и нестероидными противовоспалительными препаратами, эффективно предотвращая их побочные эффекты и существенно снижая себестоимость терапии.

References

1. Vasilenko V.M., Osipova N.N., Shatkina G.V. The acupuncture lectures. M.: Su Dzhok akademija, 2002. 374 p.
2. A global strategy for the treatment and prevention of asthma. Peresmotr VOZ 2007 goda. / ed. A.G. Chuchalina. M.: Atmosfera, 2007. 160 p.
3. Kovalenko V.N., Bortkevich O.P. Osteoarthritis: a practical manual. Kiev: Morion, 2003. 446 p.
4. Nasonov E.L. Modern trends of osteoarthritis pharmacotherapy, *Consilium medicum*. 2001. No. 9. P. 20–24.
5. Respiratory medicine: a guide in 2 vol. / ed. A.G. Chuchalina. M.: GEOTAR-media, 2007. 1616 p.
6. The method of reflexology implantation of outside things in the acupuncture points. Zajavka na izobretenie No. 2505100 at 11.05.2010. Ponomarev Ju.V., Ponomarev P.Ju., Suhanova G.I., Narkevich A.B.
7. Eachou Ch. Cross-sectional anatomy of acupoints. Churchill Livingstone, 1995. 244 p.
8. Flaws B., Finney D. A compendium of traditional chinese medicine patterns and treatments. Blue Poppy Press, 1996. 197 p.
9. George Soulié De Morant. Chinese acupuncture. Brookline: Paradigm Publications, 1994. 896 p.
10. Liu Yan. Diagrams of acupuncture manipulations [Chinese-English edition]. Schanghai scientific and technical publishers, 2003. 164 p.
11. Liu Yan. Illustration of composed acupoints in acupuncture-moxibustion use. Schanghai scientific and technical publishers, 2003. 390 p.

Поступила в редакцию 14.01.2011.

EXPERIENCE IN APPLICATION OF NEW METHODS OF REFLEXOTHERAPY IN TREATMENT OF TWO PATIENTS WITH POLYPATHIA – BRONCHIAL ALLERGY, NASAL ALLERGY AND GONARTHROSIS

P.Yu. Ponomarev, G.I. Sukhanova

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The paper describes the application results of new method of prolonged reflexotherapy – implantation of catgut microneedles – in treatment of polypathia of two patients suffering from bronchial allergy, nasal allergy and osteoarthritis. It substantiates the high efficiency, clinical and economic value of such method.

Key words: *implantation of microneedles, bronchial allergy, nasal allergy, osteoarthritis.*

УДК 611.8.018.82:004

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ СТАНДАРТНЫХ КОМПЬЮТЕРНЫХ ПРОГРАММ

М.С. Старцева, В.М. Черток

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: количественная гистохимия и иммуногистохимия, автоматизированная оценка интенсивности реакции.

Описан опыт применения стандартных компьютерных программ Adobe Photoshop и Mathcad для автоматизированного измерения интенсивности реакции в нейронах головного мозга. В качестве образцов для демонстрации возможностей этих программ использованы нитроксидазические и серотонинергические нейроны одиночного ядра, выявленные соответственно гистохимическим и иммуногистохимическим методами.

За последние годы количественная гистохимия превратилась в важнейшее научное направление в морфологии. Ее главное назначение – определение концентрации химических веществ на месте их образования. Эти данные, выраженные в условных единицах, представляют собой объективную оценку результатов гистохимического и иммуногистохимического исследований [1, 3, 6]. Для проведения измерений размеров, формы клеток, содержания в них химических компонентов выпускается специальная, большей частью автоматизированная аппаратура. Однако в связи с высокой коммерческой стоимостью таких аппаратов их применение в России ограничивается несколькими специализированными лабораториями. Значительно чаще для проведения соответствующих измерений используются более простые и дешевые приборы: одно- или двухлучевые микроспектрофотометры, денситометры и т.д. Несмотря на некоторые конструктивные отличия указанных аппаратов, в их работе используется единый принцип измерений, напрямую вытекающий из закона Ламберта–Бэра. Согласно этому закону, слои гомогенной поглощающей среды равной толщины поглощают равное количество света. С помощью микроспектрофотометров исследуют пропускание и поглощение света веществом, связанным с красителем. Измерив эти параметры, можно вычислить концентрацию красителя, связанного в результате гистохимической реакции, и, таким образом, найти концентрацию исследуемого вещества [1, 6]. Однако необходимость многократных измерений, наличие многочисленных, зачастую трудновыполнимых условий для получения объективных данных, большие затраты времени усложняют использование этого метода для решения крупных научных задач [1, 3].

В свое время для вычисления некоторых количественных параметров морфологических объектов мы предложили использовать комплекс известных

компьютерных программ, позволяющих на их основе создавать АСАИ – автоматизированные системы анализа изображений [2, 10]. При невысокой стоимости эти системы, к которым относится и предложенная нами АСАИ «Allegro-МС», точностью измерений не уступают их коммерческим аналогам. Впоследствии наши предложения были успешно использованы другими исследователями для решения различных научных задач [4, 8].

Целью настоящей работы явилось изучение возможности применения известных компьютерных программ Adobe Photoshop и Mathcad, встроенных в АСАИ Allegro-МС, для измерения интенсивности реакции при гистохимических и иммуногистохимических исследованиях на примере NADPH-позитивных и серотонинергических нейронов одиночного ядра продолговатого мозга крысы.

При гистохимических исследованиях нейроны в одних и тех ядрах существенно отличаются между собой интенсивностью реакции, структурой и плотностью выпавшего осадка. Клетки, в которых осадок имеет гомогенную структуру и равномерно заполняет всю цитоплазму, встречаются довольно редко, примерно в 6–10% случаев [5, 9, 11]. Большинство же нейронов окрашивается крайне неравномерно: имеются участки цитоплазмы с отдельно лежащими мелкими и крупными, ярко окрашенными гранулами преципитата, между которыми могут находиться разного размера гранулы с бледной окраской, зачастую едва отличимые от фона. В других клетках осадок образует объемные конгломераты с более или менее интенсивной окраской. Все это в значительной степени затрудняет или делает невозможным объективную оценку данных, полученных при микроспектрофотометрии [1, 3, 6]. Кроме того, при вычислении средних значений показателя оптической плотности продукта реакции (СПОП) в ядерных или корковых образованиях мозга необходимо учитывать количество энзимопозитивных нейронов и их размеры, что требует дополнительных затрат времени и сил для таких измерений.

Опыт проведения подобных исследований показывает, что для вычисления оптической плотности продукта, образующегося в результате гистохимической или иммуногистохимической реакции, гораздо эффективнее использовать «пиксельный метод» обработки оцифрованных цветных изображений [5, 9, 11]. В его

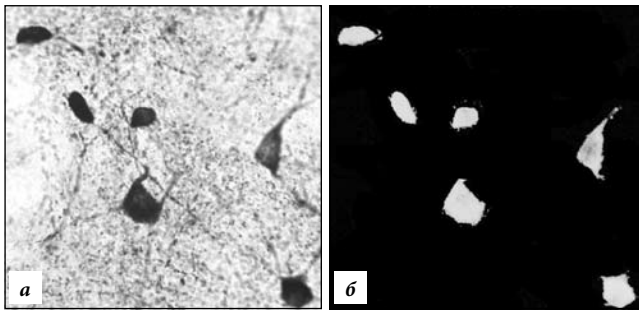


Рис. 1. Нейроны с разной степенью интенсивности гистохимической реакции в окне документа Adobe Photoshop: а – оцифрованное полноцветное изображение препарата; б – изображение того же препарата с удаленным фоном; $\times 100$.

основе лежит совершенно иной, чем при цитофотометрии, принцип измерений, который заключается в подсчете стандартными компьютерными программами Adobe Photoshop и Mathcad в автоматическом режиме суммы пикселей, образующих данное изображение в выделенном участке препарата. Предлагаемый нами метод позволяет обойти большинство из отмеченных выше трудностей, возникающих при цитофотометрии продукта реакции.

Пиксел (от англ. *picture element* – элемент изображения) – элементарное составляющее оцифрованного изображения, характеризуется определенным цветом, яркостью и, возможно, связанной с ней прозрачностью. Один пиксел может хранить информацию только об одном цвете, который и ассоциируется с ним, а яркость пикселя определяет, насколько сильно цвета пикселей этих компонентов отличаются от черного цвета. Формирование цвета в режиме RGB происходит при отображении препарата на экране компьютерного монитора, а цветовой оттенок каждого пикселя определяется интервалами между интенсивностями RGB-составляющих [7].

В нашей работе использована обычная шкала из 256 градаций интенсивности и общепринятая для RGB-модель цветового пространства, а сложение яркостей пикселей в исследуемых участках изображения позволило определить средние значения интенсивности цвета отдельных его компонентов (в нашем случае – окрашенных гранул как в цитоплазме одиночного нейрона, так и в их совокупности на препарате продолговатого мозга).

Для вычисления значений оптической плотности продукта гистохимической реакции в нейронах оцифрованное полноцветное (8 бит/пиксел) изображение препарата переносится на экран компьютера и вводится в окно программы Adobe Photoshop (рис. 1, а). Затем область фона выделяется и удаляется, а цвета инвертируются (рис. 1, б), что делает возможным автоматический подсчет суммы яркостей пикселей не только в отдельных, обведенных «световым пером» нейронах, но и автоматизированное вычисление этого показателя во всех клетках выделенного участка препарата. Кроме того, после инверсии цвета в этой

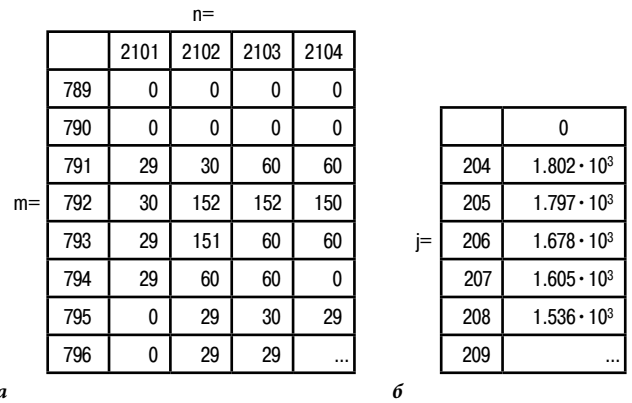


Рис. 2. Документы Mathcad:

а – изображение матрицы в цифровой форме, где каждому пикселю соответствует свой номер яркости; б – изображение матрицы с количеством пикселей, обладающих разной степенью яркости, в нейроне одиночного ядра.

программе нейроны со светлой окраской имеют более привычные для нашего восприятия меньшие значения интенсивности, а с более темной – большие, т.е. программа присваивает белому цвету – значение 1 из 256 градаций интенсивности.

После пересохранения документа из формата JPEG в формат BMP изображение автоматически перемещается в программу Mathcad с помощью встроенной функции READBMP. В программе Mathcad с использованием функции imhist происходит автоматическое построение матрицы размерностью $m \times n$, где m – количество пикселей в столбце, n – количество пикселей в строке. Каждому пикселю в такой матрице соответствует свой номер яркости (рис. 2, а).

Данные, приведенные в матрице, используются для вычисления суммарной яркости пикселей в выявленных нами нейронах (рис. 2, б).

Для вычисления суммарной яркости пикселей (I) используется следующая формула:

$$I = j_0 \times 0 + j_1 \times 1 + \dots + j_{255} \times 255 = \sum_{j=0}^{255} j_i \times i,$$

где j_i – количество пикселей с определенной яркостью.

Для нашего случая это число составляет:

$$I = \sum (i \times j_i) = 5,91 \times 10^7.$$

Полученное значение I подставляем в формулу для вычисления СПОП во всех нейронах выделенного «световым пером» участка препарата (в нашем случае NADPH-позитивных нейронов одиночного ядра продолговатого мозга):

$$\text{СПОП} = \frac{I}{S} = \frac{I}{N} r \Gamma^2 = 143,6 \text{ усл. ед.},$$

где I – суммарная яркость пикселей в выявленных нами нейронах, S – площадь нейронов, N – количество пикселей в нейронах исследуемой области, r – разрешение

документа (количество пикселей в см²), Г – увеличение, при котором производилась съемка.

В том случае, когда требуется вычислить содержание исследуемого вещества, исходя из объема клеток, в приведенной выше формуле следует заменить значения площади нейронов (S) на величину их объема (V). Заметим, что оба эти показателя вычисляются автоматически АСАИ «Allegro-МС» [2, 11].

СПОП – информативный показатель, но он дает лишь общее представление об интенсивности реакции во всех нейронах данного участка препарата. Однако уменьшение значений этого показателя, например, может наблюдаться как при сокращении числа клеток с высокой активностью фермента, так и при снижении в части из них активности реакции, что может существенно изменить представления исследователя о причинно-следственных отношениях в цепи рассматриваемых событий.

Детализировать информацию об изменениях СПОП в интересующем нас участке препарата можно в том случае, если систематизировать нейроны с различной яркостью пикселей, т.е. определить долю клеток с заданной интенсивностью реакции в выделенном участке препарата. Такие вычисления можно осуществить в автоматическом режиме с использованием программы Mathcad. Для этого необходимо предварительно выставить интервалы значений яркости пикселей для нейронов, имеющих, например, очень высокую, высокую, среднюю и низкую активность фермента в гистохимических работах, или интервалы содержания продукта реакции в клетках в иммуногистохимических исследованиях, а затем активировать функцию «count» этой программы. Понятно, что количество размерных групп можно увеличивать или уменьшать в соответствии с задачами исследования.

Как показали наши наблюдения, количественное соотношение как NADPH-позитивных, так и серотонинергических нейронов, имеющих высокие и низкие значения оптической плотности преципитата, существенно отличается в разных ядрах [5, 9, 11]. В одиночном ядре преобладают нитроксидаергические нейроны с умеренной и низкой активностью фермента, но отсутствуют с высокой, а в ретикулярном крупноклеточном ядре много клеток с высокой и очень высокой активностью энзима, но редко встречаются с низкой. Клеток с высоким содержанием серотонина всегда много в ядрах шва, но они почти полностью отсутствуют в вегетативных ядрах и одиночном ядре.

Таким образом, с помощью компьютерных программ в процессе реализации «пиксельного метода» в основном совершаются три операции, которые можно назвать «операции ЗС» – сложение, систематизация, счет. Понятно, что для использования этого метода в автоматическом режиме приведенные выше формулы и алгоритм действий по расчету показателей следует внедрить в соответствующие компьютерные

программы. После чего исследователю остается только ввести изображение в окно монитора, выделить «световым пером» контуры интересующего участка препарата для создания «морфометрической маски», а затем в считанные минуты получить значения заданных параметров.

References

1. Agroskin L.S., Papajan G.V. Cytometry. Apparatus and methods for the analysis of cell absorption. L.: Nauka. 1977. 624 p.
2. Afanasev A.A., Chertok V.M. Quantitative biomicroscopy microvasculature, *Pacific Medical Journal*. 2004. No. 2. P. 82–86.
3. Zhuravleva T.B., Prochuhanov R.A. Introduction to quantitative histochemistry of enzymes. M.: Mir, 2002. 234 p.
4. Irjanov Ju.M., Silanteva T.A., Gorbach E.V. Processing and image analysis in histological researches by using standard computer programs, *Morfologicheskie vedomosti*. 2004. No. 12. PS. 11–13.
5. Kocjuba A.E., Chertok V.M., The spatial organization of serotonergic and ergic neurons in some nuclei of bulbar department of human cardiovascular center, *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 4. P. 43–46.
6. Luppа H. Fundamentals histochemistry. M.: Mir, 1980. 344 p.
7. Nedzved A.M., Ablamejko C.B. The representation of color images for the mathematical morphology, *Kompjuterij analiz dannyh i modelirovanie*: sb. nauch. statej V mezhdunar. konf. / eds. S.A. Ajvazjana i Ju.S. Harina. Minsk: BГУ, 1998. Part 4. P. 86–95.
8. Silanteva T.A., Gorbach E.N. A quantitative assessment for the intensity histological reactions to digitized images of histological preparations with using graded standards, *Ukrainskij zhurnal telemediciny*. 2010. No. 1. P. 68–71.
9. Starceva M.S., Kocjuba A.E., Koldaev V.M. The use of systems analysis to assess the significance of ergic neurons changes in the nucleus of the rats medulla oblongata with experimental hypertension, *Pacific Medical Journal*. 2011. No. 3. P. 61–64.
10. Chertok V.M., Afanasev A.A., Kocjuba A.E. The use of automated image analysis system Allegro-MS for morphometric researches, *Morfologija*. 2003. No. 4. P. 88–92.
11. Chertok V.M., Kocjuba A.E., Kocjuba E.P. Serotonin and nitroxiдаergic neurons in the nucleus of the medulla oblongata, *Morfologija*. 2011. No. 1. P. 32–37.

Поступила в редакцию 12.03.2011.

QUANTIFICATION OF INTENSITY OF HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL RESPONSES USING STANDARD COMPUTER SOFTWARE

M.S. Startseva, V.M. Chertok

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The paper describes experience in applying software programs Adobe Photoshop and Mathcad to automatically measure intensity of the responses in cerebral neurons. The authors have used nitroxiдаergic and serotoninerгic neurons of single nucleus detected by histochemical and immunohistochemical methods, respectively, as specimen needed to demonstrate the possibilities of applying the software.

Key words: quantitative histochemistry and immunohistochemistry, computer-aided response scoring.

УДК 616.5(092) Юцковский

Александр Дмитриевич ЮЦКОВСКИЙ

К 70-летию со дня рождения

28 ноября 2011 г. исполнилось 70 лет Александру Дмитриевичу Юцковскому – д-ру мед. наук, профессору кафедры дерматовенерологии и косметологии Владивостокского государственного медицинского университета, главному внештатному дерматовенерологу Дальневосточного федерального округа.

В 1970 г. А.Д. Юцковский окончил Запорожский медицинский институт и поступил в заочную аспирантуру на кафедру кожных и венерических болезней ЗГМИ, по окончании которой в ЦКВИ защитил кандидатскую диссертацию. С 1976 г. работал заведующим НИСа ЗГМИ, продолжая работу в ОКВД. С 1980 по 1983 г. работал в республике Уганда, где активно участвовал в диагностике и разработке методов лечения кожных и венерических болезней с учетом эндемических особенностей, одновременно занимаясь подготовкой молодых специалистов. С 1984 г. А.Д. Юцковский, работая ассистентом кафедры дерматовенерологии ЗГМИ, подготовил докторскую диссертацию и защитил ее в ЦКВИ (1990).

В 1991 г. Юцковский А.Д. был избран по конкурсу на должность заведующего кафедрой дерматовенерологии ВГМИ, а в 1993 г. ему было присвоено звание профессора. Научным направлением кафедры в эти годы стало изучение проблем урогенитальных заболеваний, патогенеза скрытых и серорезистентных форм сифилиса, особенностей течения хронических заболеваний кожи, в том числе профессиональных и лимфопролиферативных дерматозов, в Приморском крае. Новым направлением исследований стала разработка и внедрение наружных лекарственных и космецевтических средств в содружестве с НИИ ДВО РАН. Результаты научных исследований неоднократно докладывались А.Д. Юцковским на крупнейших всероссийских конференциях, а также представлялись на международных конгрессах и съездах.

В 1995 г. А.Д. Юцковский был утвержден в должности директора МУП «Врачебная косметологическая лечебница», явившегося первой косметологической клиникой на территории Дальнего Востока. С этого периода совмещение им заведования кафедрой и управления клиникой позволило активизировать медицинскую помощь населению Приморского края по всем направлениям терапевтической и хирургической косметологии.

Сегодня профессор А.Д. Юцковский является автором и соавтором более 600 печатных работ, в том числе отдельных глав четырех руководств для



дерматовенерологов и косметологов, клинических иммунологов; 6 патентов; 25 рацпредложений; 15 учебно-методических пособий; 6 межрегиональных сборников; 9 монографий. Монографии А.Д. Юцковского «Иммунология дерматофитий», «Аспекты врачебной косметологии», «Фармакоэкономические вариации в дерматовенерологии», «Дерматовенерологическая служба ДВ ФО» заслужили признание практических дерматовенерологов и косметологов, так как были одними из первых в этих направлениях. Под руководством проф. А.Д. Юцковского защищено 6 кандидатских диссертаций,

он являлся научным консультантом двух докторских диссертаций. Будучи членом учебно-методической комиссии МЗ РФ, научно-координационных советов по микологии, косметологии, А.Д. Юцковский активно отстаивал позиции по сохранению и развитию специальности «дерматовенеролог-косметолог» в течение последних десятилетий.

Александр Дмитриевич на посту главного внештатного дерматовенеролога ДВФО внес большой вклад в развитие дерматовенерологической службы округа, оказывая неоценимую помощь практическому здравоохранению, а также уделяя огромное внимание подготовке региональных врачебных кадров в области дерматовенерологии и косметологии.

Проф. А.Д. Юцковский – председатель Приморского отделения Российского общества дерматовенерологов и косметологов, активно участвует в работе редакционных советов журналов: «Дерматология. Сексопатология. Косметология» (Украина), «Тихоокеанский медицинский журнал» (Владивосток), «Клиническая дерматовенерология» (Москва), а также является главным редактором регионального научно-практического журнала «Дальневосточный вестник дерматовенерологии, косметологии и пластической хирургии» (Владивосток).

Высокий профессионализм Александра Дмитриевича, творческая инициатива ученого, постоянная консультативная и методическая работа в практическом здравоохранении, а также такие уникальные человеческие качества, как доброжелательность и отзывчивость, снискали ему авторитет и уважение как в научном мире нашей страны, так и далеко за ее пределами. Его заслуги отмечены двумя почетными наградами Приморской краевой администрации и знаком «Отличник здравоохранения».