

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ВЕСТНИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

Научно-теоретический журнал. Выходит один раз в два месяца. Основан в 1946 г.

Входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК
Учредитель — Российская академия медицинских наук

Главный редактор И.И. ДЕДОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Э.К. АЙЛАМАЗЯН, А.И. АРЧАКОВ, Л.И. АФТАНАС, А.А. БАРАНОВ, В.В. БЕРЕГОВЫХ (зам. гл. редактора),
Л.А. БОКЕРИЯ, Н.Н. ВОЛОДИН, Н.Ф. ГЕРАСИМЕНКО, Е.К. ГИНТЕР, П.В. ГЛЫБОЧКО, Е.З. ГОЛУХОВА,
В.В. ЗВЕРЕВ, Р.С. КАРПОВ, С.И. КОЛЕСНИКОВ, В.В. КУХАРЧУК, Г.А. МЕЛЬНИЧЕНКО, Н.А. МУХИН,
Е.Л. НАСОНОВ, Г.Г. ОНИЩЕНКО, В.И. ПЕТРОВ, В.И. ПОКРОВСКИЙ, В.П. ПУЗЫРЁВ, В.Г. САВЧЕНКО,
В.И. СЕРГИЕНКО, Г.А. СОФРОНОВ, В.И. СТАРОДУБОВ, Г.Т. СУХИХ, В.А. ТУТЕЛЬЯН (зам. гл. редактора),
И.Б. УШАКОВ, Р.М. ХАИТОВ, Е.И. ЧАЗОВ, В.П. ЧЕХОНИН, В.И. ЧИССОВ, Е.В. ШЛЯХТО

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР: А.М. ГОЛУБЕВ

2015/том 70/№6

Журнал «Вестник Российской академии медицинских наук» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 16.09.1992 г. Регистрационный номер 01574.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов.

Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без согласия редакции является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством РФ

Тираж 1000 экз. Подписные индексы: в агентстве Роспечать — 71488, в агентстве «Пресса России» — 38814

Издательство «ПедиатрЪ»: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, 2/62, тел./факс: +7 (499) 132-30-43, <http://vestnikramn.spr-journal.ru>
e-mail: vestnikramn@nczd.ru

ООО «ХОМОПРИНТ»: 117623, Москва, ул. Типографская, д. 10

THE RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES

ANNALS OF THE RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES

Published bimonthly. Founded in 1946.

The Journal is in the List of the leading scientific journals and publications
of the Supreme Examination Board (VAK)
Founder — The Russian Academy Of Medical Sciences

Editor-in-chief I.I. Dedov

EDITORIAL BOARD:

E.K. AILAMAZYAN, A.I. ARCHAKOV, L.I. AFTANAS, A.A. BARANOV, V.V. BEREGOVYKH (deputy editors-in-chief),
L.A. BOKERIYA, N.N. VOLODIN, N.F. GERASIMENKO, E.K. GINTHER, P.V. GLYBOCHKO, L.Z. GOLUKHOVA,
V.V. ZVEREV, R.S. KARPOV, S.I. KOLESNIKOV, V.V. KUKHARCHUK, G.A. MELNICHENKO, N.A. MUKHIN,
E.L. NASONOV, I.I. ONISHCHENKO, V.I. PETROV, V.I. POKROVSKII, V.P. PUZYREV, V.G. SAVCHENKO,
V.I. SERGIENKO, G.A. SOFRONOV, V.I. STARODUBOV, G.T. SUKHIKH, V.A. TUTELYAN (deputy editors-in-chief),
I.B. USHAKOV, R.M. KHAITOV, E.I. CHAZOV, V.P. CHEKHONIN, V.I. CHISSOV, E.V. SHLYAKHTO

RESEARCH EDITOR: A.M. GOLUBEV

2015/ 70 (6)

Mass media registration certificate dated September, 16, 1992. Series № 01574 Federal service for surveillance over non-violation
of the legislation in the sphere of mass communications and protection of cultural heritage.

Editorial office takes no responsibility for the contents of advertising material.

No part of this issue may be reproduced without permission from the publisher. While reprinting publications one must make reference
to the journal «Annals Of The Russian Academy Of Medical Sciences»

Edition 1000 copies. Subscription indices are in the catalogue «Rospechat» 71488

Publisher «PEDIATR»: 2/62, Lomonosov avenue, Moscow, 119991, tel./fax: +7 (499) 132-30-43, <http://vestnikramn.spr-journal.ru>
e-mail: vestnikramn@nczd.ru

Printed in the printing office «KHOMOPRINT», 10, Tipografskaya st., Moscow, 117623

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ АКУШЕРСТВА
И ГИНЕКОЛОГИИ**

М.Т. Луценко, И.А. Андриевская Трансаминирование в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты рожениц, перенесших обострение цитомегаловирусной инфекции в третьем триместре беременности

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОХИМИИ

В.И. Сергиенко, М.Ш. Хубутия, А.К. Евсеев, А.В. Пинчук, М.С. Новрузбеков, К.Н. Луцык, М.М. Гольдин Диагностические и прогностические возможности электрохимических измерений редокс-потенциала плазмы крови

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ

Л.М. Куртасова, Н.А. Шакина, Т.В. Лубнина, А.И. Николаева Изменения иммунофенотипического спектра и ферментного профиля лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ИНФЕКЦИОННЫХ
БОЛЕЗНЕЙ**

Г.И. Подопригора, Л.И. Кафарская, Н.А. Байнов, А.Н. Шкопоров Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты

Л.М. Самоходская, Е.Е. Старостина, Е.Б. Яровая, Т.Н. Краснова, Н.А. Мухин, В.А. Ткачук, В.А. Садовничий Математическая модель прогноза скорости фиброза печени у больных с хроническим гепатитом С на основе комбинаций геномных маркеров

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КАРДИОЛОГИИ
И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ**

Р.А. Мухамадияров, Н.В. Рутковская, О.Д. Сидорова, Л.С. Барбараш Исследование клеточного состава кальцинированных биопротезов клапанов сердца

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МИКРОБИОЛОГИИ

Л.М. Огородова, С.В. Федосенко, А.С. Попенко, В.А. Петров, А.В. Тяхт, И.В. Салтыкова, И.А. Деев, Е.С. Куликов, Н.А. Кириллова, В.М. Говорун, Е.С. Кострюкова Сравнительный анализ орофарингеальной микробиоты у больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой различной степени тяжести

А.В. Лазарева, О.А. Крыжановская, Ю.А. Бочарова, И.В. Чеботарь, Н.А. Маянский Распространенность металло-β-лактамаз и эффлюкс-механизмов у карбапенемрезистентных госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в г. Москве в 2012–2015 гг.

**OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY:
CURRENT ISSUES**

M.T. Lutsenko, I.A. Andriyevskaya Transamination In Syncytiotrophoblast of Placenta Villi in Parturient Women Suffered the Acute Form of CMV Infection at the Third Trimester of Gestation

BIOCHEMISTRY: CURRENT ISSUES

V.I. Sergienko, M.Sh. Khubutiya, A.K. Evseev, A.V. Pinchuk, M.S. Novruzbekov, K.N. Lutsyk, M.M. Goldin Diagnostic and Prognostic Possibilities of the Redox-Potential Electrochemical Measurements in Blood Plasma

IMMUNOLOGY: CURRENT ISSUES

L.M. Kurtasova, N.A. Shakina, T.V. Lubnina, A.I. Nikolaeva Changes of the Immunophenotypic Spectrum and the Enzymatic Profile of Peripheral Blood Lymphocytes in Infants with Hypertrophy of the Pharyngeal Tonsil

**INFECTIOUS DISEASES:
CURRENT ISSUES**

G.I. Podoprighora, L.I. Kafarskaya, N.A. Bainov, A.N. Shkoporov Bacterial Translocation from Intestine: Microbiological, Immunological and Pathophysiological Aspects

L.M. Samokhodskaya, E.E. Starostina, E.B. Yarovaya, T.N. Krasnova, N.A. Mukhin, V.A. Tkachuk, V.A. Sadovnichy Mathematic Model for Prediction of Liver Fibrosis Progression Rate in Patients with Chronic Hepatitis C Based on Combination of Genomic Markers

**CARDIOLOGY AND CARDIOVASCULAR SURGERY:
CURRENT ISSUES**

R.A. Mukhamadiyarov, N.V. Rutkovskaya, O.D. Sidorova, L.S. Barbarash Cellular Composition of Calcified Bioprosthetic Heart Valves

MICROBIOLOGY: CURRENT ISSUES

L.M. Ogorodova, S.V. Fedosenko, A.S. Popenko, V.A. Petrov, A.V. Tyakht, I.V. Saltykova, I.A. Deev, E.S. Kulikov, N.A. Kirillova, V.M. Govorun, E.S. Kostryukova Comparison Study of Oropharyngeal Microbiota in Case of Bronchial Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Different Severity Levels

A.V. Lazareva, O.A. Kryzhanovskaya, Yu.A. Bocharova, I.V. Chebotar', N.A. Mayanskiy The Prevalence of Metallo-β-Lactamases and Efflux-Mediated Mechanisms in Carbapenem Nonsusceptible Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in Moscow in 2012–2015

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ

Г.В. Какурина, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойизонов Компоненты системы деградации в прогрессии плоскоклеточных карцином головы и шеи

ONCOLOGY: CURRENT ISSUES

684 G.V. Kakurina, I.V. Kondakova, E.L. Choinzonov Degradome Components in Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПАТОФИЗИОЛОГИИ

Ю.А. Успенская, Ю.К. Комлева, Е.А. Пожиленкова, В.В. Салмин, О.Л. Лопатина, А.А. Фурсов, П.В. Лаврентьев, О.А. Белова, А.Б. Салмина Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления

PATHOPHYSIOLOGY: CURRENT ISSUES

694 Yu.A. Uspenskaya, Yu.K. Komleva, E.A. Pozhilenkova, V.V. Salmin, O.L. Lopatina, A.A. Fursov, P.V. Lavrentiev, O.A. Belova, A.B. Salmina Ligands of RAGE-Proteins: Role in Intercellular Communication and Pathogenesis of Inflammation

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПЕДИАТРИИ

Д.А. Морозов, О.Л. Морозова, А.А. Цыплаков, Ю.А. Мельникова Повреждение почек у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии

Р.Ш. Закиров, Е.Г. Сорокина, О.В. Карасёва, Ж.Б. Семёнова, С.В. Петричук, Л.М. Рошаль, В.Г. Пинелис Функциональное состояние митохондрий лимфоцитов периферической крови при черепно-мозговой травме у детей

PEDIATRICS: CURRENT ISSUES

704 D.A. Morozov, O.L. Morozova, A.A. Tsyplakov, Yu.A. Melnikova Kidney Injury in Newborns with Abdominal Compartment Syndrome

710 R.S. Zakirov, E.G. Sorokina, O.V. Karaseva, Zh.B. Semenova, S.V. Petrichuk, L.M. Roshal, V.G. Pinelis Peripheral Blood Lymphocytes Mitochondrial Function in Children with Traumatic Brain Injury

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ФИЗИОЛОГИИ

В.М. Смирнов, Д.С. Свешников, И.Л. Мясников, Т.Е. Кузнецова, Ю.Н. Самко Доказательства наличия серотонинергических нервных волокон, усиливающих сокращения двенадцатиперстной кишки

PHYSIOLOGY: CURRENT ISSUES

718 V.M. Smirnov, D.S. Sveshnikov, I.L. Myasnikov, T.E. Kuznetsova, Yu.N. Samko Evidences of Existence of Serotonergic Nerves, Enhancing Duodenal Motility

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭНДОКРИНОЛОГИИ

Т.И. Торховская, О.В. Белова, И.В. Зими́на, А.В. Крючкова, С.Н. Москвина, О.В. Быстрова, В.Я. Арион, В.И. Сергиенко Нейропептиды, цитокины и тимические пептиды как эффекторы взаимодействия тимуса и нейроэндокринной системы

ENDOCRINOLOGY: CURRENT ISSUES

727 T.I. Torkhovskaya, O.V. Belova, I.V. Zimina, A.V. Kryuchkova, S.N. Moskvina, O.V. Bystrova, V.Ya. Arion, V.I. Sergienko Neuropeptides, Cytokines and Thymus Peptides as Effectors of Interactions Between Thymus and Neuroendocrine System

ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Ю.И. Гайнуллина Оценка рациональности применения антибактериальных препаратов

Ф.Н. Бидарова Уничтожение фармацевтической продукции как элемент эффективности государственного контроля (надзора) за обращением лекарственных средств

М.А. Сновская, А.С. Батырова, Л.С. Намазова-Баранова, А.А. Алексеева, Е.А. Вишнёва, О.В. Кожевникова, А.А. Марушина, В.Н. Лубов О минимизации затрат на высокоэффективную диагностику аллергии у детей: анализ согласованности результатов аллергологического *in vitro*- и *in vivo*-обследования

PUBLIC HEALTH MANAGEMENT

734 Yu.I. Gaynullina Evaluation of Rational Use of Antibacterial Drugs

741 F.N. Bidarova The Destruction of Pharmaceutical Products as an Element of the Efficiency of State Control (Supervision) Over the Circulation of Medicines

748 M.A. Snovskaya, A.S. Batyrova, L.S. Namazova-Baranova, A.A. Alekseeva, E.A. Vishneva, O.V. Kozhevnikova, A.A. Marushina, V.N. Lubov About Minimization of Expenses on Allergy Diagnosis in Children: Analysis of Consistency of *in Vitro*- and *in Vivo*-Allergic Examinations Results

ЮБИЛЕИ

Николай Фёдорович Герасименко
Юрий Владимирович Лобзин

ANNIVERSARIES, CONGRATULATIONS

756 Nikolai Fedorovich Gerasimenko
758 Yuri Vladimirovich Lobzin

DOI: 10.15690/vramn561

М.Т. Луценко, И.А. Андриевская

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, Благовещенск, Российская Федерация

Трансаминирование в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты рожениц, перенесших обострение цитомегаловирусной инфекции в третьем триместре беременности

Цель исследования: установить закономерности нарушений трансаминирования в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты после перенесенного обострения цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) в третьем триместре беременности. **Методы:** обследовано 30 рожениц с обострением ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности. Гамма-глутамилтрансферазу в периферической крови определяли спектрофотометрическим методом, белок Hsp70 и каспаза-3 в гомогенате плаценты — серологическими методами, активность глутаматдегидрогеназы и пиридоксаль-5-фосфатдегидрогеназы на срезах плаценты — гистохимическим методом по З. Лойда, апоптотические изменения ядер синцитиотрофобласта — по ISEL-методу. **Результаты:** в периферической крови ЦМВ-серопозитивных рожениц выявлено снижение в 1,30 раза гамма-глутамилтрансферазы; гистохимически на срезах плаценты установлено снижение содержания продуктов реакции на пиридоксаль-5-фосфатдегидрогеназу в 2,14 раза, на глутаматдегидрогеназу — в 1,57; в гомогенате плаценты отмечалось увеличение содержания каспазы-3 в 2,8 и снижение белка Hsp70 в 2,6 раза; количество апоптотически измененных ядер в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты увеличилось в 4 раза. **Заключение:** обострение ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности приводит к нарушению обмена аминокислот в плаценте, что вызывает структурно-функциональные и метаболические перестройки и является одной из причин замедления роста и недостаточности развития плода.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, трансаминирование, синцитиотрофобласт.

(Для цитирования: Луценко М.Т., Андриевская И.А. Трансаминирование в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты рожениц, перенесших обострение цитомегаловирусной инфекции в третьем триместре беременности. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 621–626. Doi: 10.15690/vramn561)

621

Обоснование

В процессе жизнедеятельности клеток в большом количестве могут накапливаться аминокислоты, не задействованные в синтезе белков и других производных, что нарушает метаболизм клеток и в результате

избыточного накопления аминокислот (NH₂-группа) вызывает деструктивные процессы [1–3]. Это можно наблюдать в случае нарушения процесса трансаминирования — реакции переноса α-аминогруппы с аминокислоты на α-кетокислоту, в результате чего образуются новая кетокислота и новая аминокислота. Эти

М.Т. Lutsenko, I.A. Andriyevskaya

Far-Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, Russian Federation

Transamination In Syncytiotrophoblast of Placenta Villi in Parturient Women Suffered the Acute Form of CMV Infection at the Third Trimester of Gestation

Aim: to study the process of proteins transamination in syncytiotrophoblast of placenta villi of women who suffered the acute form of cytomegalovirus (CMV) infection during pregnancy. **Methods:** 30 pregnant women with CMV infection recurrence at the 25–28th week of pregnancy were examined. The activity of γ-glutamyltransferase in the peripheral blood of pregnant women was determined by spectrophotometry at the device «Stat-Fax-2100» (The USA). Hsp-70 and caspase-3 in placenta homogenate were found out with serological methods. The activity of glutamate dehydrogenase and pyridoxal-5-phosphatase was studied with histochemical method of Z. Loyd at the placenta slice of parturient women. The apoptotic changes in syncytiotrophoblast nuclei were defined by ISEL-method. **Results.** The peripheral blood of CMV-seropositive parturient women showed a reduction of γ-glutamyltransferase in 1.30 times. Histochemically we identified the reduction of reaction products' concentration in response to pyridoxal-5-phosphate by 2.14 times, to glutamate dehydrogenase by 1.57 times. At the same time there was an increase of caspase-3 in 2.8 times and reduction of Hsp70 in 2.6 times in placenta homogenate. The number of apoptotic changes in syncytiotrophoblast nuclei increased by 4 times. **Conclusion.** Worsening of CMV infection in the period 25–28 weeks of pregnancy leads to disruption of amino acid metabolism in the placenta, causing structural and functional and metabolic adjustment, and is one of the reasons for slow growth and lack of development of the fetus.

Key words: cytomegalovirus infection, transamination, syncytiotrophoblast.

(For citation: Lutsenko M.T., Andriyevskaya I.A. Transamination In Syncytiotrophoblast of Placenta Villi in Parturient Women Suffered the Acute Form of CMV Infection at the Third Trimester of Gestation. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 621–626. Doi: 10.15690/vramn561)

реакции катализируются трансаминазами. Коферментом трансаминаз является пиридоксаль-5-фосфат — промежуточный переносчик аминокислот от аминокислоты на кетокислоту [4–6]. Аминокислота с помощью трансаминазы присоединяется к пиридоксальфосфату аминной группой с тем, чтобы на втором этапе этого процесса передать ее на α -кетокислоту, в результате чего будет сформирована новая аминокислота. Наиболее часто в большом количестве находят глутаминовую α -аминокислоту [7].

В результате работы аминотрансфераз аминный азот аминокислот переходит в состав глутамата, поэтому в цитоплазме может накапливаться большое количество глутаминовой кислоты, что приводит к дестабилизации многих метаболических процессов в клетках. Однако значительная часть глутамата с помощью транслоказ попадает в митохондрии, где подвергается дезаминированию с помощью глутаматдегидрогеназы [8–10]. Вся эта цепь может нарушиться, если токсически действующие факторы будут подавлять активность трансаминаз и таких ферментов, как глутаматдегидрогеназа.

Цель исследования: установить закономерности нарушений трансаминирования в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты после перенесенного обострения итмега-ловиральной инфекции в третьем триместре беременности.

Методы

Дизайн исследования

В ретроспективное исследование были включены 55 рожениц на сроке беременности 37–38 нед и их новорожденные.

Критерии соответствия

Критерии включения в основную группу рожениц: лабораторно подтвержденное молекулярно-биологическими и серологическими методами исследования обострение цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) на сроке 25–28 нед беременности, наличие в периферической крови рожениц на момент исследования титра антител IgG к ЦМВ 1:1600, стойкая клиническая ремиссия герпесвирусной инфекции.

К критериям исключения относили первичную ЦМВИ, обострение других воспалительных заболеваний экстрагенитальной патологии и инфекций, передающихся половым путем.

Условия проведения

Исследование выполнено в лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких и акушерском отделении патологии беременности при ДНЦ ФПД, а также в гинекологическом отделении ГАУЗ АО «Благовещенская городская клиническая больница» (г. Благовещенск). Обследованы 55 рожениц и их 55 новорожденных, из них 30 ЦМВ-серопозитивных рожениц на сроке 37–38 нед беременности с обострением ЦМВИ на сроке 25–28 нед и титром иммуноглобулинов (Ig) класса G к ЦМВ на момент исследования 1:1600 (основная группа) и 25 ЦМВ-серонегативных рожениц на тех же сроках беременности (контрольная группа). Новорожденные от матерей основной и контрольной групп прошли соответствующую рандомизацию.

Продолжительность исследования

Работу проводили в период 2012–2014 гг.

Исходы исследования

Основной исход исследования: в качестве основного оцениваемого результата рассматривали процесс трансаминирования в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты от женщин с обострением ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности и титром антител IgG к ЦМВ на момент исследования 1:1600.

Дополнительный исход исследования: дана клиническая характеристика новорожденных от матерей с обострением ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности.

Методы регистрации исходов

У обследованных рожениц взятие крови проводили из локтевой вены в стандартные вакуумные пробирки с коагулянтом в количестве 5 мл для выполнения реакции с целью получения мононуклеарных клеток. Для серологических и спектрофотометрических методов исследования использовали кровь, не содержащую антикоагулянтов. Выделение мононуклеарных клеток крови для полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводилось с использованием раствора фиколл-урографина плотностью 1,077 г/мл (коммерческие наборы НПО «ДНК-технология», Россия). Серологические исследования проводили в парных сыворотках с интервалом 10–14 сут.

Активность гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом (коммерческие наборы «Диакон-ДС», Россия).

Определение типоспецифических антител классов IgG и IgM к ЦМВ, титра антител IgG к ЦМВ и индекса avidности антител IgG к ЦМВ проводили иммуноферментным методом (коммерческие наборы «Вектор-Бест», Россия); ДНК ЦМВ — методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе ДТ-96 (коммерческие наборы НПО «ДНК-технология», Россия).

Гомогенат плаценты для серологических исследований готовили по общепринятой методике [11].

Активность каспазы-3 и белок Hsp70 в гомогенате плаценты определяли иммуноферментным методом (коммерческие наборы Bender Med System, Австрия).

Гистохимические исследования в плаценте выполняли на срезах плаценты, приготовленных на замораживающем микротоме. Активность пиридоксаль-5-фосфатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы определяли по методу З. Лойда [12]. Содержание NH_2 -групп в синцитиотрофобласте выявляли на парафиновых срезах плаценты гистохимически по методу Ясума и Итчикава [13]. Препараты исследовали с помощью цифрового микроскопа MEIJI (Япония), связанного с компьютером по программе Scion (США). При определении плотности продуктов реакции постоянно сохранялся одинаковой величины зонд (0,1×0,1). Единица измерения — условная единица.

Морфологическую детекцию апоптоза проводили на парафиновых срезах плаценты по метке концевых фрагментов ДНК при помощи ISEL-метода.

Этическая экспертиза

Обследование проводили с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2008) и Правил клинической практики в Российской Федерации, утвержденных приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Работа одобрена комитетом по биомедицинской этике при ДНЦ ФПД (решение № 103 от 03.06.2015) в соответствии с принципами конвенции о биомедицине и правах человека, а также общепризнан-

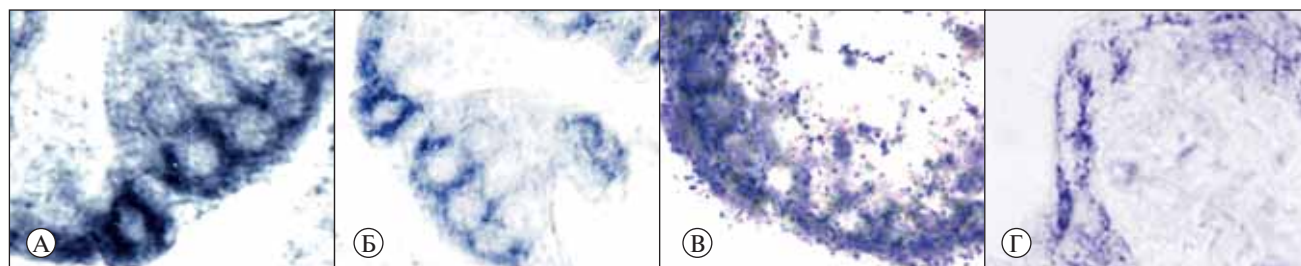


Рис. 1. Зрелая плацента, беременность 37 нед. Гистохимическая реакция по Лойда. $\times 400$

Примечание. А — высокая активность пиридоксаль-5-фосфатдегидрогеназы в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты (контрольная группа); Б — активность пиридоксаль-5-фосфатдегидрогеназы в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты снижена (ЦМВИ, обострение на сроке 26–27 нед беременности); В — высокая активность глутаматдегидрогеназы в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты (контрольная группа); Г — активность глутаматдегидрогеназы в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты снижена (ЦМВИ, обострение на сроке 26 нед беременности).

ными нормами международного права. Все женщины подписали письменное информированное согласие.

Статистический анализ

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v.6.0 (StatSoft Inc., США). Для определения достоверности различий использовали непарный параметрический критерий Стьюдента. Для определения достоверности различий в случае негауссовых распределений — непарметрические критерии Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни. Критический уровень значимости был принят за 5% ($p = 0,05$). Данные представлены как среднее арифметическое (M) $\pm$ стандартная ошибка среднего арифметического (m).

Результаты

Участники исследования

В основную группу вошли 30 ЦМВ-серопозитивных рожениц на сроке 37–38 нед беременности с обострением ЦМВИ на сроке 25–28 нед и титром антител IgG к ЦМВ на момент исследования 1:1600. Контрольную группу составили 25 ЦМВ-серонегативных рожениц. Новорожденные от матерей-участниц исследования отнесены к соответствующим группам.

Средний возраст рожениц основной группы составил $24,6 \pm 0,4$ года и значимо не отличался от контрольной группы — $23,7 \pm 0,3$ года ($p > 0,05$).

Основные результаты исследования

В ходе исследования установлено, что в группе серопозитивных рожениц с обострением ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности и титром антител IgG на момент исследования 1:1600 активность гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови достоверно снижалась до $23,2 \pm 0,38$ Е/л ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой ($30,0 \pm 0,25$ Е/л).

При морфологическом исследовании плаценты от женщин основной группы выявлено нарушение состояния процессов трансаминирования и окислительного дезаминирования L-глутаминовой кислоты, выраженное подавлением активности пиридоксаль-5-фосфатдегидрогеназы до $32,4 \pm 2,1$ усл. ед. (контрольная группа — $55,35 \pm 3,00$ усл. ед., $p < 0,001$; рис. 1 а, б) и глутаматдегидрогеназы до $39,70 \pm 1,90$ усл. ед. (контрольная группа — $62,5 \pm 2,3$ усл. ед., $p < 0,001$; рис. 1 в, г). Параллельно на тех же срезах плаценты в цитоплазме синцитиотрофобласта ворсинок определялась высокоактивная

реакция на NH_2 -группы по сравнению с контрольной группой (рис. 2 а, б).

При анализе содержания каспазы-3 и белка Hps70 в гомогенате плаценты от женщин основной группы выявлено изменение их показателей до $103,7 \pm 3,9$ (контрольная группа — $26,7 \pm 1,5$ нг/мл; $p < 0,01$) и $22,30 \pm 0,90$ нг/мл (контрольная группа — $56,10 \pm 0,60$ нг/мл; $p < 0,01$), соответственно.

При исследовании морфофункционального состояния плаценты в основной группе в большинстве ворсинок выявлялись признаки деструкции синцитиотрофобласта, которые выражались повышением количества апоптотически измененных ядер до $5,0 \pm 0,03\%$ (контрольная группа — $1,5 \pm 0,06\%$, $p < 0,01$; рис. 3) и появлением многочисленных крупных вакуолей в цитоплазме (рис. 4).

Следовательно, нарушение процессов трансаминирования и окислительного дезаминирования L-глутаминовой кислоты при обострении ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности приводит к изменению обмена аминокислот как в организме матери, так и в тканях плаценты. Вследствие этого нарушаются морфоструктура и функциональное состояние фетоплацентарного барьера, тормозятся рост и развитие плода.

Дополнительные результаты исследования

В основной группе 25 (82,9%) детей родились в удовлетворительном состоянии с оценкой по шкале Аргар 7–10 баллов, в состоянии асфиксии средней степени

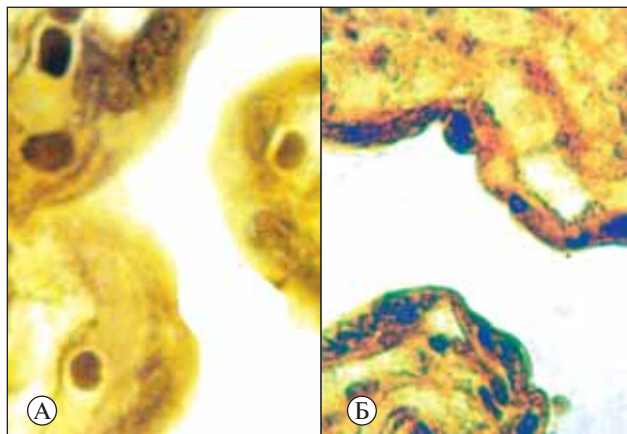


Рис. 2. Зрелая плацента, беременность 37 нед. Гистохимическая реакция по Ясума и Итчикава. $\times 1000$

Примечание. А — в синцитиотрофобласте ворсинок слабая реакция на NH_2 -группы (контрольная группа); Б — в синцитиотрофобласте ворсинок содержится большое количество NH_2 -групп (ЦМВИ, обострение на сроке 26–27 нед беременности).

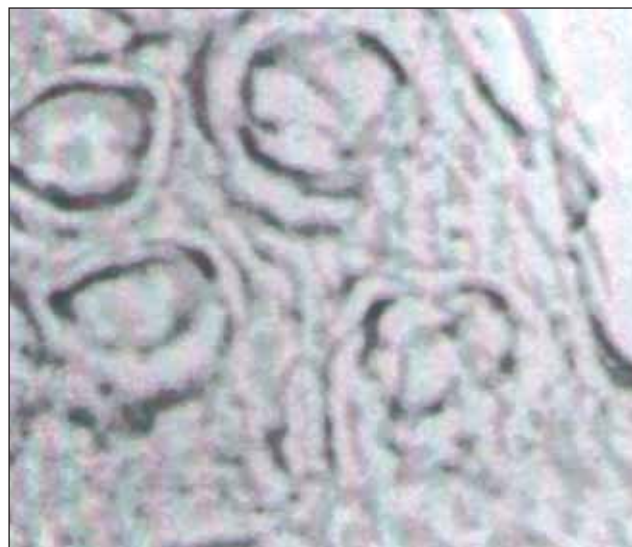


Рис. 3. Зрелая плацента, беременность 37 нед (ЦМВИ, обострение на сроке 26–27 нед беременности)

Примечание. В синцитиотрофобласте ворсинок большое количество апоптотически измененных ядер. Иммуногистохимическая реакция по ISEL-методу. $\times 1000$.

624

родилось 5 (17,1%). У всех детей, родившихся в асфиксии средней степени, на 5-й мин оценка по шкале Аргар была выше по сравнению с оценкой на 1-й мин. Средняя оценка новорожденных основной группы по шкале Аргар на 1-й мин составила $7,29 \pm 0,11$ баллов, в контрольной — $7,52 \pm 0,10$ ($p < 0,05$). Через 5 мин оценка новорожденных по шкале Аргар составила $8,05 \pm 0,15$ и $8,41 \pm 0,14$ баллов в группах, соответственно ($p < 0,05$).

Средний показатель массы тела новорожденных основной группы составил $3233,0 \pm 17,8$ г, что достоверно не отличалось от контрольной группы — $3355,0 \pm 18,2$ г ($p > 0,05$). В основной группе родились двое недоношенных детей с массой тела до 2000 г и 3 недоношенных весом 2000–2499 г. Пятеро (16,4%) детей основной группы имели массу тела 2500–2999 г, низкую массу тела при рождении — 3 (8,6%); гипотрофия новорожденного I сте-

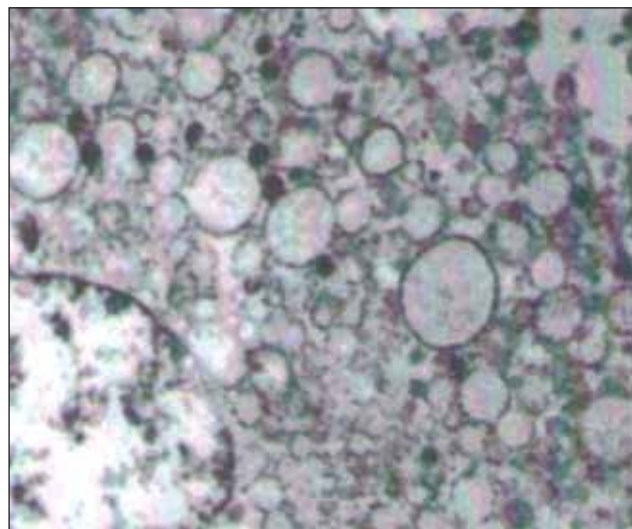


Рис. 4. Зрелая плацента, беременность 37 нед (ЦМВИ, обострение на сроке 26–27 нед беременности)

Примечание. В цитоплазме синцитиотрофобласта ворсинок большое количество крупных вакуолей, формируемых на фоне низкого содержания белка Hps70. Электронная микроскопия. $\times 12\,000$.

пени диагностирована у 3 (9,2%) ($p < 0,01$). В контрольной группе только 1 (3,0%) ребенок имел низкую массу тела ($p < 0,01$).

В раннем неонатальном периоде частота заболеваний новорожденных в основной группе составила 90,1%. В структуре преобладали инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода, в том числе везикулез (у 4), конъюнктивит (у 3), пиодермия новорожденного (у 2). Не выявлено ни одного случая врожденной ЦМВИ у детей. Нарушения церебрального статуса новорожденного в основной группе проявились перивентрикулярными кистами (у 10), ишемией мозга (у 8), расширением боковых желудочков (у 7). Дыхательные расстройства новорожденного диагностированы у 5 недоношенных детей, а также у 4, родившихся в умеренной асфиксии, и у 2 с аспирационным синдромом при многоводии у матери. Замедленный рост и недостаточность питания плода отмечались только у новорожденных основной группы.

Обсуждение

Реакция трансаминирования играет большую роль в обмене аминокислот. Ферменты аминотрансферазы функционируют как в процессах катаболизма, так и биосинтеза аминокислот. Трансаминирование — заключительный этап синтеза заменимых аминокислот из соответствующих α -кетокислот, если они в данный момент необходимы клеткам.

Первая стадия этого процесса завершается присоединением аминогруппы от первого субстрата аминокислоты. На второй стадии пиридоксаминофосфат соединяется с кетокислотой и передает аминогруппу на кетокислоту, образуя новую аминокислоту, если она необходима клетке в данный момент. В реакции трансаминирования образуется глутаминовая кислота, которая затем подвергается непосредственному окислительному дезаминированию под действием глутаматдегидрогеназы [14].

В случае снижения активности глутаматдегидрогеназы в тканях накапливается значительное количество L-глутаминовых аминокислот, в том числе глутамата, которые токсически действуют на метаболизм органа. В настоящее время в зарубежной литературе накопилось достаточно убедительных сведений, что при нарушении активности гамма-глутамилтрансферазы и глутаматдегидрогеназы развиваются кардиоваскулярные [15–17] и печеночные расстройства [18–20]. Большой интерес вызывает характер процессов трансаминирования в плаценте в период гестации, поскольку нарушение дезаминирования будет затрагивать не только метаболические процессы в синцитиотрофобласте, но и оказывать влияние на развитие плода. Работ, освещающих данные вопросы, в настоящее время в литературе не найдено. Наше внимание привлекли случаи обострения ЦМВИ в период гестации, поскольку цитомегаловирус, проникая через фетоплацентарный барьер, подавляя процессы трансаминирования, может обуславливать серьезные нарушения в метаболизме тканей развивающегося плода.

Наши исследования показали, что обострение ЦМВИ на сроке гестации 25–28 нед приводит к нарушению трансаминирования и окислительного дезаминирования L-глутаминовой кислоты в плаценте беременной женщины. Это может быть связано с цитотоксическим действием белков тегмента ЦМВ на белоксинтетическую функцию плаценты, в том числе и на активность пиридоксаль-5-фосфатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы.

Формируемое при обострении ЦМВИ снижение активности пиридоксаль-5-фосфатдегидрогеназы в цитоплазме синцитиотрофобласта нарушает процесс переноса NH_2 -групп на α -кетокислоты, что изменяет образование новых L-аминокислот. Кроме того, на нарушение метаболизма аминокислот в плаценте указывает уменьшение активности глутаматдегидрогеназы, обеспечивающей деаминацию глутамата как в цитоплазме, так и в митохондриях синцитиотрофобласта.

Следовательно, обострение ЦМВИ на сроке 25–28 нед беременности является фактором, провоцирующим накопление в цитоплазме синцитиотрофобласта большого количества L-глутаминовых аминокислот, в том числе глутамата, что нарушает метаболизм и вызывает дезорганизацию структур фетоплацентарного барьера.

Дополнительным маркером дезорганизации цитоплазмы синцитиотрофобласта при обострении ЦМВИ может стать белок Hsp70. Снижение его содержания в плаценте вызывает нарушение конформации и нативных свойств белков цитоплазмы синцитиотрофобласта, что проявляется усилением его вакуолизации. Следует указать и на то, что при обострении ЦМВИ в плаценте повышается проапоптотическая активность каспазы-3, индуцирующая апоптотические изменения ядер.

Таким образом, в результате исследования установлена роль ЦМВИ в нарушении обмена аминокислот, что вызывает структурно-функциональные и метаболические изменения в плаценте. Следствием этого является замедление роста и недостаточности развития плода, отмечаемые у новорожденных от матерей с обострением ЦМВИ.

Заключение

Обострение ЦМВИ на сроке 25–28 нед гестации оказывает повреждающее действие на структуру и ферментативные свойства синцитиотрофобласта ворсинок плаценты. Снижение активности пиридоксаль-5-

фосфатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы вызывает нарушение формирования новых аминокислот и накопление в цитоплазме и митохондриях глутамата, что усиливает токсическое действие антигенов ЦМВ на ферментативные системы синцитиотрофобласта. Наблюдаемое при этом уменьшение содержания белка Hsp70 в плаценте вызывает изменение конформационных процессов при формировании белков цитоплазмы, способствуя ее деструкции. При этом инициация каспазы-3 приводит к изменению структуры ДНК ядер синцитиотрофобласта, что в свою очередь нарушает белоксинтетическую функцию плаценты.

Таким образом, структурно-функциональные и ферментативные нарушения процессов трансаминирования и окислительного деаминарования в синцитиотрофобласте ворсинок плаценты, формируемые под влиянием ЦМВИ, вызывают замедление роста и недостаточность развития плода, что в антенатальном периоде проявляется снижением адаптивных возможностей у новорожденного.

Источник финансирования

Исследование выполнено в рамках НИР 059: «Механизмы повреждающего действия цитомегаловирусной инфекции на ключевые этапы органогенеза плода и морфофункциональное состояние фетоплацентарного комплекса на различных этапах гестации», финансирование за счет средств Федерального агентства научных организаций.

Конфликт интересов

Авторы рукописи декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- Kelly A, Stanley C. Disorders of glutamate metabolism. *Men Retard Dev Disabl Res Rev.* 2011;7:287–295. doi: 10.1002/mrdd.1040
- Комов ВП, Шведова ВН. Биохимия. М.: Дрофа. 2004. 640 с.
- Whitfield J. Gamma glutamyltransferase. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2001;38:263–355. doi: 10.1080/20014091084227
- Браунштейн АЕ, Шемякин ММ. Теория процессов аминокислотного обмена, катализируемых пиридоксальными ферментами. М., 1953. 393 с.
- Filipowicz A, Wolowicz S. Bioconjugates of PAMAM dendrimers with trans retinal pyridoxal and pyridoxal phosphate. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4819–4828. doi: 10.2147/IJN.S34175
- Nichols TW, Gaiteri C. Mortons foot and pyridoxal-5 phosphate deficiency: denetically linked traits. *Med Hypotheses.* 2014;83(6):644–648. doi: 10.1016/j.mehy.2014.09.003
- Stumvoll M, Perriell G, Meyer C. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissue. *Kidney Int.* 1999;55:778–792. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.055003778.x
- Sookolan S, Pirola C. Alanine and aspartate aminotransferase and glutamine cycling pathway: Their roles in pathogenesis of metabolic syndrome. *World J Gastroenterol.* 2012;78(29):3779–3781. doi: 10.3748/wjg.v18.i29.3775
- Strasak A, Kelleher C, Klenk J. Longitudinal change in serum gamma glutamyltransferase and cardiovascular disease mortality: a prospective population based study in 76,113 Austrian adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1857–1865. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.170597
- Trebery J, Banh S, Weihrauch D. Intertissue differences for the role of glutamate-gehydrogenas in metabolism. *Neurochem Res.* 2014;3(3):516–526. doi: 10.1007/s11064-013-0998-z
- Луценко МТ, Андриевская ИА, Дорофиевко НН. Оценка роли белка Hsp70 в синцитиотрофобласте плаценты при обострении герпес-вирусной инфекции в период гестации. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2011;39:13–16.
- Лойда З, Гроссрау Р, Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М. 1962. 270 с.
- Пирс Э. Гистохимия. М.: Изд-во иностранной литературы. 1962. 944 с.
- Ananieva EA, Patel C, Drake C, Powell JD. Cytosolic branched chain aminotransferase regulates mTorC1 signaling and glycolytic metabolism in CD4+T-cell. *J Biol Chem.* 2014;289(27):18793–18804. doi: 10.1074/jbc.M114.554113
- Emdin M, Passoino C, Michelassi C, Donato L. Association between gamma-glutamyltransferase in coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2009;136:80–85. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.04.030
- Lee DH, Silventoinen K, Hu G. Serum gamma glutamyltransferase predicts non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease among 28,838 middle aged men and women. *Eur Heart J.* 2006;27:2170–2176. doi: 10.1093/eurheartj/ehl086

17. Ruttman E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H. Gamma glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation*. 2005;112:2130–2137. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.552547
18. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith G. Gamma glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2729–2735. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.152298
19. Brosnan M, Brosnan J. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *Amer Clin Nutr*. 2009;90:857–861. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462Z
20. Hermanussen M, Tresguerres J. Does the thrifty phenotype result from chronic glutamate intoxication. *J Perinatal Med*. 2003;31:311–326.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Луценко Михаил Тимофеевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов при неспецифических заболеваниях легких ДНЦ ФПД

Адрес: 675000, Благовещенск, ул. Калинина, д. 22, **тел.:** +7 (4162) 77-28-15, **e-mail:** lucenkomt@mail.ru

Андриевская Ирина Анатольевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов при неспецифических заболеваниях легких ДНЦ ФПД

Адрес: 675000, Благовещенск, ул. Калинина, д. 22, **тел.:** +7 (4162) 77-28-16, **e-mail:** irina-andrievskaja@rambler.ru

DOI: 10.15690/vramn572

В.И. Сергиенко¹, М.Ш. Хубутия², А.К. Евсеев³, А.В. Пинчук²,
М.С. Новрузбеков², К.Н. Луцык², М.М. Гольдин²

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА, Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Российская Федерация

³ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация

Диагностические и прогностические возможности электрохимических измерений редокс-потенциала плазмы крови

Цель исследования: определение операционных характеристик теста на основе мониторинга величин редокс-потенциала плазмы крови пациентов с различными патологическими состояниями, сопровождающимися нарушениями кислородного обмена в процессе лечения; расширение спектра параметров разработанного нами метода исследования редокс-потенциала плазмы крови. **Методы:** обследованы группы практически здоровых добровольцев ($n=63$) и пациентов со следующими патологиями: с трансплантацией почки ($n=59$), печени ($n=64$) и легкого ($n=7$). Измерения редокс-потенциала проводили на платиновом микроэлектроде относительно насыщенного хлорсеребряного электрода сравнения. Потенциостат IPC-Pro L (НПФ «Вольта») был использован для записи зависимостей потенциала от времени. Время регистрации составляло 15 мин. **Результаты:** обнаружены статистически достоверные различия в диапазонах величин редокс-потенциалов, совпадающих с величинами, находящимися в пределах доверительного интервала редокс-потенциалов практически здоровых людей, составила 12% для пациентов с трансплантированной почкой и 10% для пациентов с трансплантированной печенью. Обнаружено существенное различие в характере изменений величин редокс-потенциала плазмы крови при мониторинге подгрупп пациентов с наличием и отсутствием осложнений после трансплантации печени. Найдено, что чувствительность электрохимического метода определения величин редокс-потенциала плазмы крови составила 85,7%, специфичность — 69,8%, точность — 85,2%. **Заключение:** обнаружены диапазоны величин редокс-потенциала плазмы крови, характерные для различных патологических состояний; установлена связь эффекта проводимого лечения с количественными изменениями величин редокс-потенциала плазмы крови пациента; предложен критерий для раннего прогнозирования осложнений у пациентов с трансплантированной печенью на основе мониторинга редокс-потенциала в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: редокс-потенциал, плазма крови, диагностика, трансплантация, орган.

(Для цитирования: Сергиенко В.И., Хубутия М.Ш., Евсеев А.К., Пинчук А.В., Новрузбеков М.С., Луцык К.Н., Гольдин М.М. Диагностические и прогностические возможности электрохимических измерений редокс-потенциала плазмы крови. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 627–632. Doi: 10.15690/vramn572)

627

V.I. Sergienko¹, M.Sh. Khubutiya², A.K. Evseev³, A.V. Pinchuk²,
M.S. Novruzbekov², K.N. Lutsyk², M.M. Goldin²

¹ Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

² N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russian Federation

³ D. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation

Diagnostic and Prognostic Possibilities of the Redox-Potential Electrochemical Measurements in Blood Plasma

Aims: Determination of operating characteristics of the test based on blood plasma redox potential monitoring in patients with different pathological conditions associated with impaired oxygen metabolism during treatment in postoperative period and expanding the range of parameters of the developed method of investigation of blood plasma redox potential. **Methods:** It were examined healthy volunteers group as following group ($n=63$), groups of patients with transplanted liver ($n=64$), kidney ($n=59$), and lungs ($n=7$). Redox potential measurements were done by platinum electrode, reference electrode was silver-chlorine one. Potentiostat IPC-ProL was used to register and record a dependence redox potential via time. Time of measurement was 15 min. **Results:** statistically significant differences of redox potentials ranges was found in healthy volunteers and patients with transplanted kidney and liver. Ratio of measured redox potentials coincident with the values within the confidence interval in healthy volunteers was 12% in patients with transplanted kidney and 10% in patients with transplanted liver. We observed significant differences in the nature of changes of blood plasma's redox potential values in course of monitoring of subgroups of patients with and without complications after liver transplantation. It was found that sensitivity of electrochemical method was 85%, selectivity — 69,8%, precision — 85,2%. **Conclusion:** we discovered value ranges of blood plasma redox potential typical for different pathological states; we detected an interaction between the effect of treatment and quantitative changes in the values of the blood plasma redox potentials; criterion for early prediction of complications in patients with transplanted liver was proposed basing on redox potential monitoring during postoperative period.

Key words: redox-potential, blood plasma, diagnosis, transplantation, organ.

(For citation: Sergienko V.I., Khubutiya M.Sh., Evseev A.K., Pinchuk A.V., Novruzbekov M.S., Lutsyk K.N., Goldin M.M. Diagnostic and Prognostic Possibilities of the Redox-Potential Electrochemical Measurements in Blood Plasma. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 627–632. Doi: 10.15690/vramn572)

Обоснование

Причиной нарастающего интереса к измерениям редокс-потенциалов (РП) биологических сред является стремление получить количественную информацию об окислительно-восстановительных процессах, протекающих в организме. В настоящее время величины РП в биологических средах, как правило, измеряют электрохимическими методами [1–3], в качестве электродных материалов используют платину [1, 2] и золото [3].

С электрохимических позиций корректнее называть РП биологической среды потенциалом при разомкнутой цепи индифферентного электрода (платинового или золотого), погруженного в исследуемую среду. Термин «редокс-потенциал» использован в настоящей работе, поскольку он прочно укоренился в медицинской и биологической литературе. Однако следует иметь в виду, что определение «редокс-потенциал» применимо лишь к обратимым окислительно-восстановительным системам. Согласно уравнению Нернста (1), величина РП в растворах электролитов отражает соотношение концентраций окисленной и восстановленной формы вещества в растворе и не зависит от природы материала электрода:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (1).$$

Биологические среды нельзя отнести к окислительно-восстановительным системам. Они, согласно терминологии Michaelis [4], являются «слабыми» окислительно-восстановительными системами, потенциал при разомкнутой цепи в них зависит от природы измеряющего электрода. Необходимо подчеркнуть, что из-за сложности состава биологических систем период установления практически постоянного значения потенциала может быть довольно длительным, что, как показано в работе L.T. Rael и соавт. [5], сказывается на времени измерений потенциала.

Важно также учитывать взаимодействие платины с растворенным в биологических средах кислородом, поскольку давно известно, что на платине в результате ее контакта с кислородом образуются окисные слои и пленки [6], что служит причиной смещения потенциала платинового электрода. Однако проведение измерений РП в деоксигенированных растворах является принципиально непригодным для измерений в биологических средах [4], поскольку именно кислород обуславливает протекание окислительных процессов в организме. Таким образом, удаление кислорода из тестируемой биологической системы должно приводить к искажению измеряемых величин, соответствующих физиологическому статусу биологического объекта.

Несмотря на ряд трудностей в реализации надежных измерений РП, использование этой величины в качестве маркера патологических состояний организма представляется весьма перспективным, особенно учитывая, что многие процессы гомеостаза являются электрохимическими [7], а также если иметь в виду окислительно-восстановительную гомеостатическую систему.

Важным этапом в развитии измерений РП в плазме или сыворотке крови стало создание унифицированного электрохимического метода предварительной обработки поверхности платинового электрода, способного стандартизовать состояние поверхности электрода, и таким образом получать воспроизводимые результаты измерений в водных и биологических средах [2].

Величина РП плазмы крови — интегральный показатель процессов, протекающих в организме [8]. Уста-

новлено, что смещение величины РП в положительную область свидетельствует о накоплении в организме кислорода и прооксидантов [9], тогда как смещение величины РП в отрицательную область — об увеличении уровня антиоксидантов [10]. Таким образом, имеется возможность интерпретировать изменения в состоянии пациентов в зависимости от направления сдвигов величин РП и прогнозировать наступление патологического состояния у пациента, например состояния окислительного стресса [11].

Анализ диапазонов величин РП плазмы крови, характерных для различных патологических состояний, требует установления области РП практически здоровых людей. Однако несовершенные методы измерения РП, с помощью которых проведены эти расчеты, не позволяют использовать указанную величину и требуют проведения рандомизированных исследований диапазона величин РП практически здоровых людей современным стандартизованным методом [2].

Ранее нами был получен обширный массив данных при исследовании групп пациентов с трансплантированными органами с помощью метода измерений величин РП в раннем послеоперационном периоде [12]. Однако вне поля зрения указанной работы остались важные вопросы, связанные со статистической оценкой эффективности метода измерения РП и выявлением особенностей использования предложенного прогностического критерия ранней диагностики осложнений у пациентов с трансплантированной печенью.

Целью настоящей работы было определение операционных характеристик теста на основе мониторинга величин РП плазмы крови пациентов с различными патологическими состояниями, сопровождающимися нарушениями кислородного обмена в процессе лечения, и расширение спектра параметров разработанного нами метода исследования РП плазмы крови.

Методы

Дизайн исследования

Исследование случай-контроль.

Условия проведения

Цельную кровь получали у практически здоровых добровольцев ($n = 63$) и пациентов различного профиля ($n = 130$) венопункцией с использованием вакуумной системы проботобора в пробирки LH (Beckman Coulter, США) для получения плазмы. Плазму крови получали центрифугированием цельной крови в течение 15 мин при 1500 g на центрифуге 3,12 CR (Jouan, Франция). Объем образцов для исследования составлял 2 мл.

В группах пациентов с трансплантированными органами исследовали находящихся в раннем послеоперационном периоде (20–35 дней). Для проведения операций трансплантации использовали стандартные методики [13–15]. Кровь указанных групп пациентов для мониторинга величин РП забирали ежедневно.

Продолжительность исследования

Работа проводилась в течение 2010–2014 гг. на базе ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

Исходы исследования

В ходе исследования оценивали величину РП у различных групп пациентов с целью обнаружить корре-

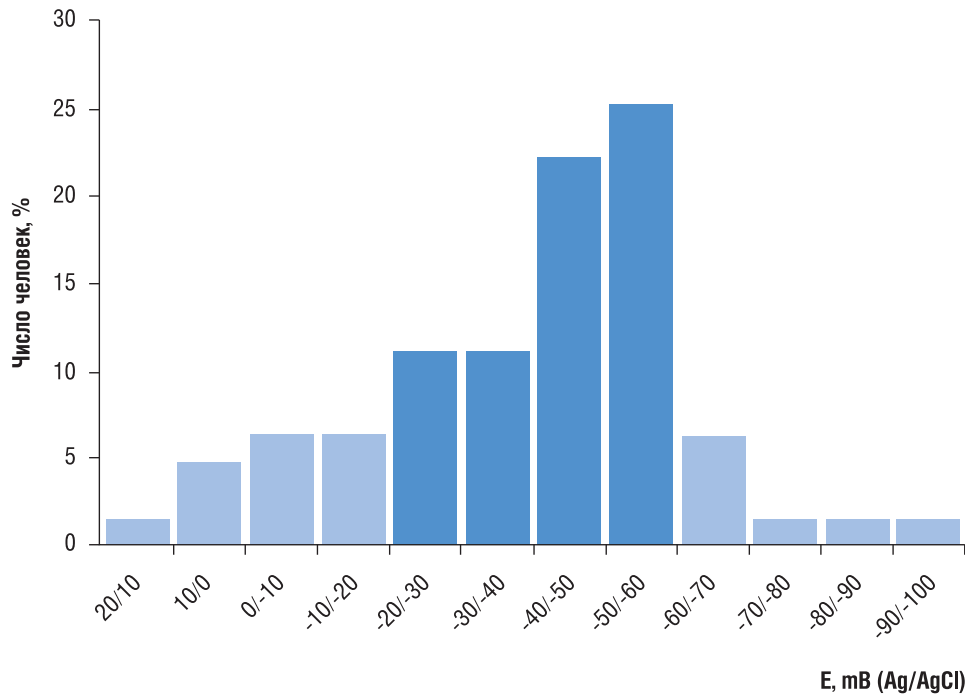


Рис. 1. Распределение величины редокс-потенциалов (РП) платинового электрода в сыворотке крови практически здоровых людей (n=63)

629

ляцию указанной величины с этиологией заболевания. На основании сопоставления измеренных величин РП с клинико-лабораторными показателями предложены диагностические и прогностические критерии выявления осложнений в раннем послеоперационном периоде.

Методы регистрации исходов

Измерения потенциалов в биологических жидкостях проводили на платиновом микроэлектроде относительно насыщенного хлорсеребряного электрода сравнения. Потенциостат IPC-Pro L (НПФ «Вольта») был использован для записи зависимостей потенциала от времени. Время регистрации составляло 15 мин. Перед каждым измерением электрод подвергался предварительной электрохимической обработке, описанной М.Ш. Хубутия [2].

Состояние трансплантата в раннем послеоперационном периоде оценивали на основании клинических наблюдений с использованием широкого спектра лабораторных данных, а также ультразвуковой диагностики и пункционной биопсии трансплантата.

Статистический анализ

Для контрольной (практически здоровые люди) и каждой из групп пациентов был рассчитан среднее значение ($\bar{x}$) и стандартное отклонение (s). Данные представлены в виде $\bar{x} \pm s$.

Данные о чувствительности (Se), специфичности (Sp), точности (Ac), а также прогностической ценности положительного (+PV) и отрицательного (-PV) результата теста были получены с помощью обработки четырехпольной таблицы [16]:

$$Se = \frac{a}{a+c} \quad (2);$$

$$Sp = \frac{d}{b+d} \quad (3);$$

$$Ac = \frac{a+d}{a+b+c+d} \quad (4);$$

$$+PV = \frac{a}{a+b} \quad (5);$$

$$-PV = \frac{d}{c+d} \quad (6).$$

Тест	Болезнь	
	Присутствует	Отсутствует
Положительный	a	b
Отрицательный	c	d

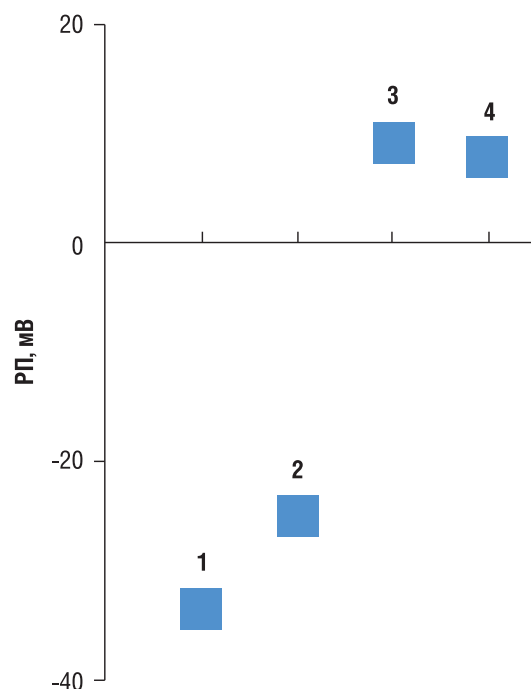


Рис. 2. Зависимость средней величины редокс-потенциалов (РП) сыворотки крови от патологии

Примечание. 1 — практически здоровые люди (n=63), 2 — пациенты с трансплантированными легкими (n=7), 3 — пациенты с трансплантированной печенью (n=64), 4 — пациенты с трансплантированной почкой (n=59).

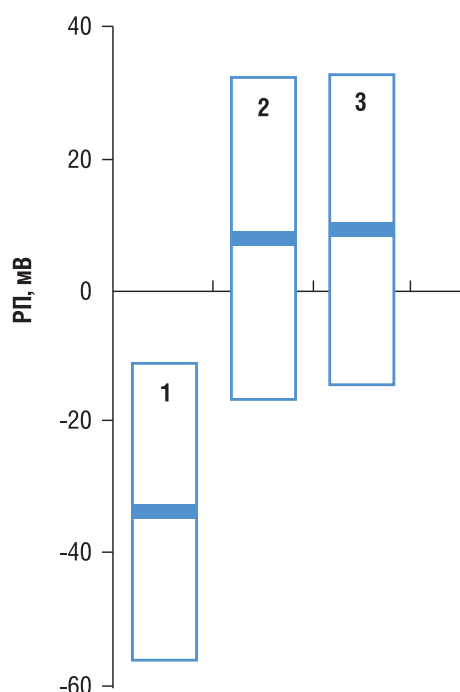


Рис. 3. Доверительные интервалы для групп практически здоровых людей (1) и пациентов с трансплантированной почкой (2) и печенью (3)

Примечание. РП — редокс-потенциал.

Результаты

Участники исследования

Поскольку настоящая работа является продолжением исследований, представленных М.М. Goldin и соавт. [12], была использована та же база данных: практически здоровые добровольцы в возрасте 19–40 лет ($n = 63$; 46 мужчин, 17 женщин) и пациенты различного профиля ($n = 130$), которые были разбиты на группы по следующим патологиям: с трансплантацией почки ($n = 59$, число исследований 967), с трансплантацией печени ($n = 64$; 615), с трансплантацией легкого ($n = 7$; 143).

Основные результаты исследования

Распределение величины РП платинового электрода в сыворотке крови практически здоровых людей ($n = 63$) представлено на рис. 1. Зависимость средней величины РП платинового электрода в сыворотке крови практически здоровых людей и пациентов с трансплантированными органами (почка, печень, легкие) — на рис. 2. Доверительные интервалы величин РП для практически здоровых людей и групп пациентов с трансплантированной печенью и почкой представлены на рис. 3. Зависимость динамики изменения средних значений РП при отсутствии ($n = 30$) и наличии ($n = 34$) осложнений в раннем послеоперационном периоде у пациентов после трансплантации печени проиллюстрирована на рис. 4.

Обсуждение

Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют, что 75% практически здоровых обследованных добровольцев входят в предложенный ранее для этой группы диапазон величин РП (от -20 до -60 мВ). Полученные результаты позволили предположить, что добровольцы с диапазонами величин РП отрицательнее (см рис. 1, левее) или положительнее (см рис. 1, правее) указанной статистически достоверной группы практически здоровых людей, вероятно, не являются абсолютно здоровыми. Возможно, что эти группы добровольцев составляют люди с невыявленными заболеваниями.

Представленные на рис. 2 данные свидетельствуют о корреляции между окислительно-восстановительной системой гомеостаза и различными состояниями организма. Например, состояние пациентов с трансплантированными легкими сопровождается недостаточностью функции усвоения кислорода, что приводит к снижению окислительных функций организма. Величины РП у исследованных нами групп пациентов смещены в положительную область относительно группы здоровых (см. рис. 2). Найденные величины смещения величин РП в положительную область потенциалов свидетельствуют о торможении антиоксидантной активности у этих групп

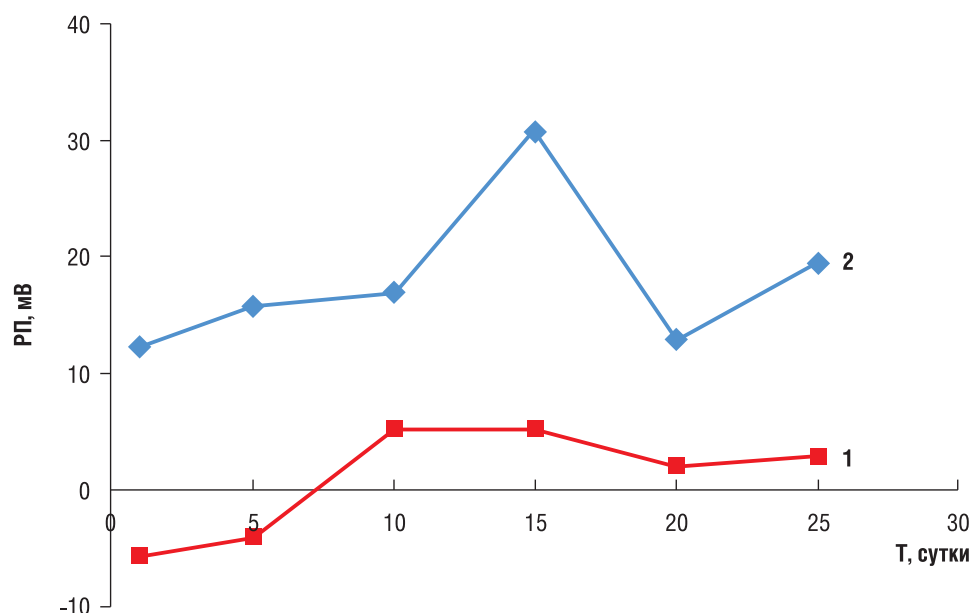


Рис. 4. Зависимость динамики изменения средних значений редокс-потенциалов (РП) при отсутствии ($n = 30$, кривая 1) и наличии ($n = 34$, кривая 2) осложнений в раннем послеоперационном периоде у пациентов после трансплантации (Т) печени

пациентов и, соответственно, об увеличении скорости окислительных процессов в организме, что сигнализирует об опасности перехода пациента к состоянию окислительного стресса. Исходя из этих данных, можно предположить, что группы пациентов с трансплантированными почкой и печенью являются наиболее уязвимыми для окислительного стресса. Ранее подобное предложение об использовании величин РП для прогнозирования окислительного стресса у пациентов с тяжелой травмой было сделано D. Bar-Or с соавт. [11].

Статистическая достоверность полученных величин доверительных интервалов иллюстрируется данными, представленными на рис. 3. Доля измеренных величин РП, совпадающих с величинами, находящимися в пределах доверительного интервала РП практически здоровых людей, составила 12% для пациентов с трансплантированной почкой и 10% для пациентов с трансплантированной печенью.

Весьма важные выводы можно сделать при сравнении динамики изменения величины РП в процессе мониторинга двух подгрупп пациентов с трансплантированной печенью, постоперационное лечение которых протекало с отсутствием (см. рис. 4, кривая 1) или при наличии осложнений (см. рис. 4, кривая 2), выраженных дисфункциями трансплантированного органа. На рис. 4 прослеживается четкое различие измеряемых величин РП с первых суток мониторинга. Разница в значениях РП в первые же сутки после операции составляет более 15 мВ, но может достигать 30 мВ, однако в процессе лечения она остается на уровне не менее 10 мВ. Эти результаты позволяют использовать величину РП и динамику ее изменения в качестве прогностического критерия для выявления вероятности возникновения осложнений у пациентов с трансплантированной печенью. Аналогичные результаты получены для пациентов с трансплантированной почкой. Разница состоит в том, что прогноз высокой вероятности осложнений можно сделать лишь на 5-е сут мониторинга РП после операции трансплантации почки.

В данном исследовании были выбраны группы здоровых и больных пациентов, что позволило рассчитать чувствительность, специфичность и точность использованного нами метода определения РП сыворотки крови:

Тест	Болезнь	
	Присутствует	Отсутствует
Положительный	1479	19
Отрицательный	246	44

$$Se = \frac{1479}{1479+246} = 85,7\%;$$

$$Sp = \frac{44}{44+19} = 69,8\%;$$

$$Ac = \frac{1479+44}{1479+19+246+44} = 85,2\%;$$

$$+PV = \frac{1479}{1479+19} = 98,7\%;$$

$$-PV = \frac{44}{246 + 44} = 15,2\%.$$

Заключение

1. С помощью исследования величин РП сыворотки крови группы из 63 практически здоровых добровольцев определены границы области значений потенциалов здоровых лиц от -20 до -60 мВ.

2. Обнаружено, что различным патологическим состояниям соответствуют разные области РП плазмы крови пациентов, причем средние значения РП исследованных групп пациентов различаются более чем на 40 мВ.

3. Предложено использовать величины РП более +10 мВ в течение первых суток после трансплантации печени в качестве прогностического критерия выявления осложнений в течении постоперационного периода, тогда как при РП не более -5 мВ можно с вероятностью 98,7% прогнозировать благоприятный исход течения послеоперационного периода.

Источник финансирования

Исследование выполнено на базе Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-29-00194).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- Rael LR, Bar-Or R, Aumann RM, Slone DS, Mains CW, Bar-Or D. Oxidation-reduction potential and paraoxonase arylesterase activity in trauma patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361(2):561–565. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.078
- Хубутия МШ, Евсеев АК, Колесников ВА, Гольдин ММ, Давыдов АД, Волков АГ, Степанов АА. Измерения потенциала платинового электрода в крови, плазме и сыворотке крови. *Электрохимия*. 2010;46(5):569–573.
- White NJ, Collinson MM, Boe RA, Ward KR. Redox monitoring reveals increased susceptibility of whole blood to oxidative stress during hemorrhagic shock. *Circulation*. 2008;118:1488.
- Michaelis L. Oxidation reduction potentials. *London: J. B. Lippincott Company*. 1930. 199 p.
- Rael LT, Bar-Or R, Salottolo K, Mains CW, Bar-Or D. Injury severity and serum amyloid A correlate with plasma oxidation-reduction potential in multi trauma patients: a retrospective analysis. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2009;17:57. doi: 10.1186/1757-7241-17-57
- Frumkin AN. Points of zero charge in equations of electrochemical kinetics. *J Electroanal Chem*. 1965; 9: 173–83. doi: 10.1016/0022-0728(65)80014-6
- Bartlett PN. Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications. *Chichester: John Wiley & Sons*. 2008. 494 p. doi: 10.1002/9780470753842
- Khubutiya MSh, Goldin MM, Romasenko MV, Volkov AG, Hall PJ, Evseev AK, Levina OA, Aleschenko EI, Krylov VV. Redox

- potentials of blood serum in patients with acute cerebral pathology. *ECS Transactions*. 2010;25(19):63–71. doi: 10.1149/1.3298950
9. Grosz HJ, Farmer BB. Reduction oxidation potential of blood as a function of partial pressure of oxygen. *Nature*. 1967;213(5077):717–718. doi: 10.1038/213717a0
 10. Гольдин ММ, Ромасенко МВ, Евсеев АК, Левина ОА, Петриков СС, Алешенко ЕИ, Крылов ВВ. Оценка эффективности использования гипербарической оксигенации при острой церебральной патологии с помощью электрохимической методики. *Нейрохирургия*. 2010;4:33–39.
 11. Bar-Or D, Bar-Or R. Measurement and uses of oxidative stress. Patent US №2010/0267074 A1 от 21.10.2010. Заявка US 12/625,072 от 24.09.2009.
 12. Goldin MM, Khubutia MSh, Evseev AK, Goldin MM, Pinchuk AV, Pervakova EI, Tarabrin YA, Hall PJ. Noninvasive Diagnosis of Dysfunctions in Patients After Organ Transplantation by Monitoring the Redox Potential of Blood Serum. *Transplantation*. 2015;99(6):1288–1292. doi: 10.1097/TP.0000000000000519
 13. Morris PJ, Knechtle SJ. Kidney transplantation: principles and practice. *Philadelphia: Elsevier Saunders*. 2014. 880 p.
 14. Klein AA, Lewis CJ, Madsen JC. Organ transplantation. A Clinical Guide. *Cambridge University Press*. 2011. 386 p. doi: 10.1017/CBO9780511994876
 15. Couture KA. The Lung Transplantation Handbook (Second Edition): A Guide for Patients Paperback. *Trafford Publishing*. 2001. 282 p.
 16. Флетчер Р, Флетчер С, Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. М.: *Медиа Сфера*. 1998. 346 с.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Сергиенко Валерий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России

Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, **тел.:** +7 (499) 246-44-09, **e-mail:** niifhm@fmbamail.ru

Хубутия Могели Шалвович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 129010, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3, **тел.:** +7 (495) 625-38-97, **e-mail:** sklifos@inbox.ru

Евсеев Анатолий Константинович, кандидат химических наук, ведущий инженер Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева

Адрес: 125047, Москва А-47, Миусская пл., д. 9, **тел.:** +7 (495) 628-54-96, **e-mail:** anatolevseev@gmail.com

Пинчук Алексей Валерьевич, кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансплантации почки и поджелудочной железы ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 129010, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3, **тел.:** +7 (495) 625-25-83, **e-mail:** avpin@rambler.ru

Новрузбеков Мурад Сафтарович, кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансплантации печени ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 129010, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3, **тел.:** +7 (495) 620-10-42, **e-mail:** N.M.S.@bk.ru

Луцык Константин Николаевич, кандидат медицинских наук, заведующий отделением острых хирургических заболеваний печени и поджелудочной железы ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 129010, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3, **тел.:** +7 (495) 625-46-28, **e-mail:** s.urg@mail.ru

Гольдин Марк Михайлович, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных и физико-химических медицинских технологий ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 129010, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3, **тел.:** +7 (495) 628-54-96, **e-mail:** markmgold@gmail.com

DOI: 10.15690/vramn579

Л.М. Куртасова^{1, 2}, Н.А. Шакина², Т.В. Лубнина², А.И. Николаева¹¹ Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация² Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД, Красноярск, Российская Федерация

Изменения иммунофенотипического спектра и ферментного профиля лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины

Цель исследования: изучение иммунофенотипа и показателей активности НАД- и НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины (ГГМ). **Методы.** Обследовано 57 детей в возрасте 1 года – 3 лет с ГГМ. Контрольную группу составили 35 здоровых детей аналогичного возраста. Количество CD_3^+ , CD_4^+ , CD_8^+ , $CD_{16}^+/_{56}^+$, CD_{19}^+ -клеток в крови определяли методом проточной цитофлуориметрии. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови изучали по методу А.А. Савченко с соавт. (1989). **Результаты:** у детей с ГГМ выявлены изменения иммунофенотипического спектра лимфоцитов периферической крови. Установлены повышение рибозо-5-фосфат и НАДН-зависимых реакций макромолекулярного синтеза, снижение роли малат-аспартатного шунта в энергетике клетки, снижение анаэробной реакции лактатдегидрогеназы, компенсаторное увеличение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, высокий уровень субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, пониженный уровень глутатионредуктазы. Корреляционный анализ показал увеличение количества взаимосвязей между показателями активности исследуемых оксидоредуктаз в лимфоцитах крови у детей с ГГМ и высокий уровень корреляционной зависимости между метаболическими реакциями митохондриального компартмента. **Заключение:** у детей раннего возраста с ГГМ отмечаются изменения иммунофенотипа, энзиматической активности и корреляционной картины взаимосвязей между внутриклеточными ферментами лимфоцитов периферической крови.

Ключевые слова: гипертрофия глоточной миндалины, лимфоциты, иммунофенотип, ферменты.

(Для цитирования: Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Лубнина Т.В., Николаева А.И. Изменения иммунофенотипического спектра и ферментного профиля лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 633–639. Doi: 10.15690/vramn579)

633

Л.М. Kurtasova^{1, 2}, N.A. Shakina², T.V. Lubnina², A.I. Nikolaeva¹¹ Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation² Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Changes of the Immunophenotypic Spectrum and the Enzymatic Profile of Peripheral Blood Lymphocytes in Infants with Hypertrophy of the Pharyngeal Tonsil

Objective: to study immunophenotype and NAD- and NAD(P)-dependent dehydrogenase of blood lymphocytes activity indicators in children with hypertrophy of the pharyngeal tonsils (HPT). **Methods:** 57 children aged 1–3 years with HPT were examined. The focus group included 35 healthy children of the similar age. The number of CD_3^+ , CD_4^+ , CD_8^+ , $CD_{16}^+/_{56}^+$, CD_{19}^+ -cells in the blood was determined by flow cytometry. The activity of NAD(P)-dependent dehydrogenase was studied by the method of A. Savchenko and coauth. (1989).

Results: The changes of immunophenotypic spectrum of peripheral blood lymphocytes in infants with HPT have been revealed. The increase of ribose-5-phosphate and NADN-dependent reactions of macromolecular synthesis, the reduction of malataspartat shunt role in cell energy, the reduction of anaerobic lactate dehydrogenase reaction, the compensatory increase in the glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity, the high substrate flow of the citric acid cycle and the reduced level of glutathione have been fixed. The correlation analysis has showed increase in the number of correlations between indicators of investigated oxidoreductase activity in blood lymphocytes in children with HPT and the high level of correlation between the metabolic reactions of the mitochondrial compartment. **Conclusion:** the change of immunophenotype, enzymatic activity, correlation pattern of connection between intracellular enzymes of peripheral blood lymphocytes have been revealed in children aged 1–3 years with HPT.

Key words: hypertrophy of pharyngeal tonsil, lymphocytes, immunophenotype, enzymes.

(For citation: Kurtasova L.M., Shakina N.A., Lubnina T.V., Nikolaeva A.I. Changes of the Immunophenotypic Spectrum and the Enzymatic Profile of Peripheral Blood Lymphocytes in Infants with Hypertrophy of the Pharyngeal Tonsil. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 633–639. Doi: 10.15690/vramn579)

Обоснование

Глоточная миндалина, входящая в состав лимфоглоточного кольца Вальдейера, имеет важное значение в создании защитного барьера верхних дыхательных путей и становлении как местного, так и системного иммунитета ребенка [1, 2].

Заболевания глоточной миндалины являются наиболее частой ЛОР-патологией детского возраста, удельный вес которой среди воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей достигает 50% [2, 3]. Результаты эпидемиологического исследования, проведенного Н.В. Терсковой с соавт., показали, что увеличение в размерах и воспаление глоточной миндалины являются одними из самых распространенных среди болезней верхних дыхательных путей у детей Красноярска [4].

Помимо высокой антигенной нагрузки (частые острые респираторные вирусные инфекции) и нарушения барьерной функции слизистой оболочки полости носа и носоглотки, ведущую роль в развитии воспаления глоточной миндалины у детей играет нарушение функционирования иммунной системы [3, 5, 6].

Учитывая, что все модуляторы функциональной активности лимфоцитов — основного структурно-функционального элемента иммунной системы — прежде всего изменяют метаболизм клетки, переключая субстратный поток с одного метаболического пути на другой, влияя на энергетику клетки и синтетические процессы, изменения иммунореактивности не могут не иметь метаболической основы.

Особо актуальным представляется изучение метаболизма лимфоцитов крови у детей раннего возраста. Именно у них можно ожидать наиболее значительные динамические изменения в клетках, связанные с бурными темпами процессов роста, дифференцировки, с одной стороны, и с быстротой возникновения обменных нарушений на клеточном уровне вследствие воздействия патологических факторов — с другой.

Цель исследования: изучение иммунофенотипа и показателей активности никотинамидадениндинуклеотид (фосфат)зависимых (НАД- и НАДФ) дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины.

Методы

Дизайн исследования

Проведено открытое клиническое исследование.

Критерии соответствия

Критериями включения в исследование являлись возраст 1–3 года; гипертрофия глоточной миндалины II, III степени; отсутствие других заболеваний ЛОР-органов; европеоидная раса; отсутствие терапии в течение 1 мес, предшествующего обследованию.

Критерии исключения из исследования:

- нормальная аэрация полости носа;
- гипертрофия глоточной миндалины I степени;
- наличие сопутствующих заболеваний (наследственных и врожденных, включая первичные иммунодефициты, аллергических, аутоиммунных, эндокринных и др.).

Условия проведения

Исследования проводили на базе Красноярского краевого Центра профилактики и борьбы со СПИД. Обсле-

довали группу детей ($n = 57$) с гипертрофией глоточной миндалины II, III степени в возрасте 1 года — 3 лет. Контрольную группу составили 35 здоровых детей аналогичного возрастного диапазона.

Продолжительность исследования

Исследование проводили в период 2012–2014 гг.

Исходы исследования

В ходе исследования оценивали изменение фенотипических характеристик и показателей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины.

Методы регистрации исходов

Мононуклеары выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина [7]. Методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора FACS Callibur (Becton Dickinson, США) и реагентов Simultest IMK-lymphocyte Kit (США) определяли содержание CD_3^{+} -, CD_4^{+} -, CD_8^{+} -, $CD_{16/56}^{+}$ -, CD_{19}^{+} -клеток в периферической крови.

В лимфоцитах периферической крови осуществляли биoluminesцентное определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), НАД- и НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы (НАД ЛДГ, НАДН ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой малатдегидрогеназы (НАД МДГ, НАДН МДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАД ГДГ, НАДН ГДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФ ГДГ, НАДФН ГДГ), НАД- и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД ИЦДГ, НАДФ ИЦДГ), малатдегидрогеназы декарбоксилирующей (НАДФ МДГ) и глутатионредуктазы (ГР) [8].

Активность исследуемых оксидоредуктаз выражали в ферментативных единицах [$1E = 1 \text{ мкмоль/мин} \times 10^4$ клеток. В работе использовали ферментативный препарат NAD(P): FMN оксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (полученный в Институте биофизики РАН, Красноярск). Измерение уровня биoluminesценции осуществляли на биolumинометре «БЛИМ 8801» (Россия).

Этическая экспертиза

Исследование проводили с соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинской декларации и Директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС). Исследования одобрены Локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 23/2011 от 02 апреля 2011 г.). От родителей всех детей, участвующих в исследовании, было получено информированное согласие на проведение исследования и обработку персональных данных.

Статистический анализ

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica v.6.0 (StatSoft Ins., США).

Нормальность распределения показателей определялась с помощью метода Колмогорова–Смирнова. Количественные показатели, учитывая нормальное распределение, описывались с использованием средних арифметических значений (M) и стандартной ошибки среднего (m). Для изучения статистической значимости

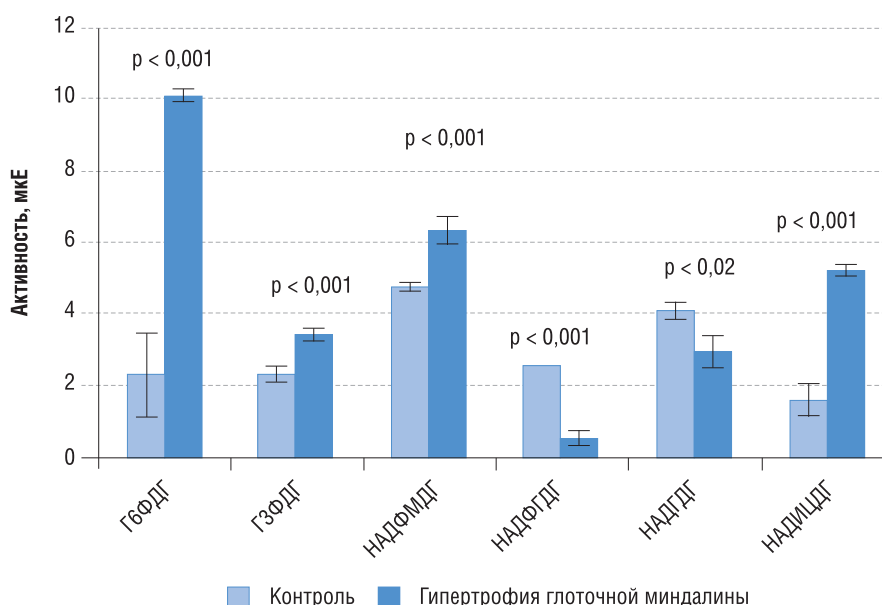


Рис. 1. Показатели активности НАД- и НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины

различий между количественными признаками представленных групп применяли t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. При этом значения p могли ранжироваться по трем уровням достигнутых статистически значимых различий: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$. Для выявления связи количественных показателей применяли метод ранговой корреляции Пирсона.

Результаты

Участники исследования

Обследовано 57 детей в возрасте от одного года до трех лет (средний возраст $2,26 \pm 0,76$ лет) с гипертрофией глоточной миндалины, из них 32 (56,14%) мальчика и 25 (43,86%) девочек. Диагноз гипертрофии глоточной миндалины был установлен на основании жалоб, клинической (затруднение носового дыхания, дыхание через рот, отделяемое из носа, храп в ночное время) и эндоскопической (наличие аденоидных вегетаций II, III степени в полости носоглотки) картины.

Контрольную группу составили 35 здоровых детей в возрасте 1 года – 3 лет (средний возраст $2,14 \pm 0,84$ года), из них 19 (54,29%) мальчиков и 16 (45,71%) девочек.

Основные результаты исследования

Результаты исследований иммунологических параметров показали увеличение процентного содержания лимфоцитов периферической крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины относительно величин контрольной группы (табл. 1).

Анализ иммунофенотипического спектра лимфоцитов периферической крови выявил выраженную тенденцию к понижению процентного содержания CD_4^+ , статистически значимое повышение абсолютного числа CD_8^+ и снижение относительного количества $CD_{16}^+/_{56}$ -клеток в периферической крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины по сравнению с показателями контрольной группы (см. табл.).

При исследовании показателей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины вы-

явлено повышение активности Г6ФДГ и Г3ФДГ относительно контрольных величин (рис. 1).

Результаты проведенных исследований обнаружили увеличение активности НАД ИЦДГ, НАДФ ИЦДГ и НАД МДГ в лимфоцитах крови в 3,37 ($p < 0,001$), 6,96 ($p < 0,001$) и 2,41 ($p < 0,001$) раза, соответственно, в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 1, 2). Кроме того, в лимфоцитах крови детей основной группы относительно группы контроля отмечается повышение активности НАДФ МДГ (см. рис.1).

Как следует из рис. 2, 3, в лимфоцитах периферической крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины снижены аэробная и анаэробная реакции ЛДГ, а также активность НАДН ЛДГ и уровень ГР по сравнению с аналогичными параметрами контрольной группы.

Таблица 1. Иммунологические показатели у детей с гипертрофией глоточной миндалины ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n=35)	Больные дети (n=57)	p
Лейкоциты, $10^9/л$	$8,42 \pm 0,15$	$9,15 \pm 0,54$	-
Лимфоциты, %	$45,1 \pm 1,49$	$47,42 \pm 1,82$	$<0,001$
Лимфоциты, $10^9/л$	$3,43 \pm 0,11$	$4,32 \pm 0,34$	-
CD_3^+ -клетки, %	$61,9 \pm 2,11$	$60,43 \pm 1,78$	-
CD_3^+ -клетки, $10^9/л$	$2,10 \pm 0,05$	$2,52 \pm 0,17$	-
CD_{19}^+ -клетки, %	$11,45 \pm 1,13$	$13,62 \pm 1,29$	-
CD_{19}^+ -клетки, $10^9/л$	$0,38 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,04$	-
CD_4^+ -клетки, %	$36,07 \pm 1,94$	$31,25 \pm 1,73$	$0,1 > p > 0,05$
CD_4^+ -клетки, $10^9/л$	$1,52 \pm 0,07$	$1,52 \pm 0,11$	-
CD_8^+ -клетки, %	$16,21 \pm 1,35$	$18,64 \pm 1,29$	-
CD_8^+ -клетки, $10^9/л$	$0,54 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,05$	$<0,01$
$CD_{16}^+/_{56}$ -клетки, %	$11,22 \pm 1,08$	$8,14 \pm 0,76$	$<0,05$
$CD_{16}^+/_{56}$ -клетки, $10^9/л$	$0,46 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,04$	-

Примечание. p — статистически значимые различия с показателями контрольной группы.

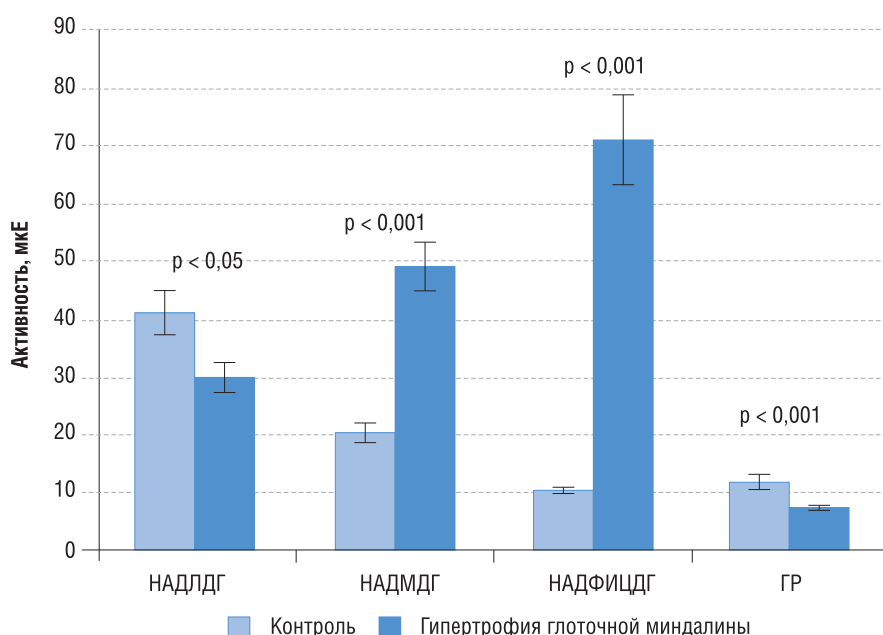


Рис. 2. Показатели активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ и глутатионредуктазы лимфоцитов крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины

636

Необходимо отметить статистически значимое понижение активности НАД ГДГ и НАДФ ГДГ как по прямой, так и обратной реакциям в обеих наблюдаемых группах детей (рис. 1, 3).

Анализ корреляционной зависимости показал, что в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины по сравнению с контрольной группой отмечалось увеличение количества связей между изучаемыми ферментами (рис. 4, табл. 2). При этом в корреляционной картине детей основной группы преобладали слабой и средней силы взаимосвязи между исследуемыми внутриклеточными ферментами в лимфоцитах периферической крови (см. рис. 5). Так, из 29 выявленных в этой группе детей связей между показателями активности исследуемых ферментов 20 имели слабую корреляционную зависимость, что составляет 68,97% от общего числа всех обнаруженных взаимосвязей.

Результаты проведенного корреляционного анализа выявили в обеих группах детей только три общие корреляционные зависимости между исследуемыми оксидо-

редуктазами лимфоцитов крови: НАД ЛДГ и НАД МДГ (контрольная группа: $r = 0,65$, $p < 0,05$; исследуемая группа: $r = 0,81$, $p < 0,001$), НАД ИЦДГ и НАД МДГ (контрольная группа: $r = 0,33$, $p < 0,05$; исследуемая группа: $r = 0,35$, $p < 0,05$), НАДН ЛДГ и НАДН МДГ (контрольная группа: $r = 0,87$, $p < 0,001$; исследуемая группа: $r = 0,83$, $p < 0,001$).

Следует отметить, что в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины связь между НАД ЛДГ и НАД МДГ оказалась более сильной ($r = 0,81$, $p < 0,001$), чем в контрольной ($r = 0,65$, $p < 0,05$). При этом корреляционные связи между НАД ИЦДГ и НАД МДГ, а также между НАДН ЛДГ и НАДН МДГ по своей силе статистически значимо не отличались в контрольной группе ($r = 0,33$, $p < 0,05$; $r = 0,83$, $p < 0,001$, соответственно) и в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины ($r = 0,35$, $p < 0,05$; $r = 0,87$, $p < 0,001$, соответственно).

Исследование корреляционной зависимости между изучаемыми ферментами в лимфоцитах периферической крови в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины установило, что ГР является метаболическим

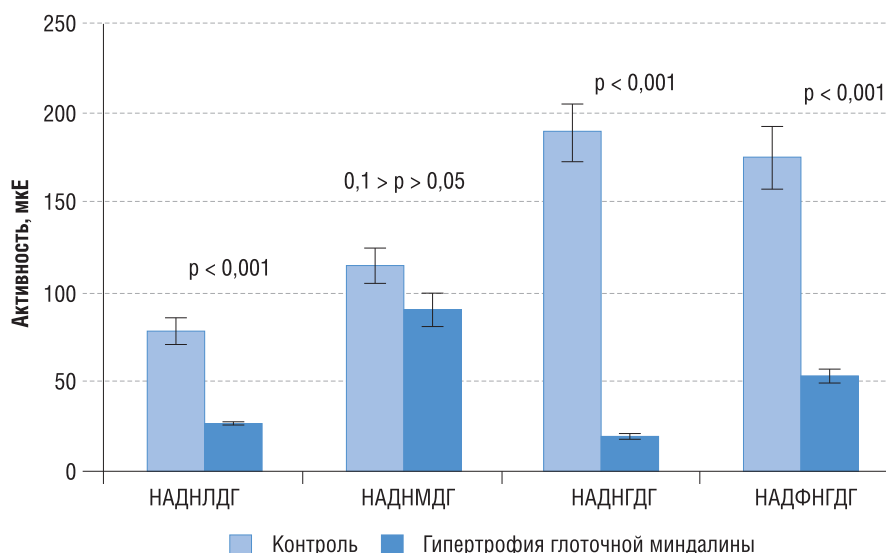


Рис. 3. Показатели активности НАДН-зависимых реакций ЛДГ, МДГ, ГДГ и НАДФНГДГ лимфоцитов крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины

Таблица 2. Корреляционные связи показателей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови детей с гипертрофией глоточной миндалины

НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы	r / p	НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы
НАД ЛДГ	0,81 / <0,001	НАД МДГ
НАД ЛДГ	0,38 / <0,05	НАД ГДГ
НАД ЛДГ	0,27 / <0,05	НАДФ ГДГ
НАД ЛДГ	0,74 / <0,001	ГР
НАД ЛДГ	0,29 / <0,05	НАДФ МДГ
НАД ЛДГ	0,59 / <0,01	НАДН ЛДГ
НАД ЛДГ	0,43 / <0,05	НАДН МДГ
НАД МДГ	0,35 / <0,05	НАД ИЦДГ
НАД МДГ	0,39 / <0,05	НАДФ МДГ
НАД МДГ	0,48 / <0,05	ГР
НАДН ЛДГ	0,46 / <0,05	НАД ГДГ
НАДН ЛДГ	0,39 / <0,05	НАДФ ГДГ
НАДН ЛДГ	0,46 / <0,05	НАДН ГДГ
НАДН ЛДГ	0,87 / <0,001	НАДН МДГ
НАДН ЛДГ	0,79 / <0,001	ГР
НАДН МДГ	0,41 / <0,05	НАД ГДГ
НАДН МДГ	0,45 / <0,05	НАДФ ГДГ
НАДН МДГ	0,47 / <0,05	НАДН ГДГ
НАДН МДГ	0,73 / <0,001	ГР
ГЗФДГ	0,41 / <0,05	НАДФ ГДГ
ГЗФДГ	0,27 / <0,05	НАД ГДГ
ГЗФДГ	0,43 / <0,05	НАДФ ИЦДГ
НАДФ ГДГ	0,30 / <0,05	НАДФ НГДГ
НАДФ ГДГ	0,43 / <0,05	НАДФ ИЦДГ
НАДФ ГДГ	0,39 / <0,05	НАД ГДГ
НАДФ ГДГ	0,50 / <0,05	ГР
НАДФ МДГ	0,29 / <0,05	НАД ИЦДГ
НАДФ МДГ	0,48 / <0,05	НАДФ ИЦДГ
НАД ГДГ	0,57 / <0,01	ГР

параметром с многочисленными и разнообразными взаимосвязями (см. табл. 2).

Система соотношений между показателями активности изучаемых внутриклеточных ферментов лимфоцитов периферической крови в основной группе детей по сравнению с контрольной отличается многочисленными положительными взаимосвязями между ферментами митохондриального компартмента (см. рис. 4, табл. 2). В группе детей с гипертрофией глоточной миндалины необходимо отметить полное «выпадение» из системы корреляционных связей между исследуемыми ферментами Г6ФДГ (см. табл. 2).

Обсуждение

Анализ полученных данных установил повышение активности Г6ФДГ в лимфоцитах периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины. Широко известно, что Г6ФДГ является иницирующим ферментом пентозофосфатного пути (ПФП) и участвует в перераспределении части глюкозы с энергетических нужд клетки на пластические [9]. В результате деятельности ПФП, в том

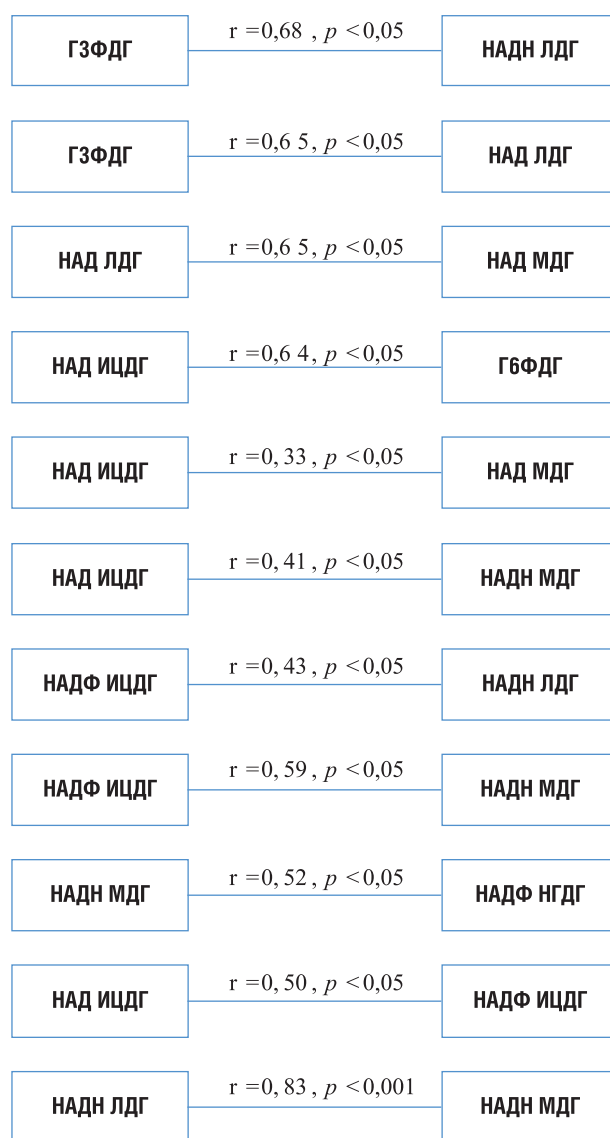


Рис. 4. Корреляционные связи показателей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови контрольной группы

числе Г6ФДГ, в больших количествах образуется НАДФН, необходимый для реакций биосинтеза липидов и регуляции восстановленного глутатиона — важного эндогенного антиоксиданта [10]. Кроме того, одним из продуктов ПФП является рибозо-5-фосфат, который используется для дальнейшего макромолекулярного синтеза [9, 11].

Следовательно, активация работы ПФП может увеличивать способность клетки к синтезу нуклеотидов. В то же время интенсивная работа ПФП, несомненно, будет способствовать снижению в клетке доступного для использования в реакциях энергетического обмена количества глюкозы.

Таким образом, при повышенном оттоке глюкозо-6-фосфата в ПФП активность реакций гликолиза будет понижена. Возможно, это свидетельствует об уменьшении в лимфоцитах периферической крови активности анаэробной реакции ЛДГ, в ходе которой регенерируется НАД⁺, необходимый для циклической гликолитической оксидоредукции, у детей основной группы.

Ферментативная реакция, которая может компенсировать отток субстратов с гликолиза, катализируется ГЗФДГ, активность которой повышена в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины [12].

Следует отметить, что энергетический потенциал лимфоцитов определяется не только интенсивностью анаэробного окисления глюкозы, но и аэробными процессами. В значительной степени аэробные процессы зависят от активности ферментов цикла Кребса.

Нарастающая активность НАД ИЦДГ, НАДФ ИЦДГ и НАД МДГ в лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины определяет повышение интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. Кроме того, у детей основной группы в лимфоцитах периферической крови наблюдается повышение содержания малик-фермента, шунтирующего «медленные» реакции цикла Кребса и являющегося ключевым ферментом липидного анаболизма [13].

В то же время необходимо отметить, что высокая интенсивность субстратного потока по циклу Кребса в лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины не определяет увеличения оттока интермедиатов через НАДН ГДГ и НАДФН ГДГ на реакции аминокислотного обмена.

Снижение активности аэробной реакции НАД ЛДГ, обнаруженное в лимфоцитах периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины, свидетельствует о более полном потреблении наработанного клеткой пирувата.

Известно, что одной из метаболических систем, поддерживающих водородный градиент, является малат-аспартатный шунт, ключевую реакцию которого осуществляет НАДН МДГ, чья активность снижена в лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины [14, 15]. Уменьшение активности НАД ГДГ и НАДФ ГДГ у больных основной группы отражает понижение окислительного дезаминирования глутамата и восстановительного аминирования α -оксoglутарата.

Снижение активности ГР в лимфоцитах периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины характеризует понижение антиоксидантной защиты клетки. Известно, что ГР-фермент, осуществляющий восстановление глутатиона за счет окисления НАДН, определяет его функциональную важность в реакциях глутатионзависимой антиоксидантной системы [10]. В то же время данный фермент содержится в хроматине клеточных ядер, где участвует в пролиферативных процессах [16].

Проведенный корреляционный анализ выявил у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины сравнительно высокий уровень взаимосвязей между показателями активности оксидоредуктаз в лимфоцитах периферической крови. По мнению ряда авторов, увеличение количества связей между ферментами свидетельствует о том, что клетка находится в неблагоприятных условиях, при этом усиление соподчиненности различных ферментов позволяет ей наиболее экономно использовать белковые катализаторы [17].

Обнаруженный повышенный уровень корреляционной зависимости между метаболическими реакциями

митохондриального компартмента (в том числе и за счет вспомогательных и шунтирующих реакций) у детей с гипертрофией глоточной миндалины свидетельствует о мобилизации энергетических ресурсов клетки.

Заключение

Результаты проведенного исследования выявили у детей с гипертрофией глоточной миндалины на фоне увеличения относительного количества лимфоцитов в периферической крови изменение их иммунофенотипического спектра. Анализ полученных данных позволил установить у наблюдаемых детей изменения ферментного профиля лимфоцитов периферической крови. Так, у пациентов в лимфоцитах периферической крови наблюдаются повышенный отток субстратов через Г6ФДГ на пластические процессы и пониженная интенсивность анаэробного окисления глюкозы, которая не компенсируется повышением активности ГЗФДГ.

В лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины наблюдается высокий уровень субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, вносящего наибольший вклад в процессы внутриклеточного энергообразования. В то же время отмечается снижение активности субстратного взаимодействия между циклом Кребса и реакциями аминокислотного обмена, а также уменьшение роли малат-аспартатного шунта в энергетическом внутриклеточном обмене.

Кроме того, обнаружено снижение активности ГР, что может способствовать повышению перекисных процессов и привести к снижению пролиферативной активности лимфоцитов.

При этом у детей раннего возраста с гипертрофией глоточной миндалины изменяется не только активность исследуемых оксидоредуктаз в лимфоцитах периферической крови, но и их координированность в клетке: меняется взаимозависимость между ферментами, появляются новые связи, изменяется интенсивность корреляционных связей.

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке КГБУЗ «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД»

Конфликт интересов

Авторы статьи подтверждают отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин ДВ, Быкова ВП. Гистоархитектоника глоточной миндалины в возрастном аспекте. Морфометрическое и иммуногистохимическое исследование. *Архив патологии*. 2011;1:14–18.
2. Богомильский МР. Аденоиды. *Вестник оториноларингологии*. 2013;3:61–64.
3. Бениова СН, Таранова СВ, Бабко СВ. Клинико-иммунологические особенности хронических заболеваний назально-ассоциированной лимфоидной ткани у детей. *Вестник оториноларингологии*. 2014;4:36–38.
4. Терскова НВ, Николаева АИ, Вахрушев СГ, Сибатян АС. Загрязнение атмосферного воздуха как фактор риска гипертрофии глоточной миндалины *Сибирское медицинское обозрение*. 2013;5:59–64.
5. Азнабаева ЛФ. Иммунологические аспекты воспаления верхних дыхательных путей. *Вестник оториноларингологии*. 2012;3:23–26.

6. Бешапочный СБ, Гасюк ЮА, Лобурец ВВ, Вахнина АБ. Механизмы местной защиты слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух. *Вестник оториноларингологии*. 2013;4:44–47.
7. Boyum A. Isolation and removal of lymphocytes from bone marrow of rats and guinea-pigs. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:91–106.
8. Савченко АА, Сунцова ЛН. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом. *Лабораторное дело*. 1989;11:23–25.
9. Norris MG, Malys N. What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405(3):388–392. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.037.
10. Tandogan B, Sengezer C, Uluşu NN. In vitro effects of imatinib on glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase. *Folia Biol (Praha)*. 2011;57(2):57–64.
11. Stanton RC. Glucose 6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*. 2012;64(5):362–369. doi: 10.1002/iub.1017.
12. de la Roche M, Tessier SN, Storey KB. Structural and functional properties of glycerol 3-phosphate dehydrogenase from a mammalian hibernator. *Protein J*. 2012;31(2):109–119. doi: 10.1007/s10930-011-9376-3.
13. Hsieh JY, Chen SH, Hung HC. Functional roles of the tetramer organization of malic enzyme. *J Biol Chem*. 2009;284(27):18096–18105. doi: 10.1074/jbc.M109.005082.
14. Abbrescia DI, La Piana G, Lofrumento NE. Malate aspartate shuttle and exogenous NADH/cytochrome c electron transport pathway as two independent cytosolic reducing equivalent transfer systems. *Arch Biochem Biophys*. 2012;518(2):157–163. doi: 10.1016/j.abb.2011.12.021.
15. Lu M, Banerjee S, Saidel GM, Yu X. Regulation of cytosolic and mitochondrial oxidation via malate aspartate shuttle: an observation using dynamic (1) (3) C NMR spectroscopy. *Adv Exp Med Biol*. 2011;701:185–192. doi: 10.1007/978-1-4419-7756-4-25.
16. Pallardo FV, Markovic J, Garcia JL, Vina J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1–2):77–85. doi: 10.1016/j.mam.2009.01.001.
17. Куртасова ЛМ, Савченко АА, Манчук ВТ. Метаболические аспекты иммунореабилитации детей с atopическими заболеваниями. *Новосибирск: Наука*. 2006. 222 с.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Куртасова Людмила Михайловна, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 220-06-28, **e-mail:** sibmed-obozrenie@yandex.ru

Шакина Наталья Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая иммунологической лабораторией Красноярского краевого Центра профилактики и борьбы со СПИД

Адрес: 660049, Красноярск, ул. Карла Маркса, д. 45, **тел.:** +7 (391) 226-84-13, **e-mail:** imunolog@aids.krsn.ru

Лубнина Татьяна Викторовна, врач-педиатр лечебно-консультативного отделения Красноярского краевого Центра профилактики и борьбы со СПИД

Адрес: 660049, Красноярск, ул. Карла Маркса, д. 45, **тел.:** +7 (391) 226-84-17, **e-mail:** Lubnina@aids.krsn.ru

Николаева Анна Игоревна, врач-оториноларинголог отделения соматической патологии Центральной научно-исследовательской лаборатории Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 220-06-28, **e-mail:** annanikolaevalor@mail.ru

DOI: 10.15690/vramn564

Г.И. Подопригора^{1, 2}, Л.И. Кафарская¹, Н.А. Байнов¹, А.Н. Шкопоров¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Российская Федерация

² НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Российская Федерация

Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты

Бактериальная транслокация (БТ) из кишечника представляет патологическое и физиологическое явление. БТ наблюдается в процессе установления аутохтонной кишечной микробиоты и микробиома хозяина при взаимодействии с комменсалами, сопровождаемая естественный иммуногенез, и при патологии (например, иммунодефицитах), представляя этиопатогенетическое звено инфекционного процесса и септических осложнений. Эволюционно выработанные механизмы взаимодействия хозяина и микробиоты, взаимно противоположной направленности, обусловлены инвазионными свойствами микроорганизмов и противостоящими им защитно-барьерными механизмами хозяина. Колонизационная резистентность хозяина, контактирующего с экзогенной микробиотой, обеспечивается комплексом конституциональных и адаптивных механизмов с ведущим участием комменсальной микробиоты. БТ в результате дисфункции барьеров контролируется механизмами самоочищения с вовлечением миелоидной клеточной фагоцитарной системы и опсопинов. Возникающая на слизистых оболочках динамично развивающаяся клеточно-гуморальная реакция на молекулярные микробные паттерны инициирует рецепторно-сигнальные и каскадные реакции, вектор и результат которых определяются перекрестным взаимодействием генома и микробиома хозяина. Рассмотрена ультраструктура энтероцитарных барьеров, взаимодействующих с микробиотой (симбиоты и патобиоты), в обеспечении адаптационно-гомеостатической реактивности хозяина. Обоснованы исследования микроциркуляторного звена в патогенезе ишемических тканевых повреждений и воспаления, повышающих проницаемость кишечного барьера и БТ, а также механизмов очищения от бактерий и апоптотических клеток. Воспалительные и другие заболевания, напрямую связанные с барьерными нарушениями кишечника, обоснованно считаются болезнями кишечного барьера. Материнская микробиота влияет на формирование врожденного иммунитета и микробиоты новорожденного, в том числе путем БТ кишечных комменсалов с грудным молоком. Перспективны комплексные микробиологические, иммунологические, патофизиологические и другие исследования с использованием адекватных биомоделей, включая гнотобиотов.

Ключевые слова: микробиота, энтероцит, кишечный барьер, гнотобиология.

(Для цитирования: Подопригора Г.И., Кафарская Л.И., Байнов Н.А., Шкопоров А.Н. Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 640–650. Doi: 10.15690/vramn564)

G.I. Podoprighora^{1, 2}, L.I. Kafarskaya¹, N.A. Bainov¹, A.N. Shkoporov¹

¹ The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov,
Moscow, Russian Federation

² Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, Moscow, Russian Federation

Bacterial Translocation from Intestine: Microbiological, Immunological and Pathophysiological Aspects

Bacterial translocation (BT) is both pathology and physiology phenomenon. In healthy newborns it accompanies the process of establishing the autochthonous intestinal microbiota and the host microbiome. In immunodeficiency it can be an aethio-pathogenetic link and a manifestation of infection or septic complications. The host colonization resistance to exogenous microbial colonizers is provided by gastrointestinal microbiota in concert with complex constitutional and adaptive defense mechanisms. BT may be result of barrier dysfunction and self-purification mechanisms involving the host myeloid cell phagocytic system and opsonins. Dynamic cell humoral response to microbial molecular patterns that occurs on the mucous membranes initiates receptor signaling pathways and cascade of reactions. Their vector and results are largely determined by cross-reactivity between microbiome and the host genome. Enterocyte barriers interacting with microbiota play leading role in providing adaptive, homeostatic and stress host reactivity. Microcirculatory ischemic tissue alterations and inflammatory reactions increase the intestinal barrier permeability and BT. These processes as well as mechanisms for apoptotic cells and bacteria clearance are justified to be of prospective research interest. The inflammatory and related diseases caused by alteration and dysfunction of the intestinal barrier are reasonably considered as diseases of single origin. Maternal microbiota affects the formation of the innate immune system and the microbiota of the newborn, including intestinal commensal translocation during lactation. Deeper understanding of intestinal barrier mechanisms needs complex microbiological, immunological, pathophysiological, etc. investigations using adequate biomodels, including gnotobiotic animals.

Key words: microbiota, enterocyte, intestinal barrier, gnotobiology.

(For citation: Podoprighora G.I., Kafarskaya L.I., Bainov N.A., Shkoporov A.N. Bacterial Translocation from Intestine: Microbiological, Immunological and Pathophysiological Aspects. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 640–650. Doi: 10.15690/vramn564)

Возможности транслокации кишечных микроорганизмов

Проницаемость желудочно-кишечного тракта для микроорганизмов становится актуальным предметом исследований в связи с возрастающим вниманием к многофункциональной роли микробиома хозяина, формируемого в процессе взаимодействия с внешней и внутренней микробиотой, в частности с актуальностью проблемы сепсиса и септических осложнений.

Кишечный барьер (КБ) — сложная многокомпонентная система: ее основу составляет однослойный эпителий, железистые элементы которого продуцируют слизь; гликокаликс представляет сложное макромолекулярное образование, состоящее из протеогликанов, гликопротеинов и гликолипидов, эволюционно сложившееся в процессе адаптации и взаимодействия клеток кишечного тракта эукариотических организмов с внешней средой и выполняющее важные регуляторно-сигнальные, транспортные, пищевые и другие функции. Структуру КБ составляет также ряд клеточных компонентов и молекул, относящихся к иммунной, сосудистой и другим системам, анатомически и функционально связанных с желудочно-кишечным трактом, из них важнейшими являются иммунocyты и их продукты — иммуноглобулины и антигены (в том числе секреторные), антимикробные пептиды, цитокины и пр. Отдельным самостоятельным компонентом барьера являются комменсальные бактерии, активно взаимодействующие с другими представителями микробиоты и соматическими клетками хозяина, а суммарный микробиом через взаимодействие с соматическим геномом оказывает огромное влияние на состояние здоровья и патологию хозяина.

Нарушения в барьере и составляющих его компонентах, включая вовлеченные клеточно-гуморальные факторы, приводят к бактериальной транслокации (БТ) кишечных бактерий во внутреннюю среду организма хозяина, что может сопровождаться развитием сепсиса и септических осложнений, а также воспалительных и других заболеваний недостаточности кишечного барьера [1].

БТ представляет не только патогенетическое звено инфекционного процесса, но наблюдается и в естественных условиях микробного заселения мукозных поверхностей желудочно-кишечного и других трактов новорожденных, что было установлено Россли еще в 1922 г. и названо «физиологической бактериемией». Трансмуральная миграция кишечных бактерий уже тогда привлекала внимание исследователей [2], однако наличие у обычных животных естественной микробной контаминации создавало определенные методические трудности. Новые возможности появились с развитием гнотобиологии [3], изучением безмикробных и других категорий микробиологических контролируемых животных (гнотобиотов) и взаимодействия организма хозяина с известными микроорганизмами или их комбинациями. При подселении или ассоциации безмикробных животных с известными кишечными микроорганизмами, включая представителей комменсальной микробиоты, у гнотобиотов отмечалось проникновение микроорганизмов через кишечный барьер, что сопровождалось транзитной бактериемией. Этот процесс получил название бактериальной транслокации [4]. Ранее эти явления у гнотобиотов наблюдались и нами [5].

С середины 60-х гг. прошлого века в России начались технологические разработки получения и исследования безмикробных животных. Гнотобиологические модели, включающие безмикробных, моноассоциированных и другие категории, контролируемые по микробному фак-

тору, в сравнении с традиционными лабораторными животными помогают оценить влияние микробиотического фактора на развитие неспецифической резистентности и врожденный иммунитет хозяина.

Связь этих реакций с микробной флорой впервые была показана И.И. Мечниковым и получила развитие в работах его последователей. С развитием учения о фагоцитозе придается всевозрастающее значение клеточным фагоцитарным и воспалительным реакциям при взаимодействии хозяина с микроорганизмами в механизмах защитных реакций. Один из важных механизмов, лежащих в основе защитной реакции естественно контаминированных (конвенциональных) животных, рассмотрен в концепции барьерфиксирующей функции лимфоидной ткани организма [6]. В связи с этим изучение роли микробного фактора в неспецифических защитных реакциях врожденного иммунитета, включая барьерную функцию макроорганизма, на основе сравнительных исследований с использованием гнотобиологических моделей (безмикробные, моноассоциированные и другие категории) представляло несомненный интерес. Нами одними из первых были последовательно изучены вопросы особенностей фагоцитарной активности лейкоцитов и воспаления у безмикробных животных [5].

В настоящее время известно, что БТ через стенку кишечника происходит при таких тяжелых патологических процессах, как воспаление, ожоги, травмы, хирургические вмешательства, дисбиотические, иммунодепрессивные и стрессовые состояния, лучевые поражения и другие заболевания, сопровождаемые ослаблением врожденного иммунитета и резистентности организма. Снижение эффективности КБ, возникающее при дисфункции или дефектах эпителиальных клеток (энтероцитов), плотных межклеточных соединений (Tight Junction) и других морфофункциональных компонентов барьера, приводит к проникновению микроорганизмов в лимфатическую систему и кровоток. Считается, что дисфункция КБ сопровождается БТ, при которой бактерии и их продукты (эндотоксины и др.) из просвета кишечника через систему воротной вены с большей частью венозной крови от кишечника поступают в печень — первый на пути орган, в который поступают не только всасываемые питательные вещества, но также кишечные бактерии и молекулярные паттерны патогенов (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP). Именно поэтому хроническая экспозиция печени к PAMP связывается с прогрессией заболевания и инфекционными осложнениями при развитии цирроза [7]. Однако необходимо учитывать и лимфогенный путь БТ из кишечника, при котором первым органом на пути транслоцируемых продуктов из кишечника становятся легкие, что объясняет их вовлеченность в синдром полиорганной недостаточности, связанной с дисфункцией КБ [8].

Повышение проницаемости кишечного барьера также патогенетически связано с развитием гипертермии и температурной реакцией хозяина в результате проникновения из кишечника и воздействия продуктов микробного происхождения типа липополисахаридов. В отсутствии бактериальной контаминации у безмикробных гнотобиотов в отличие от конвенциональных мышей и мини-свиней отмечено снижение температурной реакции на стандартный пирогенный препарат [5]. Среди факторов, способствующих укреплению КБ, отмечаются продукты как микробного, так и немикробного происхождения. Так, в условиях нарушения барьерных свойств кишечника под влиянием стрессового воздействия профилактическое применение пробиотиков оказывало протективный

эффект [9]. Способность повышать резистентность КБ к БТ выявлена у глутамина, вводимого перорально [10, 11].

Учитывая огромные масштабы кишечной (10^{14}) микробной колонизации, а также суммарного микробного генома (микробиома) кишечника, превышающего в 150 раз соматический геном человека, неизмеримо возрастает значение биоинформатики, системной биологии и компьютерного моделирования в изучении взаимодействия кишечных микроорганизмов с хозяином. Растущему признанию важности микрофлоры способствовали наблюдения бактериофагов, представляющих вирусы прокариот, заражающих бактерии или археи, в их обмене генами в микробиоте кишечника, с высокой специфичностью и частотой влияющих на активность представителей микробиоты, что подчеркивает роль подобного «биологического драйвера» при формировании состава кишечной микробиоты [12]. Взятые вместе эти инновационные исследовательские технологии, а также компьютерные модели и методы системной биологии, позволяют оценить значение установленных и новых информационных сетей, имеющих решающее значение в гомеостазе в кишечнике и здоровье человека. Потребуется дальнейшие усилия для проверки и подтверждения прогнозов на основе рабочих гипотез. Системно-биологический анализ в сочетании с метаомикомым подходом активно используются для изучения и характеристики микробиома человека [13, 14].

Кишечный барьер при взаимодействии хозяина с микробиотой

Функция, препятствующая проникновению кишечных микроорганизмов во внутреннюю среду организма хозяина, обеспечивается комплексом барьерно-защитных приспособлений, включающих физико-механические, химические и биологические механизмы, выработанные и развивающиеся в условиях сосуществования с окружающими микробиотическими факторами среды и формирования собственной микробиоты, в первую очередь кишечной, и микробиома в целом [15]. Принято считать, что большая часть барьерно-защитных механизмов относится к врожденному иммунитету в отличие от адаптивного, развивающегося в процессе инфицирования возбудителями конкретных инфекционных заболеваний.

Подчеркивается важность периода беременности для транслокации бактерий и микробных молекулярных паттернов (ММП) в возможной эпигенетической иммунорегуляции у эмбрионов. Особое значение может иметь еще малоизученное явление иммунорегулируемого эпигенетического импринтинга в результате БТ и воздействия ММП на эмбрион в течение беременности, потенциально обеспечивающих будущее потомство первичным микробиомом [16]. Согласно этому предположению, первоначальный контакт плода с ММП в матке обеспечивает примирование иммунной системы и эпителия к последующей ответной реакции на патогены и комменсалы и проявлениям врожденного иммунитета.

Исследования с безмикробными и моноассоциируемыми гнотобиотами показали значение нормофлоры и отдельных комменсальных представителей кишечной микробиоты в развитии иммунной системы в целом, а также позволили выявить адаптивный характер врожденного иммунитета, в том числе и неспецифических защитных реакций. Особое значение гнотобиологические модели сыграли в раскрытии закономерностей формирования иммунитета слизистых оболочек (мукозного иммуните-

та), топографически наиболее тесно контактирующих с микробными контаминантами, а также последствий микробной колонизации и механизмов БТ [5, 17, 18]. Нашими систематическими исследованиями показана важная интегральная роль микробиоты, а также отдельных ее представителей (в том числе пробиотиков) в комплексе адапционно-защитных механизмов и реакций врожденного иммунитета — как клеточных, так и гуморальных. В настоящем обзоре с морфофункциональных, бактериологических и патофизиологических позиций характеризуются барьерные механизмы и БТ в процессе взаимодействия микробиоты с хозяином.

Энтероцитарный барьер и плотные межклеточные соединения

В контакте микроорганизмов с кишечником млекопитающих последовательно участвуют основные поверхностные элементы эпителиального КБ, представленные постоянно образуемой слизью (Mucus), гликокаликсом (полисахаридным, гликопротеиновым и гликолипидным молекулярным комплексом, выполняющим важную рецепторно-транспортную роль) эпителиальных клеток, расположенных в один слой и скрепленных плотными межклеточными соединениями (ПМС) в местах наиболее тесного контакта. Эти структуры функционируют в условиях постоянной регенерации. ПМС образуются между апикальными и боковыми мембранами соседних энтероцитов, ограничивая поступление воды, солей и клеток из просвета кишечника во внутреннюю среду. Особенности морфологии ПМС стали понятнее с развитием электронной микроскопии, а в последнее время исследователи заинтересовались их макромолекулярное строение [19].

ПМС образуются прилегающими мембранами соседних эпителиальных клеток, ультраструктура которых представлена сетью микрофибрилл, расположенных вдоль всей длины, опоясывающей верхние боковые грани прилегающих эпителиальных клеток. В результате между тремя вертикальными полосками фибриллярной сетки во внеклеточном пространстве формируется трубчатая ультраструктура в виде длинного узкого канала (~1 мкм в длину и 10 нм в диаметре), которая, уменьшая свободную диффузию растворенных веществ, обеспечивает достаточные барьерные свойства эпителиальных тканей [20]. Описанные модели ПМС допускают би- и триклеточные контакты. В молекулярной организации ПМС принимают участие мембранные белки, среди которых выделяются так называемые трицеллюлин, ангулин, клаудины, соединительные адгезивные молекулы, окклюдины и связанные макромолекулы на внутриклеточных плаках ZO-1, ZO-2, ZO-3, AF-6, цингулин, 7Н6.

Особую роль ПМС играют в проницаемости КБ и развитии ряда связанных патологических состояний, таких как воспалительные заболевания толстой кишки, а также внекишечные заболевания, включая диабет 1-го типа, пищевую аллергию, аутоиммунные болезни. Разрывы ПМС происходят и при других заболеваниях и травматических повреждениях, что сопровождается БТ, способствующей системному воспалительному ответу [19]. Продолжительный апоптоз энтероцитов при лучевой или ожоговой травме приводит к разрывам ПМС и последующей БТ в мезентериальные лимфатические узлы, развитию сепсиса и гибели пострадавших [21]. Такие повреждения кишечного барьера возникают при воспалении, сопровождающемся микроциркуляторными нарушениями и ишемическими поражениями. Ультраструктурная картина

воспалительных изменений у гнотобиотических морских свинок наблюдалась нами при введении в петлю тонкой кишки энтеропатогенной кишечной палочки *Escherichia coli* 055 [22]. Этапы взаимодействия и БТ микроорганизмов *Candida albicans*, *E. coli* и эндотоксина с клеточными структурами КБ, включая микроворсинки, плазматическую мембрану и погружение в цитоплазму энтероцитов, прослежены с применением световой, трансмиссионной и сканирующей микроскопии в изолированной петле тонкой кишки у крыс и морских свинок [23]. Особенности взаимодействия этих микроорганизмов с энтероцитами заключались в погружении микробов в цитоплазму энтероцитов отличным от классического фагоцитоза способом. Интернированные микроорганизмы проникали через нарушенную плазматическую мембрану микроворсинок (щеточная кайма) в цитоплазму энтероцитов, но не были окружены плазматической мембраной, типичной для фагосом, и не отмечалось дегрануляции лизосом. В то же время межклеточного проникновения микроорганизмов через энтероцитарный барьер с раздвижением ПМС не наблюдалось. Одновременно отмечалась межэнтероцитарная миграция макрофагов. Прохождение микробных транслокаторов через базальную мембрану было быстрым и редко отслеживаемым процессом. Отмечалось явление экстрезии микроорганизмов через разрывы в базальной мембране с образованием микроабсцессов в собственной пластине. Здесь микроорганизмы фагоцитировались макрофагами, а также находились в свободном виде в лимфатических и кровеносных сосудах, в которых наблюдали и явления окклюзии. Транслокация эндотоксина происходила через энтероциты с последующей диффузией через собственную пластину и мышечную стенку кишки между миоцитами [23].

В антибактериальной резистентности кишечного барьера важную роль играет мукозный иммунитет хозяина с участием организованной лимфоидной ткани, связанной с кишечником (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT), и секреторных иммуноглобулинов (Immunoglobulin, Ig) класса А или М и механизмов оральной толерантности, способных модулировать или подавлять микробную колонизацию и пенетрацию потенциально опасных антигенов и патогенов [5, 17, 19]. У нокаутированных мышей в отсутствие секреторных IgА и IgМ-антител отмечено снижение эпителиальной барьерной функции и повышенное поступление антигенов пищевого и микробного (комменсалы) происхождения, что приводило к реакциям гиперчувствительности и системной анафилаксии [17]. Включающиеся механизмы супрессии с помощью регуляторных Т клеток (Treg) у таких животных исключают периферические реакции гиперчувствительности на антигены и аллергены пищевого и микробного происхождения. Антигенные пробы доставляются дендритными антигенпредставляющими клетками мукозы, ответственными за принятие иммунной системой решения в отношении судьбы антигенов и за связь между врожденным и адаптивным иммунитетом. Сенсорная функция мукозы реализуется с помощью рецепторных структур, обеспечивающих распознавание консервативных ММП.

Ответная реакция организма на слизистых оболочках проявляется механизмами колонизационной резистентности, обеспечивающей первую линию защиты от микробных патогенов. Принципиальная структура и схема взаимосвязи развития колонизационной резистентности, включающей клеточные и гуморальные факторы, под воздействием микробного пускового фактора (формирование индигенной микробиоты) при одновременном участии нейроэндокринной регуляции была предложена

нами на основе систематических исследований безмикробных и других категорий гнотобиотических животных различных видов [5]. Суммарный потенциал колонизационной резистентности складывается из реакций местного иммунитета и комплекса неспецифических антимикробных защитных и элиминирующих факторов и механизмов хозяина, включающих рН среды, бактерицидные пептиды, перистальтическую моторику, фагоцитарную и антимикробную активность макрофагов, клеток Панета и тучных клеток, секреторных иммуноглобулинов, цитокинов, таких как фактор некроза опухоли, интерфероны и другие клеточные агенты, в развитии которых микробиотический показатель играет важную роль. В запуске каскада реакций, сопровождающих воспалительную реактивность, ключевую роль играют клеточно-рецептурные структуры, и в первую очередь толл-подобные рецепторы (Toll-Like Receptors, TLR), из которых TLR4 принадлежит особая роль в функционировании ПМС [24]. TLR4 за счет непосредственного вовлечения в серотонинергическую нейротрансмиссию участвует в обеспечении центральных и периферических механизмов адаптации и устойчивости хозяина к стрессовому воздействию с участием иммунной, нервной и эндокринной систем. Их дисфункция сопровождается нейроэндокринными нарушениями, приводящими к тяжелой депрессии. Полагают, что дисфункция этих рецепторных структур вовлечена в патогенез депрессивных расстройств, вызванных эндогенными стрессовыми сигналами, что рекомендуется учитывать при фармакотерапии депрессивных состояний [25].

Барьерно-фиксирующая функция лимфоидной ткани и миелоидная фагоцитарная система

Систематически изученные барьерные свойства комплекса эпителиально-лимфоидных клеточных структур кишечника предложено объединить в единую барьерно-фиксирующую функцию лимфоидных тканей и органов [6]. По современным представлениям, эта функция обеспечивается поверхностными и глубокими лимфоидными структурами, включая слизистые оболочки, связанные с ними лимфоидные клетки, ткани и органы, а также фиксированные и циркулирующие фагоциты. При этом отмечается ее тесная связь с фагоцитарной структурой, включая систему мононуклеарных фагоцитов (СМФ) (ретикулоэндотелиальная система по старой терминологии, позднее ориентированная преимущественно на мононуклеарные фагоциты), с возрастающим вниманием и к полинуклеарным фагоцитам, что позволяет рассматривать их в комплексе как миелоидную фагоцитарную систему. Гнотобиологические модели проясняют роль микробиоты в постнатальном развитии этого сложного врожденного клеточного механизма защиты организма от инфекции.

Согласно методике В.М. Бермана, состояние барьерно-фиксирующей способности лимфоидной ткани экспериментально оценивается по возникновению и уровням бактериемии в различные интервалы времени после перорального или внутрикожного введения патогенных бактерий. Критерием эффективности такой защиты является показатель минимальной агрессивной дозы бактерий, представляющий наименьшее количество патогенных микроорганизмов, единичные представители которых обнаруживаются в крови уже спустя 30 мин после введения в кровоток (внутрисердечно или внутри-

венно). Например, при введении патогенных бактерий *E. coli* 055 гнотобиотическим и обычным морским свинкам и крысам в определенной для них минимальной агрессивной дозе у обычных животных возникала лишь незначительная транзиторная бактериемия, в то время как у гнотобиотических отмечалась массивная бактериемия и развивался сепсис, приводящий к гибели животных [5]. При бактериологическом исследовании гомогенатов региональных лимфатических узлов в первые 30 мин после инокуляции большие количества бактерий определялись у обычных животных, что может отражать повышенную фиксирующую способность региональной лимфоидной ткани последних. У гнотобиотов также отмечалась сниженная фиксирующая способность более глубоких барьерных систем, включая селезенку, печень и другие органы, вовлеченные в СМФ. Повышенное число бактерий, определяемое через 24 ч в селезенке и лимфатических узлах у гнотобиотов, объясняется размножением бактерий в условиях пониженной бактерицидно-фагоцитарной активности СМФ.

Электронно-микроскопические исследования показали, что на фоне выраженных нарушений микроциркуляции у гнотобиотических животных под воздействием бактерий *E. coli* 055 имеют место резкие нарушения целостности энтероцитарного барьера, играющие важную роль в БТ. Энтероцитарный барьер у обычных животных отличался значительно большей резистентностью как за счет клеточных компонентов, так и гуморальных факторов местного иммунитета, в которых важную роль играют IgA и копроантитела. Доказательство важности этих факторов получено при введении бактерий *E. coli* 055 с соответствующими антителами. При одновременном введении в петлю тонкой кишки бактерий *E. coli* 055 и соответствующей антисыворотки отмечалось покрытие микроворсинок слоем иммуноглобулинов, в то время как нарушений межэнтероцитарных контактов не наблюдалось. Сравнительные эксперименты на гнотобиотических и обычных животных показали, что барьерно-фиксирующая функция лимфоэпителиальных тканей носит адаптивный характер, и в ее формировании важнейшую роль играет микробиотический фактор [5].

Физиологические проявления воспаления и бактериемии в процессе микробной колонизации кишечника

В слизистой оболочке кишечника у обычных животных, контаминированных естественным путем, отмечается повышенная клеточная активность, проявляющаяся числом митозов. Наряду с другими изменениями (микроциркуляторными, цитохимическими и др.) этот процесс может рассматриваться как проявление мягкой воспалительной реакции, защитной в своей основе, возникающей в ответ на микробное воздействие в кишечнике. Нахождение граней между физиологическими и патологическими воспалительными реакциями в тканевых структурах, контактирующих с естественным микробиотическим окружением, несомненно, будет предметом дальнейших исследований в экспериментальной и теоретической патологии. Очевидно, что общепринятое понятие нормы требует углубленного методологического анализа с учетом постоянного динамического взаимодействия организма хозяина с пусковыми факторами среды, важнейшим компонентом которых являются микробиотические: их также можно рассматривать в качестве экспозом (сумма факторов среды как экзогенных, так и

эндогенных), с воздействием которых организм хозяина сталкивается на протяжении жизненного цикла [26]. В этом отношении гнотобиотические модели обеспечивают уникальный биологический инструмент и дополнительный контроль в изучении сложной цепи взаимодействия про- и эукариотических организмов.

Физиологические явления комменсальной БТ и бактериемии совпадают по времени с повышенной проницаемостью кишечного тракта новорожденных и сопровождаются развитием мукозного воспаления. Необходимо отметить общебиологическое значение БТ, которое не является простым пассивным процессом, а предусматривает активный микробный забор (Sampling) с участием фагоцитирующих клеток и опсонических гуморальных факторов (комплемента, антитела и др.). В механизмах мукозного иммунитета и взаимодействия с кишечными бактериями и лимфоидной тканью, ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника, в частности с Пейеровыми фолликулами, особую роль играют так называемые М клетки [27, 28]. Их способность к эндоцитозу кишечных бактерий повышается при участии гликопротеина 2, играющего определенную опсонизирующую роль и стимулирующего мукозный иммунный ответ [29, 30].

Одновременно в поддержании микроэкологического гомеостаза и обеспечении колонизационной резистентности на мукозных поверхностях кишечника важную роль выполняют клетки Панета, располагающиеся в кишечных криптах. Благодаря синтезируемым антимикробным пептидам и другим соединениям, основным из которых является лизоцим, а также ряда сигнальных молекул, они контролируют количество и состав микроорганизмов в криптах тонкой кишки и защищают стволовые клетки кишечника от микробных патогенов [31–33].

Актуальность вопросов БТ в практическом отношении особенно возросла в связи с ростом внимания к проблеме сепсиса у новорожденных, особенно в условиях недоношенности и связанных с этим дефектов иммунной защиты и кишечных барьерных механизмов. Роль БТ из кишечника в патологическом аспекте рассматривается также в концепции механизмов и источников системных инфекций и осложнений в виде сепсиса и дисфункции множественных органов (ДМО) у больных разного возраста. Это наблюдается при массивных хирургических вмешательствах. Развитие ДМО объясняется повреждением тканей кишечника, системным распространением, влиянием немикробных факторов тканевой природы [8, 34], которые проникают в кровообращение через лимфатическую систему кишечника. Понимание патофизиологических особенностей этого процесса помогает выработке правильной стратегии терапии ДМО. В этиопатогенезе ДМО и синдрома острого респираторного дистресса необходимо учитывать лимфогенное распространение небактериальных токсических факторов тканевой природы кишечного происхождения, что объясняет гипотезу о кишечно-лимфогенном патогенезе ДМО [8]. По этой причине, согласно закономерностям кровотока, лимфа, оттекающая из кишечника, минуя печень, через грудной проток и подключичную вену первоначально попадает в сердце и легкие, которые являются первыми отдаленными органами, подверженными воздействию мезентериальной лимфы. Именно поэтому первыми органами, в которых развивается недостаточность, являются легкие.

О роли кишечника и повышении его проницаемости как источника миграции таких бактерий, как *E. coli*, с последующим развитием эндотоксинемии и эндотоксического шока сообщали еще в середине прошлого века

[2, 35]. Позже, с углублением представлений о синдроме полиорганной недостаточности ведущее значение в патогенезе синдрома стали придавать роли кишечника и нарушению его барьерной функции [36]. Механизмами нарушения барьерной способности слизистой оболочки кишечника при шоке рассматриваются гипоксические процессы в органе, обеспечивающие транслокацию бактерий и эндотоксинов с последующим развитием синдрома полиорганной недостаточности.

Благодаря исследованиям в области молекулярной биологии клеточных рецепторов в последние годы возрастает внимание к анализу рецепторно-сигнальных путей ответных реакций организма хозяина, в частности рецепторов распознавания ММП, среди которых выделяются TLR, NOD (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain), вовлеченные в генез функциональных нарушений энтероцитарного барьера. Показано, что TLR9, распознающие ДНК патогенных бактерий, расположенные на апикальных поверхностях ворсинок толстой кишки у обычных мышей, у безмикробных животных отсутствуют. Повышение экспрессии TLR9 имеет значение для развития воспаления под воздействием ДНК патогенных бактерий [37].

ММП, высвобождающиеся в процессе воспаления при фагоцитозе, активируют цитозольные рецепторы распознавания патогенов и различные TLR, что в значительной степени предопределяет направление последующих сигналов. Накопление этих продуктов в инфламмосах вызывает обострение воспалительного ответа и смерть воспалительных клеток [38]. Важное значение придается активации TLR4 под влиянием бактериального эндотоксина, сопровождающего БТ, приводящего к системному сепсису. В этой связи возможность ограничения сигнальной активности TLR4 в кишечнике рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень для предотвращения некротизирующего заболевания кишечника, в частности у недоношенных новорожденных [39]. Рецепторы инфламмосом, распознающие молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами, запускают каскадный антиинфекционный протективный механизм, включающий ответную активацию интерлейкинов 1 β и 18, каспазы 1 и 11, пироптоз (провоспалительный и литический способ клеточной смерти) [40].

Сдвиги в составе кишечной микробиоты могут влиять на метаболизм хозяина и приводить к заболеваниям, включая ожирение. Повышенная чувствительность к кишечным патогенам наблюдается при дефиците лептина у мышей. Главный механизм влияния хозяина на кишечный микробиом обеспечивается клетками Панета, секретирующими антимикробные пептиды. Установлена сигнальная роль лептиновых рецепторов энтероцитов, контролирующей кишечный микробиом независимо от потребления пищи [41].

В экспериментах на мышах FVB/N под влиянием *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) и *Bifidobacterium longum* отмечен некоторый протективный эффект лакто- и бифидобактерий в отношении развития сепсиса после перевязки слепой кишки, что проявлялось снижением показателей бактериемии, маркеров апоптоза в колоноцитах и смертностью [42]. Протективный эффект пробиотиков в отношении развития сепсиса и некротизирующего колита у новорожденных группы риска объясняется также конкурентным исключением потенциальных патогенов.

В защитных механизмах наиболее распространенных пробиотиков, таких как *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, подчеркивается роль вырабатываемых ими кислот (молочной, уксусной и пропионовой), обеспечивающих под-

держание низких уровней pH в определенных отделах желудочно-кишечного тракта, что подавляет рост различных патогенных бактерий и способствует восстановлению микробиологического баланса в кишечной микробиоте. Определенная ингибирующая и регулирующая роль бифидобактерий по отношению к другим представителям микрофлоры, таким как кишечная палочка, проявлялась в условиях диассоциации гнотобиотических мышей с бифидобактериями и кишечной палочкой [43]. Показано, что смесь молочнокислых пробиотиков предотвращала нарушение эпителиального барьера, вызываемого липополисахаридами, стрессом и другими факторами, и укрепляла ПМС [44]. Кроме того, в процессе реакции на микробные продукты в организме хозяина происходило усиление мукозного IgA-ответа и системного иммунитета [45].

В то же время, учитывая возможные побочные эффекты пробиотикотерапии в виде бактериемии, фунгемии и сепсиса, регулярное применение пробиотиков при тяжелых клинических ситуациях, сопряженных с развитием септических осложнений, в целом не рекомендуется [46]. По мнению Американской академии педиатрии, убедительных доказательств в необходимости повседневного профилактического применения пробиотиков для всех новорожденных до сих пор нет, но ожидаемые результаты проводимой мультицентровой оценки безопасности и эффективности живых микроорганизмов для предотвращения нозокомиального сепсиса у критически недоношенных новорожденных вызывают интерес [45].

Микроциркуляторные нарушения при ишемии и воспалении

Важнейшим начальным патогенетическим звеном развития воспаления являются нарушения микроциркуляции крови, приводящие к ишемизации тканей и органов, чередуемой с реперфузией. Последующее развитие воспаления связано с каскадом био- и цитохимических реакций, участием цитокинов и других факторов воспаления, таких как цитозольный адаптерный белок MyD88, каспазы, инфламмосомы. Патогенетическая значимость MyD88 подтверждена тем, что у мышей, дефицитных по этому фактору, при ишемическом/реперфузионных нарушениях в кишечнике или легких снижались проявления воспаления, что также связывалось с торможением выработки фактора некроза опухоли и интерлейкина 1 β , при этом выживаемость животных повышалась [47]. Сигнальные процессы, реализуемые через клеточно-специфическую молекулу MyD88, одновременно приводят к индукции, хемотаксису и накоплению нейтрофилов, что указывает на центральную роль этого сигнального белка, а также на возможность его использования в качестве терапевтической мишени [48].

Нарушения микроциркуляции в очагах воспаления в кишечнике, выражающиеся чередованием ишемизации и реперфузии тканей, приводят к повреждению поверхностных эпителиальных клеток, в результате чего с ними связываются натуральные антитела, и активизируется система комплемента. Это приводит к активизации, хемотаксису и эмиграции воспалительных клеток, таких как нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты в пораженном кишечнике, что в свою очередь усиливает нарушения, вызванные ишемическо-реперфузионными воздействиями. В этих условиях устранение кишечной микробиоты с помощью антибиотиков оказывает определенный терапевтический эффект: уменьшается лимфоидная ткань, снижаются от-

ложения иммуноглобулинов и комплемента, ослабляется воспаление и повышается целостность КБ [49]. Обосновываются необходимость дальнейших исследований механизмов регуляции комменсальной микробиоты и воспалительного ответа при ишемическо-реперфузионном повреждении кишечника, а также поиски методов терапевтической манипуляции кишечной микробиотой с помощью пробиотиков, антибиотиков и др., что позволит улучшить прогноз критически больных с ишемическими повреждениями кишечника.

При стойкой вазоконстрикции в сосудах кишечника могут развиваться гипоксические явления в слизистой оболочке и морфологические повреждения в первую очередь ворсинок кишечника, которые особенно чувствительны к снижению кровотока и/или гипоксии. При септическом шоке и подобных ситуациях имеется высокая вероятность нарушения микроциркуляции и развития гипоксии слизистой оболочки кишечника. В свою очередь, вещества, образуемые вследствие септического повреждения, и возникающая выраженная эндотоксемия могут по принципу порочного круга дополнительно вызывать в кишечнике локальные нарушения микроциркуляции, усиливать гипоксические повреждения слизистой оболочки и понижать ее барьерную способность.

В клинических условиях выраженное нарушение проницаемости кишечника наблюдается в результате тяжелой ожоговой травмы, геморрагического шока, других тяжелых травматических повреждений. Считается, что БТ из кишечника идет преимущественно в направлении мезентериальных лимфатических узлов, в связи с чем результаты посевов крови часто бывают негативными. Отчасти этим, а также ранним применением антибиотиков объясняется отсутствие убедительных доказательств корреляции септических осложнений и БТ. В то же время распространением бактериальных транслатов по лимфатической системе и грудному потоку через венозную кровь системы полых вен объясняется возможность первичного поражения легких транслируемыми из кишечника бактериями, минуя систему воротной вены и печень [34]. Патогенез тканевых повреждений с последующей БТ описывается как феномен двойного удара [50], при котором шок различной природы выступает как подготовительный удар, а сопровождающая его тканевая ишемия модулирует последующий воспалительный ответ организма на воздействие бактерий или эндотоксинов.

Считается, что клинически выявляемая БТ и изменение интестинальной проницаемости являются независимыми процессами. Кишечные бактерии или эндотоксины могут индуцировать или усиливать развитие системного воспалительного каскада, не достигая портального кровотока. Корреляция между выживаемостью и степенью БТ в большей степени определяется по силе воспалительных изменений. В то же время имеются клинические доказательства взаимосвязи БТ и сепсиса. Так, связь БТ с развитием септических проявлений, вызванных микроорганизмами *Klebsiella oxytoca*, наблюдалась как осложнение неоперабельного аппендицита даже у иммунокомпетентных детей [51].

Гнотобиологические модели в изучении проблем транслокации

Принято считать, что для преодоления КБ популяция микроорганизмов должна достигать 10^9 , однако это не является общим правилом, так как проницаемость, помимо агрессивных свойств микроорганизмов, зависит и от

сопутствующих факторов, включая состояние организма хозяина и его защитных систем, изменяющихся с возрастом, а также других факторов, определяющих так называемую колонизационную резистентность. В экспериментах с участием В.Н. Андреева на молодых безмикробных морских свинках установлено, что БТ имеет место как в раннем периоде после рождения, так и в отношении представителей нормальной кишечной микрофлоры, включающих *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Staphylococcus albus* и *Streptococcus faecalis* [5]. Показана различная степень проницаемости кишечника в зависимости от скорости размножения изучаемых микроорганизмов. Уже спустя одни сут после моноассоциации количество микроорганизмов на 1 г фекалий для разных видов микроорганизмов составляло, соответственно, 10^5 – 10^6 для *B. subtilis*, 10^7 для *B. mesentericus*, 10^7 – 10^8 для *S. albus*, 10^9 для *S. faecalis*. При этом транслокация и незначительные уровни бактериемии (10^2 – 10^3) определялись при моноассоциациях со всеми указанными микроорганизмами, популяция которых в кишечнике в условиях моноассоциации превышала 10^6 , кроме *B. subtilis*, которые появлялись лишь на 2–е сут. Присутствие этих микроорганизмов в первую очередь отмечалось в региональных (мезентериальных) лимфатических узлах, а позднее и в селезенке. Таким образом, эти микроорганизмы способны проникать из кишечника в региональные и более глубокие барьерные органы СМФ, что имеет физиологический смысл, обеспечивая иммунобиологическую адаптацию макроорганизма к микробной среде и развитие натурального иммунитета. Снижение барьерно-фиксирующей функции лимфоидной ткани у гнотобиотов обуславливает развитие прогрессирующей бактериемии при парентеральном или пероральном введении энтеропатогенных бактерий *E. coli*. При этом различия в транслокации патогенных бактерий заключались в выраженном повреждении межэнтероцитарных соединений и межэпителиальном проникновении бактерий из кишечника гнотобиотов, в то время как у обычных животных отмечалось внутриэпителиальное проникновение бактерий, вовлекающее механизмы эндоцитоза [22].

Повышенная транслокация патогенных бактерий в случае массивной бактериальной колонизации кишечника сопряжена с развитием воспаления, важным патогенетическим звеном которого являются микроциркуляторные нарушения. Выраженные изменения микроциркуляции возникают в различных барьерных системах у гнотобиотов в ответ на микробное воздействие, что было наглядно продемонстрировано при сравнительном электронно-микроскопическом исследовании состояния энтероцитарного барьера в кишечнике и аэрогематического — в легких у гнотобиотических и обычных животных [5, 22]. При этом показана протективная роль иммуноглобулинов, выполняющих в том числе и функцию опсоинов при эндоцитозе микробных клеток энтероцитами. Для уточнения роли микроциркуляторных нарушений в повышении проницаемости кишечника для патогенных бактерий типа *E. coli* 055 были проведены эксперименты с введением бактерий в изолированную петлю кишечника у безмикробных морских свинок [5]. Одной группе животных в изолированный отрезок тонкой кишки вводили суспензию бактерий *E. coli* 055, второй — бактерии после предварительной опсонизации соответствующей антисывороткой. Животным третьей группы вводили типичный индуктор воспаления — 0,1% раствор гистамина. В последующих электронно-микроскопических исследованиях препаратов тонкой кишки установлено, что спустя 3 ч после введения бактерий *E. coli* 055 у гнотобиотов имели место резкие микроциркуля-

торные и гемореологические нарушения. Эти изменения проявлялись резким (в 2–3 раза) расширением сосудов, утончением их стенок, локальными нарушениями мембран эндотелиальных клеток, повышением проницаемости сосудов, явлениями отека и деструкции энтероцитов с признаками гемостаза в капиллярах. Аналогичные изменения наблюдались и после введения гистамина, за исключением резкого расширения сосудов у гнотобиотов. При опсонизации бактерий антисывороткой патологических изменений в ультраструктуре энтероцитов и нарушений микроциркуляции в кишечнике гнотобиотов не наблюдалось. Вводимые иммуноглобулины хорошо адсорбировались на поверхности микроворсинок энтероцитов и фиксировали тела кишечных палочек [22]. Основываясь на данных комплексных бактериологических, гистологических, биомикроскопических и электронно-микроскопических исследований, механизмы нарушения проницаемости энтероцитарного барьера для энтеропатогенных микроорганизмов типа *E. coli* 055 представляются в виде сложной цепной реакции. Она начинается с воздействия бактерий и энтеротоксинов на сосуды прямо или опосредованно через дегрануляцию тучных клеток и высвобождение вазоактивных веществ типа гистамина, вызывающих микроциркуляторные и гемореологические нарушения. Повышение проницаемости сопровождается выходом жидкости из просвета сосудов, что в свою очередь приводит к нарушению межклеточных контактов и целостности кишечного барьера. Это указывает на важную роль состояния реактивности микрососудов в местных и системных адаптационных реакциях организма на микробное воздействие со стороны кишечника.

Учитывая важную роль микроциркуляторного кровообращения в формировании адаптационно-защитных, в частности воспалительных, реакций на воздействие микроорганизмов на слизистых оболочках, в том числе в кишечнике, интерес представляет изучение особенностей реактивности и проницаемости микрососудов у безмикробных животных к таким медиаторам воспаления, как гистамин и адреналин. В биомикроскопических исследованиях показаны особенности микроциркуляции, реактивности и проницаемости микрососудов брыжейки безмикробных и конвенциональных крыс линии *Wistar* на эти вазоактивные препараты [5, 52, 53]. На модели острых нарушений микроциркуляции под влиянием аппликации на брыжейке кишечника одного из типичных медиаторов воспаления гистамина у обычных крыс в микрососудах наблюдалось замедление кровотока вплоть до развития явлений стаза, что проявлялось типичной реакцией «просветления» микрососудов. У крыс-гнотобиотов для достижения подобной реакции требовалось повышение дозы гистамина примерно в 10 раз. Аналогичные реакции были выявлены и на адреналин, дозу которого для воспроизведения типичного для обычного животного эффекта «стаза» необходимо было увеличивать в 3–5 раз. Таким образом, показаны пониженная чувствительность микрососудов брыжейки кишечника животных в отсутствии микробной флоры на вазоактивные вещества и повышенная проницаемость микрососудов на фоне снижения их реактивности.

Перспективные направления исследований

Явления транслокации кишечной микробиоты, в том числе и представителей комменсальных микроорганизмов, наблюдаются как в случае различных нарушений

барьерной функции (например, при иммунодефицитных состояниях), так и в физиологических условиях, что может сопровождать процессы естественного иммуногенеза. Отдельным важным, но еще малоизученным процессом транслокации комменсальных кишечных микроорганизмов наряду с иммунными факторами молозива и материнского молока являются связь кишечника с молочными железами материнского организма и осуществление последующей передачи их новорожденному. В последние годы стало известно, что большинство бифидобактерий, колонизирующих кишечник новорожденных, представлены материнскими штаммами бифидобактерий, присутствующих в грудном молоке. Было показано, что преобладающими видами бифидобактерий были *B. longum* (77% случаев), *B. bifidum* (26%), *B. catenulatum* (15%) и *B. breve*. При этом концентрация бифидобактерий в мл грудного молока достигала $1,4 \times 10^3$, концентрация бифидобактерий в 1 л молока — $7,5 \times 10^5$ [54]. Дополнительными исследованиями показана генетическая связь материнской кишечной бифидофлоры с аналогичной системой новорожденного, причем пробиотики, используемые матерью, значительного влияния на эту связь не оказывали [55]. Секвенирование и анализ геномов бифидобактерий позволили обнаружить гены, детерминирующие продукцию ферментов, расщепляющих олигосахариды грудного молока, что обеспечивало их жизнеспособность в естественной молочной среде. Именно поэтому выделяемые штаммы являются хорошими кандидатами пробиотиков [56].

Механизмы транслокации и появления кишечных симбионтов в молочных железах, активизируемые во время беременности и лактации, еще не до конца ясны, однако биологическая целесообразность этого явления очевидна. В период лактации происходит перенос клеток фагоцитов из лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником, к грудным железам через лимфатические и периферические кровеносные сосуды. Показано, что бактериальная транслокация представляет уникальное физиологическое событие, нарастающее с течением беременности и лактации. Это обеспечивает иммунный импринтинг новорожденных с помощью фагоцитов — носителей комменсальных бактерий матери — и их молекулярных паттернов, содержащихся в грудном молоке [57].

Из кишечника через материнские молочные железы транслокация некоторых симбионтов, в частности бифидобактерий и лактобацилл, способствует установлению бифидофлоры и кисломолочной кишечной микробиоты, а также развитию иммунной системы новорожденного, что важно для понимания возможностей иммунобиологической модуляции и коррекции в терапевтических и профилактических целях. В качестве векторов-транспортеров таких транслокатов служат дендритные и другие клетки СМФ. Дендритные клетки могут пенетрировать через эпителий толстой кишки, захватывать комменсальные бактерии, которые при этом могут сохранять жизнеспособность в течение нескольких дней. В эксперименте на лабораторных животных было показано, что миграция дендритных клеток ограничивалась преимущественно мезентеральными лимфатическими узлами. Известно, что при беременности и лактации повышается экспрессия MadCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1), представляющего собой молекулы адгезии лимфоидных образований на слизистых оболочках, в том числе в протоках молочных желез, что привлекает иммунные клетки, происходящие из лимфоидных тканей кишечника. В этих механизмах помимо адресина-1 играет роль и молекула-1 адгезии ангиоцитов VCAM-1 (Vascular

Cell Adhesion Molecule-1), а также хемокин мукозного эпителия CCL28 [58]. Во время беременности и лактации активизируются циркуляция иммунных клеток и их проникновение в молочную железу. Этот процесс может быть связан с механизмами хоминг-эффекта и распространения иммунокомпетентных клеток в процессе формирования мукозной иммунной системы и лимфоидной ткани слизистых оболочек новорожденного, что требует дальнейшего изучения.

Повышенное внимание исследователей к углубленному изучению барьерных структур и механизмов проницаемости кишечника для микроорганизмов привлечено в связи с пониманием и признанием важной роли микробиоты, и особенно комменсальных представителей микрорекологической среды как одних из основных детерминант иммунных реакций организма [53]. Эти вопросы напрямую связаны с КБ, его проницаемостью для микроорганизмов и их продуктов, и также требуют углубленных комплексных исследований как с профилактической, так и лечебной точки зрения [59]. Для их успешного осуществления необходимы новые комплексные подходы с использованием новейших методов микробиологии, иммунологии, патологии, биохимии и др. Среди перспективных направлений отмечаются исследования молекулярно-клеточных и рецепторно-сигнальных путей и механизмов в процессах микробной колонизации кишечника и взаимодействия специализированных клеточных структур энтероцитарного барьера с ММП, запускающих каскадные механизмы воспалительных и других ответных реакций организма.

В числе ранних проявлений воспаления отмечаются микроциркуляторные реакции и их нарушения, проявляющиеся чередованием ишемии и реперфузии и приводящие к гипоксии и тканевым повреждениям. Эти процессы тесно связаны с нарушениями проницаемости и образованием дефектов в КБ, способствующими БТ и развитию локальных и системных воспалительных реакций, размеры и специфика которых определяется многими факторами — как организма хозяина, так и микробиоты. Важным патогенетическим звеном при этом является повышенный апоптоз и замедленное очищение макроорганизма от апоптотических клеток

кишечника, что усиливает воспаление и замедляет репаративные процессы [60]. В естественном клиренсе от них играет существенную роль молочнокисло-эпидермальный ростовой фактор 8 (MFG-E8). В экспериментах на модели ишемии кишечника у мышей, сопровождающейся развитием воспалительной реакции, введение рекомбинантного MFG-E8 показало значительное повышение клиренса от апоптотических клеток, уменьшение БТ в региональные лимфоузлы, снижение нейтрофильной инфильтрации и ускорение регенеративных процессов [60]. Большой интерес представляют дальнейшие изучения микроциркуляторных нарушений тканей кишечника как основной причины ишемических нарушений, способствующей развитию воспалительных реакций. Биомикроскопическими исследованиями микроциркуляторных изменений в брыжейке кишечника крыс, вызванных гистамином, одним из типичных медиаторов воспаления экспериментально показана потенциальная профилактическая и лечебная перспективность глицина и, возможно, других натуральных метаболитов при нарушениях микроциркуляции [52].

В изучении влияния микробиоты на формирование и активность врожденного иммунитета организма хозяина, в том числе барьерные способности кишечника и другие аспекты взаимодействия (включая возможности транслокации материнских кишечных комменсалов с грудным молоком новорожденному), перспективны комплексные микробиологические, иммунологические, патофизиологические и другие исследования с использованием адекватных биомоделей, включая гнотобиотов.

Источник финансирования

Проведенное исследование осуществлено на личные средства авторов.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Jager S, Stange EF, Wehkamp J. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg*. 2013;398(1):1–12. doi: 10.1007/s00423-012-1030-9
- Schweinburg FB, Seligman AM, Fine J. Transmural migration of intestinal bacteria; a study based on the use of radioactive *Escherichia coli*. *N Engl J Med*. 1950;242(19):747–751. doi: 10.1056/NEJM195005112421903.
- Luckey T. Germ-free life and gnotobiology, Acad. Press, New York, London. 1963.252 c.
- Berg R. Factors influencing the translocation of bacteria from the gastrointestinal tract. *Recent advances in germfree research, Editors: Sasaki, S., Ozawa, A., and Hashimoto, K., Tokai University Press, Tokyo*. 1981. P.411–418.
- Подопригора ГИ. Медицинская гнотобиология. М.: МИА. 2003. 272 с.
- Берман ВМ. Барьерфиксирующая функция организма в явлениях инфекции и иммунитета. В кн.: Вопросы возрастной иммунологии. Под ред. В.М. Бермана. Л. 1947. С. 7–50.
- Wang L, Llorente C, Hartmann P, Yang AM, Chen P, Schnabl B. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J Immunol Methods*. 2015;421:44–53. doi: 10.1016/j.jim.2014.12.015.
- Deitch EA. Gut-origin sepsis: evolution of a concept. *Surgeon*. 2012;10(6):350–356. doi: 10.1016/j.surge.2012.03.003.
- Da Silva S, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A, Mancuso A, Mercade-Loubiere M, Salvador-Cartier C, et al. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307(4):G420–429. doi: 10.1152/ajpgi.00290.2013.
- Zuhl MN, Lanphere KR, Kravitz L, Mermier CM, Schneider S, Dokladny K, et al. Effects of oral glutamine supplementation on exercise-induced gastrointestinal permeability and tight junction protein expression. *J Appl Physiol (1985)*. 2014;116(2):183–191. doi: 10.1152/jappphysiol.00646.2013.
- Soares AD, Costa KA, Wanner SP, Santos RG, Fernandes SO, Martins FS, et al. Dietary glutamine prevents the loss of intestinal barrier function and attenuates the increase in core body temperature induced by acute heat exposure. *Br J Nutr*. 2014;112(10):1601–1610. doi: 10.1017/S0007114514002608.
- Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, Ross RP. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut Microbes*. 2013;4(1):4–16. doi: 10.4161/gmic.22371.

13. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottiere HM, Raes J, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*. 2013;62(1):146–158. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301805.
14. Thomas LV, Ockhuizen T, Suzuki K. Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: a symposium report. *Br J Nutr*. 2014;112 Suppl 1:S1–18. doi: 10.1017/S0007114514001275.
15. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1157–1170. PMC98942.
16. Abrahamsson TR, Wu RY, Jenmalm MC. Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatr Res*. 2015;77(1–2):214–219. doi: 10.1038/pr.2014.165.
17. Brandtzaeg P. Homeostatic impact of indigenous microbiota and secretory immunity. *Benef Microbes*. 2010;1(3):211–227. doi: 10.3920/BM2010.0009.
18. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Vannucci L, Tuckova L, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(2):110–120. doi: 10.1038/cmi.2010.67.
19. Assimakopoulos SF, Papageorgiou I, Charonis A. Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2011;2(6):123–137. doi: 10.4291/wjgp.v2.i6.123.
20. Furuse M, Izumi Y, Oda Y, Higashi T, Iwamoto N. Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers*. 2014;2:e28960. doi: 10.4161/tisb.28960.
21. Carter SR, Zahs A, Palmer JL, Wang L, Ramirez L, Gamelli RL, et al. Intestinal barrier disruption as a cause of mortality in combined radiation and burn injury. *Shock*. 2013;40(4):281–289. doi: 10.1097/SHK.0b013e3182a2c5b5.
22. Чернух АМ, Подопригора ГИ, Кранчев АК. Изучение путей проникновения бактерий *E. coli* 055 через стенку кишечника у гнотобиотических и обычных животных. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1978;86(6):654–657.
23. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, et al. The process of microbial translocation. *Ann Surg*. 1990;212(4):496–510; discussion 511–492. PMC1358286.
24. Liaunardy-Jopeace A, Gay NJ. Molecular and cellular regulation of toll-like receptor-4 activity induced by lipopolysaccharide ligands. *Front Immunol*. 2014;5:473. doi: 10.3389/fimmu.2014.00473.
25. Liu J, Buisman-Pijlman F, Hutchinson MR. Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. *Front Neurosci*. 2014;8:309. doi: 10.3389/fnins.2014.00309.
26. Bogdanos DP, Smyk DS, Invernizzi P, Rigopoulou EI, Blank M, Pouria S, et al. Infectome: a platform to trace infectious triggers of autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013;12(7):726–740. doi: 10.1016/j.autrev.2012.12.005.
27. Owen RL, Apple RT, Bhalla DK. Morphometric and cytochemical analysis of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes. *Anat Rec*. 1986;216(4):521–527. doi: 10.1002/ar.1092160409.
28. Gebert A, Fassbender S, Werner K, Weissferdt A. The Development of M Cells in Peyer's Patches Is Restricted to Specialized Dome-Associated Crypts. *The American Journal of Pathology*. 1999;154(5):1573–1582. doi: 10.1016/s0002-9440(10)65410-7.
29. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*. 2009;462(7270):226–230. doi: 10.1038/nature08529.
30. Ohno H, Hase K. Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut Microbes*. 2010;1(6):407–410. doi: 10.4161/gmic.1.6.14078.
31. Быков ВЛ. Клетки Панета: история открытия, структурные и функциональные характеристики и роль в поддержании гомеостаза в тонком кишечнике. *Морфология*. 2014;145(1):67–80.
32. Chassaing B, Kumar M, Baker MT, Singh V, Vijay-Kumar M. Mammalian gut immunity. *Biomed J*. 2014;37(5):246–258. doi: 10.4103/2319-4170.130922.
33. Saxena M, Yeretssian G. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front Immunol*. 2014;5:327. doi: 10.3389/fimmu.2014.00327.
34. Deitch EA. Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1207 Suppl 1:E103–111. doi: 10.1111/j.1749–6632.2010.05713.x.
35. Evans WE, Darin JC. Effect of enterectomy in endotoxin shock. *Surgery*. 1966;60(5):1026–1029.
36. Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV. Multiple-organ-failure syndrome. *Arch Surg*. 1986;121(2):196–208.
37. Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill TA, Obermeier F, Krause DO, Madsen KL. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun*. 2007;75(5):2572–2579. doi: 10.1128/IAI.01662-06.
38. Moretti J, Blander JM. Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes. *Curr Opin Immunol*. 2014;26:100–110. doi: 10.1016/j.coi.2013.11.003.
39. Hackam DJ, Good M, Sodhi CP. Mechanisms of gut barrier failure in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors throw the switch. *Semin Pediatr Surg*. 2013;22(2):76–82. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2013.01.003.
40. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014;157(5):1013–1022. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007.
41. Rajala MW, Patterson CM, Opp JS, Foltin SK, Young VB, Myers MG, Jr. Leptin acts independently of food intake to modulate gut microbial composition in male mice. *Endocrinology*. 2014;155(3):748–757. doi: 10.1210/en.2013-1085.
42. Khailova L, Frank DN, Dominguez JA, Wischmeyer PE. Probiotic administration reduces mortality and improves intestinal epithelial homeostasis in experimental sepsis. *Anesthesiology*. 2013;119(1):166–177. doi: 10.1097/ALN.0b013e318291c2fc.
43. Podoprigora G, Comunian L, Pimentel E, Moura L, Cara D, Nicoli J, et al. Stimulatory effect of Bifidobacteria on the host mononuclear phagocyte system using gnotobiotic animal models. *Anaerobe*. 1999;5(3):509–512.
44. Neboot-Vivinus M, Harkat C, Bziouche H, Cartier C, Plichon-Dainese R, Moussa L, et al. Multispecies probiotic protects gut barrier function in experimental models. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):6832–6843. doi: 10.3748/wjg.v20.i22.6832.
45. Nair V, Soraisham AS. Probiotics and prebiotics: role in prevention of nosocomial sepsis in preterm infants. *Int J Pediatr*. 2013;2013:874726. doi: 10.1155/2013/874726.
46. Theodorakopoulou M, Perros E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Dimopoulos G. Controversies in the management of the critically ill: the role of probiotics. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42 (Suppl):S41–44. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.04.010.
47. Victoni T, Coelho FR, Soares AL, de Freitas A, Secher T, Guabiraba R, et al. Local and remote tissue injury upon intestinal ischemia and reperfusion depends on the TLR/MyD88 signaling pathway. *Med Microbiol Immunol*. 2010;199(1):35–42. doi: 10.1007/s00430-009-0134-5.
48. Muhlbauer M, Perez-Chanona E, Jobin C. Epithelial cell-specific MyD88 signaling mediates ischemia/reperfusion-induced intestinal injury independent of microbial status. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(13):2857–2866. doi: 10.1097/01.MIB.0000435445.96933.37.
49. Yoshiya K, Lapchak PH, Thai TH, Kannan L, Rani P, Dalle Lucca JJ, et al. Depletion of gut commensal bacteria attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301(6):G1020–1030. doi: 10.1152/ajpgi.00239.2011.

50. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg.* 1992;216(2):117–134. PMC1242583.
51. Gortani G, Gregori M, Giannotta A, Barbi E. A «shocking» appendicitis. *Pediatr Emerg Care.* 2013;29(2):233–234. doi: 10.1097/PEC.0b013e318280d80c.
52. Подопригра ГИ, Нарциссов ЯР. Влияние глицина на микроциркуляцию в сосудах брыжейки крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2009;147:279–283.
53. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014;157(1):121–141. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011.
54. Gronlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Gronroos T, Salminen S, et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy.* 2007;37(12):1764–1772. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02849.x.
55. Gronlund MM, Grzeskowiak L, Isolauri E, Salminen S. Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant. *Gut Microbes.* 2011;2(4):227–233. doi: 10.4161/gmic.2.4.16799.
56. Fernandez L, Langa S, Martin V, Maldonado A, Jimenez E, Martin R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):1–10. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.001.
57. Donnet-Hughes A, Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, et al. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(3):407–415. doi: 10.1017/S0029665110001898.
58. Boumahrou N, Chevalere C, Berri M, Martin P, Bellier S, Salmon H. An increase in milk IgA correlates with both pIgR expression and IgA plasma cell accumulation in the lactating mammary gland of PRM/Alf mice. *J Reprod Immunol.* 2012;96(1–2):25–33. doi: 10.1016/j.jri.2012.08.001.
59. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability — a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:189. doi: 10.1186/s12876-014-0189-7.
60. Wu R, Dong W, Wang Z, Jacob A, Cui T, Wang P. Enhancing apoptotic cell clearance mitigates bacterial translocation and promotes tissue repair after gut ischemia-reperfusion injury. *Int J Mol Med.* 2012;30(3):593–598. doi: 10.3892/ijmm.2012.1044.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Подопригра Геннадий Игнатьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, директор НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии
Адрес: 115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14, тел.: +7 (495) 327-49-87, e-mail: gipodoprighora@yandex.ru

Кафарская Людмила Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Адрес: 115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14, тел.: +7 (495) 327-49-87, e-mail: likmed@mail.ru

Байнов Николай Алексеевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Адрес: 115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14, тел.: +7 (495) 327-49-87, e-mail: vonib@mail.ru

Шкопоров Андрей Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Адрес: 115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14, тел.: +7 (495) 327-49-87, e-mail: a.shkoporov@gmail.com

DOI: 10.15690/vramn548

Л.М. Самоходская¹, Е.Е. Старостина¹, Е.Б. Яровая¹, Т.Н. Краснова^{1, 2},
Н.А. Мухин^{1, 2}, В.А. Ткачук¹, В.А. Садовничий¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Математическая модель прогноза скорости фиброза печени у больных с хроническим гепатитом С на основе комбинаций геномных маркеров

Обоснование. В настоящее время большое внимание уделяется поиску генетических факторов, объясняющих течение хронического гепатита С (ХГС). **Цель исследования:** оценить прогностическую значимость носительства комбинаций аллельных вариантов генов IL 1b, IL 6, IL 10, TNF α, HFE, TGF b, ATR1, NOS3, CYBA, AGT, MTHFR, FII, FV, FVII, FXIII, ITGA2, ITGB3, FBG, PAI на прогрессирование фиброза печени при ХГС. **Материалы и методы:** 118 пациентов с ХГС разделены на группы с быстрым и медленным (скорость фиброза ≥0,13 и <0,13 ед. фиброза/год; n =64 и n =54, соответственно) фиброзом. Выполнено определение полиморфизма. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Statistica 10. **Результаты.** У больных с быстрым фиброзом в сравнении с группой с медленным чаще встречались аллель А (p =0,012) и мутантный генотип АА (p =0,024) гена AGT G-6T, также в данной группе чаще выявляли аллель Т (p =0,013) и генотип МТ+ТТ гена AGT 235 М/Т (p =0,005). Больные с генотипом ТТ гена CYBA 242 С/Т имели более высокую скорость фиброза по сравнению с больными с генотипом СС+СТ (p =0,02). В ходе анализа выявлено протективное влияние гомозиготы ТТ гена ITGA2 807 С/Т на темпы фиброза (p =0,03). Наблюдались тенденции к различию по встречаемости аллелей и генотипов полиморфных маркеров TGFb +915 G/C, FXIII 103 G/T, PAI -675 5G/4G между двумя группами. Для остальных генов достоверных отличий не обнаружено. В дальнейшем построена математическая модель, учитывающая протективное и профиброгенное влияние генов, а также влияние генотипа вируса. Выявлена корреляция между суммой баллов в этой модели и темпом прогрессирования фиброза в печени (R =0,39, p =0,000). **Заключение:** предложенная математическая модель может прогнозировать течение болезни.

651

Ключевые слова: хронический гепатит С, скорость фиброза печени, полиморфизм генов, геномные маркеры.

(Для цитирования: Самоходская Л.М., Старостина Е.Е., Яровая Е.Б., Краснова Т.Н., Мухин Н.А., Ткачук В.А., Садовничий В.А. Математическая модель прогноза скорости фиброза печени у больных с хроническим гепатитом С на основе комбинаций геномных маркеров. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 651–661. Doi: 10.15690/vramn548)

L.M. Samokhodskaya¹, E.E. Starostina¹, E.B. Yarovaya¹, T.N. Krasnova^{1, 2},
N.A. Mukhin^{1, 2}, V.A. Tkachuk¹, V.A. Sadovnichy¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² Sechenov First Moscow state medical university, Moscow, Russian Federation

Mathematic Model for Prediction of Liver Fibrosis Progression Rate in Patients with Chronic Hepatitis C Based on Combination of Genomic Markers

Aim of study. To evaluate clinical significance of different combinations of gene polymorphisms IL-1b, IL-6, IL-10, TNF, HFE, TGF-b, ATR1, NOS3894, CYBA, AGT, MTHFR, FII, FV, FVII, FXIII, ITGA2, ITGB3, FBG, PAI and their prognostic value for prediction of liver fibrosis progression rate in patients with chronic hepatitis C (CHC). **Subjects and methods:** 118 patients with CHC were divided into «fast» and «slow» (fibrosis rate progression ≥0,13 and <0,13 fibrosis units/yr; n =64 and n =54) fibrosis groups. Gene polymorphisms were determined. Statistical analysis was performed using Statistica 10. **Results.** A allele (p =0,012) and genotype AA (p =0,024) of AGT G-6T gene, as well as T allele (p =0,013) and MT+TT genotypes (p =0,005) of AGT 235 M/T gene were significantly more common in «fast fibrosers» than in «slow fibrosers». Patients with genotype TT of CYBA 242 C/T had a higher fibrosis progression rate than patients with CC+CT genotype (p =0,02). Our analysis showed a protective effect of TT genotype of ITGA2 807 C/T on fibrosis progression rate (p =0,03). There was a trend (p <0,15) to higher fibrosis progression rate in patients with mutant alleles and genotypes of TGFb +915 G/C, FXIII 103 G/T, PAI -675 5G/4G genes. Other gene polymorphisms were not associated with enhanced liver fibrosis. To build a mathematical model for prediction of liver fibrosis progression rate we performed coding with scores for genotypes and virus genotype. Total score correlated with the fibrosis progression rate (R =0,39, p =0,000). **Conclusion:** Determination of genetic profile of the patient and virus genotype allows to predict the course of CHC.

Key words: chronic hepatitis C, liver fibrosis progression rate, gene polymorphism, genomic markers.

(For citation: Samokhodskaya L.M., Starostina E.E., Yarovaya E.B., Krasnova T.N., Mukhin N.A., Tkachuk V.A., Sadovnichy V.A. Mathematic Model for Prediction of Liver Fibrosis Progression Rate in Patients with Chronic Hepatitis C Based on Combination of Genomic Markers. Vestnik Rossijskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 651–661. Doi: 10.15690/vramn548)

Обоснование

Известно, что примерно у 20% больных хроническим вирусным гепатитом С (ХГС) цирроз печени (ЦП) развивается в течение 20 лет, у 80% формирование рубцовых изменений в органе занимает более длительный период времени. Поиск причин столь выраженных различий в течении ХГС привел к установлению классических факторов, способствующих развитию заболевания, среди которых выделяют:

- факторы вируса (генотип и квазивиды вируса, уровень виремии);
- факторы хозяина (возраст и длительность инфицирования, мужской пол, коинфекция HBV и/или HIV, метаболические факторы, генетические факторы);
- факторы внешней среды (злоупотребление алкоголем, воздействие токсических веществ, иммуносупрессия, курение).

В последние годы особое внимание уделяют изучению генетических факторов при хронической инфекции вирусом гепатита С (Hepatitis C Virus, HCV), которые, с одной стороны, могут определять индивидуальные особенности течения заболевания, а с другой — служить маркером для оценки прогноза болезни и ответа на терапию. Наиболее широко исследуемыми генетическими факторами хозяина являются однонуклеотидные замены в последовательности генов (SNP, аллельный полиморфизм), приводящие к изменению активности или концентрации продукта соответствующего гена.

В настоящее время проводится большое число работ по изучению взаимосвязи аллельных вариантов генов-кандидатов с течением ХГС, при этом наиболее обсуждаемые из них — это гены цитокинов и гемохроматоза, эндотелиальной дисфункции, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, свертывающей системы крови, участвующие в регуляции множества процессов в организме. Вместе с тем в литературе нет единого мнения об ассоциации генетического полиморфизма вышеупомянутых генов с тяжестью течения ХГС, а также с самим течением и исходом заболевания. Также очень малочисленны данные по исследованию комбинации аллельных вариантов вышеупомянутых генов у больных ХГС.

Цель исследования: оценить клиническую и прогностическую значимость носительства различных комбинаций аллельных вариантов генов *IL 1b -511 C/T*, *IL 6 -174 G/C*, *IL 10 -1082 G/A*, *TNF α -238 G/A*, *HFE H63D* и *C282Y*, *TGF β +915 G/C*, *ATRI 1166 A/C*, *NOS3894 G/T*, *CYBA 242 C/T*, *AGT G-6T* и *235M/T*, *MTHFR 677 C/T*, *FII 20210 G/A*, *FV 1691G/A*, *FVII 10976 G/A*, *FXIII 103 G/T*, *ITGA2 807 C/T*, *ITGB3 1565 T/C*, *FBG -455 G/A*, *PAI -675 5G/4G* на прогрессирование фиброза печени у больных ХГС.

Методы

Дизайн исследования

Одномоментное наблюдательное исследование ХГС и ЦП в его исходе.

Критерии соответствия

Критериями включения служили наличие ХГС или цирроз печени в его исходе, принадлежность к европейской расе, а также подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения больных являлись употребление алкоголя (>20 мл/сут для женщин и >40 мл/сут для мужчин), наличие дополнительных этиологических факторов заболевания печени

(коинфекция ХГВ, ВИЧ, болезнь Вильсона—Коновалова, аутоиммунный гепатит, наследственный гемохроматоз), сахарный диабет 1-го и 2-го типа.

Диагнозы хронического гепатита С и цирроза печени были установлены на основании данных анамнеза, клинического обследования, лабораторных и инструментальных результатов, включая вирусологическое исследование (положительные тесты на антитела к вирусу гепатита С и HCV РНК).

Условия проведения

Исследование выполнено на базах Клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней Первого МГМУ имени М.И. Сеченова и Научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

В исследование включались последовательно все больные ХГС, поступающие для клинического или амбулаторного обследования и лечения с ноября 2009 до июня 2014 г.

Продолжительность исследования

Исследование проводилось в период с ноября 2009 до сентября 2015 г.

Описание медицинского вмешательства

Всем больным проводилось стандартное клинико-лабораторное обследование. Для определения стадии фиброза больным выполняли биопсию печени по методике Менгини (78 больных) с последующим гистологическим исследованием после окраски гематоксилином-эозином. Морфологическая картина не противоречила изменениям в ткани печени при хроническом гепатите С. У 7 больных была выполнена эластометрия печени с помощью аппарата FibroScan (Echosens, Франция). У 33 больных стадия фиброза расценена как F4 по данным клинико-лабораторного и инструментального анализа без проведения эластометрии и биопсии печени.

Исходы исследования

Исходом исследования являлось создание математической модели, основанной на комбинации полиморфных маркеров генов, для прогноза скорости прогрессирования фиброза в печени больных хроническим гепатитом С.

Методы регистрации исходов

Выделение геномной ДНК проводили из ЭДТА-стабилизированной периферической венозной крови согласно протоколу с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Blood Mini Kit и автоматической станции QIAcube™ (QIAGEN GmbH, Германия).

Полиморфные аллели генов цитокинов определяли методом полиморфизма длины рестриктных фрагментов, а гена *HFE* — аллельспецифичной полимеразной цепной реакцией в термоциклере Master Cycler (Eppendorf, Германия). Полиморфизм генов *MTHFR 677 C/T*, *FII 20210 G/A*, *FV 1691G/A*, *FVII 10976 G/A*, *FXIII 103 G/T*, *ITGA2 807 C/T*, *ITGB3 1565 T/C*, *FBG -455 G/A*, *PAI -675 5G/4G* определяли с помощью коммерческих наборов ДНК-технология, термоциклера DTrprime и программного обеспечения для приборов ДТ (ДНК-технология, Россия).

Этическая экспертиза

Исследования проводили с согласия обследуемых в соответствии со ст. 32 Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан (утверждены

ВС РФ от 22.07.1993 № 5487-1 в редакции от 30.12.2008). Комитет по этике при ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России заключил, что данное исследование может считаться не противоречащим основам медицинской этики. Дополнительные рекомендации комиссия не дала (протокол №2 от 02 октября 2009 г.).

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки. Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Методы статистического анализа данных. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ Statistica 10. Гипотезу о нормальности распределения исследуемых показателей проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для каждой из непрерывных величин в зависимости от их типа распределения определяли либо среднее (М) и стандартное отклонение (σ), либо медиану и квартили распределения. При сравнении двух групп больных с быстрым и медленным прогрессированием фиброза по основным показателям (в зависимости от типа распределений анализируемых показателей) использовали непарный t-критерий Стьюдента (для равных или неравных дисперсий) или его непарметрический аналог — U-критерий Манна–Уитни. Для сравнения средних значений показателей в нескольких (трех и более) независимых группах применялся дисперсионный анализ (ANOVA). В тех случаях, когда распределение параметра существенно отклонялось от нормального распределения, а также для малочисленных выборок использовался

непарметрический аналог ANOVA — метод Краскела–Уоллиса. Для анализа таблиц сопряженности признаков 2 × 2 применялся двусторонний точный критерий Фишера, для остальных таблиц сопряженности — критерий χ^2 Пирсона. Взаимосвязь переменных изучали при помощи корреляционного анализа. Если не удалось установить нормальность распределения хотя бы одного из сравниваемых показателей, то в этом случае вместо коэффициента корреляции Пирсона приводился ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Ошибка первого рода (p-значение) округлялась до трех значащих цифр после запятой. Уровень значимости для проверяемых гипотез был принят равным 0,05.

Результаты

Участники исследования

Среди 118 обследованных были 84 женщины (71,2%) и 34 мужчины (28,8%). Средний возраст больных составил $49,1 \pm 13,9$ (от 18 до 76) года. У 61 (51,7%) пациента диагностирован ХГС на различных стадиях фиброза по METAVIR: у 37 (31,4%) — F1, у 15 (12,7%) — F2, у 9 (7,6%) — F3. Еще у 57 (48,3%) пациентов был выявлен ЦП в исходе ХГС (F4 по METAVIR). Преобладание женщин обусловлено жесткими критериями исключения (мужчины чаще злоупотребляли алкоголем или имели коинфекцию ВИЧ / вируса гепатита В). Инфицирование происходило в возрасте от 0 (при рождении) до 59 лет: медиана возраста инфицирования — 24 года (18–36 лет), медиана предполагаемой длительности заболевания — 23 года (14–30).

Таблица 1. Сравнительные демографические, клинические и лабораторные характеристики групп больных с различной скоростью прогрессирования фиброза

Признак	Фиброз медленный	Фиброз быстрый	p
Пол (n), %			
Мужчины	20,4 (11)	35,9 (23)	0,070 ^[1]
Женщины	79,6 (43)	64,1 (41)	
Возраст, М±σ	47,9±14,9	50,1±13,0	0,398 ^[4]
Возраст инфицирования, М±σ	20,6±12,0	31,2±11,8	0,000 ^[4]
Длительность инфицирования, М±σ	27,2±11,4	19,03±10,19	0,000 ^[4]
Генотип вируса (n), %			0,064 ^[2]
1	76,1 (35)	75,0 (36)	
2	19,6 (9)	8,3 (4)	
3	4,3 (2)	16,7 (8)	
Факторы риска (n), %			0,552 ^[2]
Неизвестен	5,6 (3)	6,6 (4)	
Наркотики в/в	3,7 (2)	9,5 (6)	
Гемотрансфузии	61,1 (33)	46,0 (29)	
Оперативные вмешательства	24,1 (13)	31,8 (20)	
Тату / Пирсинг	1,9 (1)	3,2 (2)	
Медработник	3,7 (2)	1,6 (1)	
Другое	0 (0)	1,59 (1)	
Стадия фиброза (n), %			0,000 ^[2]
F1	57,4 (31)	9,4 (6)	
F2	7,4 (4)	17,2 (11)	
F3	7,4 (4)	7,8 (5)	
F4	27,8 (15)	65,6 (42)	
АЛТ, Ед/л, медиана (квартили)	46,7 (31,0–73,0)	65 (41,5–91,5)	0,041 ^[3]
АСТ, Ед/л, медиана (квартили)	39,9 (29,0–68,0)	59 (41,2–104,5)	0,010 ^[3]
ГЦК (n), %	3,7 (2)	4,7 (3)	1,000 ^[1]
Криоглобулины (n), %	28,0 (14)	31,7 (19)	0,834 ^[1]

Примечание. АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ГЦК — гепатоцеллюлярная карцинома. p-значение вычислялось для двустороннего критерия Фишера [1], критерия χ^2 Пирсона [2], U-критерия Манна–Уитни [3], t-критерия Стьюдента для равных дисперсий [4].

Анализ факторов риска инфицирования гепатитом С показал, что наиболее частой причиной заражения HCV-инфекцией были гемотрансфузии ($n=63$; 53,4%), оперативные вмешательства ($n=33$; 28,0%), реже наркомания ($n=8$; 6,8%), значительно реже татуировки ($n=3$; 2,5%) и контакт с кровью среди медицинских работников ($n=3$; 2,5%). У 8 больных (6,7%) не удалось выявить факторов риска инфицирования.

Типирование HCV РНК (определение генотипа вируса) проведено у 94 больных, при этом генотип 1 был доминирующим и определялся у 71 (60,2%) больного, 2-й и 3-й генотип вируса — у 13 (11,0%) и 10 (8,5%) больных, соответственно.

Скорость прогрессирования фиброза оценивали по формуле, предложенной Т. Роупард и соавт. [1]:

$$\text{Скорость прогрессирования фиброза печени} \\ (\text{ед. фиброза/год}) = \\ \frac{\text{Стадия фиброза по METAVIR (ед. фиброза)} / \\ \text{длительность инфицирования (год)}}{1}$$

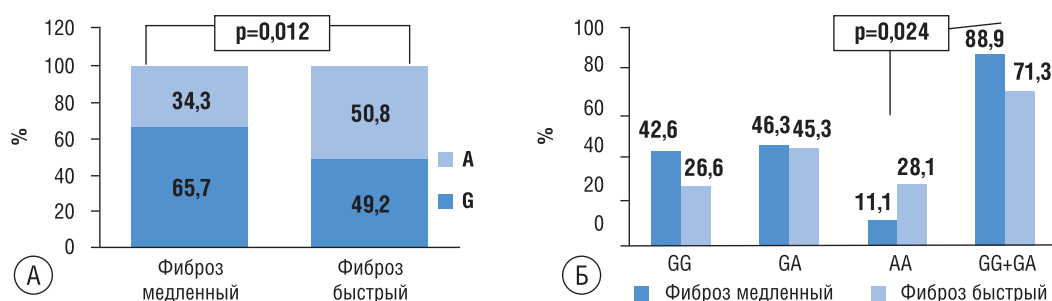
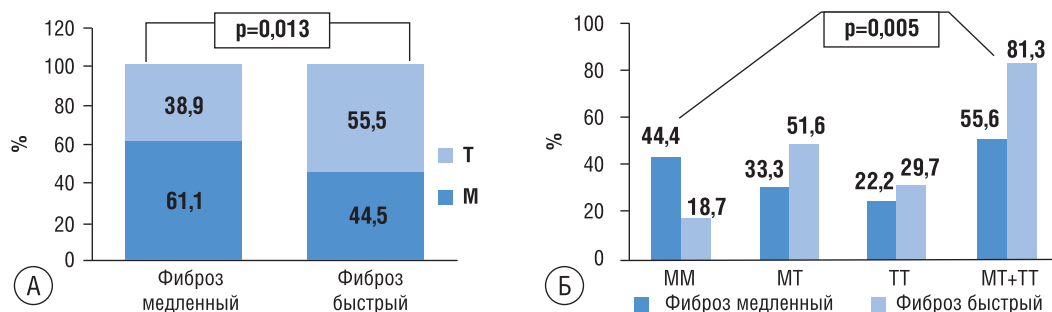
У 64 пациентов (54,2%) расчетная скорость прогрессирования фиброза была $\geq 0,130$ ед. фиброза/год, медиана составила 0,22 ед. фиброза/год (0,16–0,33). Эти лица были отнесены в группу с быстро прогрессирующим фиброзом. У 54 больных (45,8%) темп прогрессирования не достигал 0,130 ед. фиброза/год, медиана составила 0,07 ед. фиброза/год (0,05–0,10). Эти больные были отнесены в группу с медленным развитием фиброза (табл. 1).

Больные с быстро прогрессирующим течением ХГС были инфицированы в более позднем возрасте, имели более короткий срок инфицирования и более высокую активность трансаминаз (АЛТ и АСТ), чем у пациентов с медленно прогрессирующим течением заболевания, причем выявленные различия были статистически достоверными (см. табл. 1). Частота выявления определенных генотипов вируса в группах с быстрым и медленным фиброзом имела тенденцию к различию. В то же время нами не получено отличий между группами при сравнении возраста, обнаружении гепатоцеллюлярной карциномы и

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов исследуемых генов у больных хроническим гепатитом С с различной скоростью прогрессирования фиброза печени

Ген	Аллель / Генотип	Фиброз медленный (n), %	Фиброз быстрый (n), %	p
TGFB +915 G/C	GG	88,9 (48)	78,1 (50)	0,144 ^[2]
	GC	11,1 (6)	21,9 (14)	
	CC	0,0 (0)	0,0 (0)	
CYBA 242 C/T	CC	46,3 (25)	46,9 (30)	0,197 ^[2]
	CT	50 (27)	40,4 (26)	
	TT	3,7 (2)	12,5 (8)	
	CC+CT	96,3 (52)	87,5 (56)	0,107 ^[1]
AGT G-6T	G	65,7 (71)	49,2 (63)	0,012 ^[1]
	A	34,3 (37)	50,8 (65)	
	GG	42,6 (23)	26,6 (17)	0,041 ^[2]
	GA	46,3 (25)	45,3 (29)	
	AA	11,1 (6)	28,1 (18)	
	GG+GA	88,9 (48)	71,3 (46)	0,024 ^[1]
	GA+AA	57,4 (31)	73,4 (47)	0,080 ^[1]
AGT 235M/T	M	61,1 (66)	44,5 (57)	0,013 ^[1]
	T	38,9 (42)	55,5 (71)	
	MM	44,4 (24)	18,7 (12)	0,010 ^[2]
	MT	33,3 (18)	51,6 (33)	
	TT	22,2 (12)	29,7 (19)	
	MT+TT	55,6 (30)	81,3 (52)	0,005 ^[1]
FXIII 103 G/T	GG	53,7 (29)	37,5 (24)	0,202 ^[2]
	GT	35,2 (19)	45,3 (29)	
	TT	11,1 (6)	17,2 (11)	
	GT+TT	46,3 (25)	62,5 (40)	0,096 ^[1]
ITGA2 807 C/T	CC	35,2 (19)	35,9 (23)	0,145 ^[2]
	CT	38,9 (21)	51,6 (33)	
	TT	25,9 (14)	12,5 (8)	
	CC+CT	74,1 (40)	87,5 (56)	0,095 ^[1]
PAI -675 5G/4G	5G5G	31,5 (17)	17,2 (11)	0,164 ^[2]
	5G4G	42,6 (23)	56,2 (36)	
	4G4G	25,9 (14)	26,6 (17)	
	5G4G+4G4G	68,5 (37)	82,8 (53)	0,084 ^[1]

Примечание. p-значение вычислялось для двустороннего критерия Фишера [1], критерия χ^2 Пирсона [2].


 Рис. 1. Распределение аллелей (А) и генотипов (Б) полиморфизма *AGT* по локусу G-6T

 Рис. 2. Распределение аллелей (А) и генотипов (Б) полиморфизма *AGT* по локусу M235T

криоглобулинов. Более половины больных группы с быстрым фиброзом (65,6%) имели ЦП (см. табл. 1).

Основные результаты исследования

Анализ взаимосвязи между прогрессированием фиброза печени и носительством вариантных аллелей исследованных генов у больных ХГС (табл. 2).

У больных с быстрым темпом фиброза в сравнении с группой медленного фиброза статистически значимо чаще встречался аллель А гена *AGT* по локусу G-6T по сравнению с аллелем G (50,8 против 34,3%, $p=0,012$) и гомозиготный мутантный генотип AA в отличие от генотипов GG+GA (28,1 против 11,1%, $p=0,024$; рис. 1).

Аллели М и Т гена *AGT* 235 M/T у больных с медленным прогрессированием фиброза встречались в 61,1 и 38,9% случаев, у больных с быстрым прогрессированием фиброза — в 44,5 и 55,5%, соответственно ($p=0,010$; рис. 2). Кроме того, распространенность дикого типа также различалась между группами, при этом генотип MM чаще встречался в группе больных с медленным фиброзом по сравнению с группой быстрого развития (44,4 против 18,7%), а гетерозиготный вариант MT — чаще в группе с быстрым прогрессированием фиброза печени (51,6 против 33,3%). Выявленные различия были статистически достоверными ($p=0,010$). При объединении MT- и TT-генотипов в одну группу различия становились более выраженными: в группе медленного фиброза генотипы MT+TT определялись в 55,6% случаев, а в группе больных с быстрым фиброзом — в 81,3% ($p=0,005$).

Анализ таблиц сопряженности показал наличие связи в наследовании полиморфных маркеров гена *AGT* по локусам G-6T и M235T ($p<0,001$), т.е. при наличии дикого типа по локусу G-6T велика вероятность выявления полиморфного маркера MM по локусу M235T.

Статистически достоверных отличий в распространенности полиморфных маркеров генов цитокинов *IL 1b -511 C/T*, *IL 10 -1082 G/A*, *TNF α -238 G/A*, *IL 6 -174 G/C*, генов гемохроматоза *C282Y* и *H63D*, генов PAAC и эндотелиальной дисфункции (*ATRI 1166 A/C*, *NOS3 894 G/T* и *MTHFR 677 C/T*), тромбоцитарного рецептора *ITGB3*

1565 T/C, а также генов белков, участвующих в регуляции процессов гемостаза (*FII 20210 G/A*, *FV 1691 G/A*, *FVII 10976 G/A*, *FBG -455 G/A*, *PAI 1 -675 4G/5G*), в группах пациентов с разным прогрессированием фиброза не выявлено (данные не представлены).

Таблица 3. Скорость фиброза у больных с полиморфными маркерами исследуемых генов

Ген	Аллель / Генотип	ед. фиброза/год, медиана (квартили)	<i>p</i>
<i>TGFb+915 G/C</i>	GG	0,13 (0,07–0,22)	0,409 ^[1]
	GC	0,16 (0,10–0,21)	
<i>CYBA 242 C/T</i>	CC	0,14 (0,08–0,20)	0,059 ^[2]
	CT	0,12 (0,07–0,25)	
	TT	0,22 (0,13–0,33)	
	CC+CT	0,13 (0,07–0,21)	
<i>ITGA2 807 C/T</i>	CC	0,14 (0,10–0,25)	0,084 ^[2]
	CT	0,15 (0,09–0,22)	
	TT	0,09 (0,06–0,17)	
	CC+CT	0,15 (0,10–0,22)	
	CT+TT	0,15 (0,07–0,21)	
<i>FXIII 103 G/T</i>	GG	0,12 (0,07–0,17)	0,204 ^[2]
	GT	0,15 (0,10–0,22)	
	TT	0,21 (0,09–0,29)	
	GG+GT	0,13 (0,08–0,21)	
	GT+TT	0,16 (0,09–0,23)	
<i>PAI -675 5G/4G</i>	5G5G	0,11 (0,07–0,20)	0,285 ^[2]
	5G4G	0,15 (0,10–0,22)	
	4G4G	0,14 (0,06–0,22)	
	5G5G+5G4G	0,14 (0,09–0,22)	
	5G4G+4G4G	0,15 (0,09–0,22)	

Примечание. *p*-значение вычислялось для U-критерия Манна–Уитни [1], критерия Краскела–Уоллиса [2].

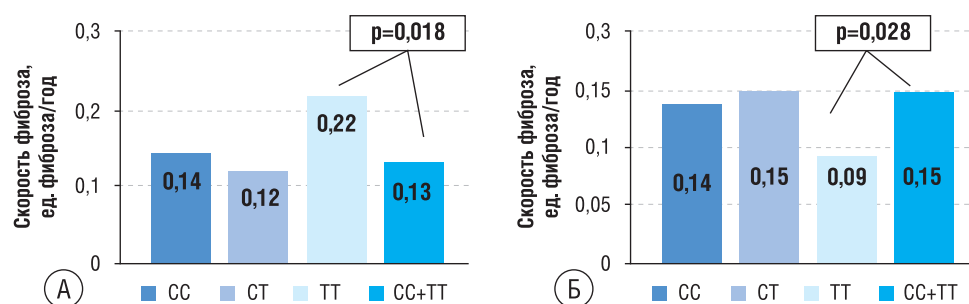


Рис. 3. Скорость фиброза у больных с полиморфными маркерами генов *CYBA* 242 C/T (А) и *ITGA2* 807 C/T (Б)

Отмечена тенденция ($p < 0,15$) к различию групп с быстрым и медленным прогрессированием фиброза по встречаемости аллелей и генотипов полиморфных маркеров *TGFb* +915 G/C, *CYBA* 242 C/T, *FXIII* 103 G/T, *ITGA2* 807 C/T, *PAI* -675 5G/4G между группами с быстрым и медленным прогрессированием фиброза. В дальнейшем проведен анализ взаимосвязи этих генов со скоростью прогрессирования фиброза (абсолютные значения, выраженные в ед. фиброза/год, табл. 3). Отмечено, что больные с генотипом TT гена *CYBA* 242 C/T имели более высокую скорость фиброза по сравнению с больными с генотипом CC+CT (0,22 против 0,13 ед. фиброза/год, $p = 0,02$; рис. 3А). В ходе анализа обнаружено протективное влияние мутантного генотипа TT гена *ITGA2* 807 C/T на темпы фиброза: так, больные с данным полиморфным вариантом TT имели более медленную скорость фиброза (0,09 ед. фиброза/год) по сравнению с пациентами объединенной группы CC+CT (0,15 ед. фиброза/год, $p = 0,03$; рис. 3Б). Для остальных полиморфизмов значимых различий не получено.

Использование полиморфных маркеров исследованных генов для определения прогноза у больных ХГС

Чтобы более определенно предсказать вероятное течение заболевания и возможный исход, мы оценивали влияние комбинаций аллелей исследуемых генов у больных ХГС. В анализ были включены 7 полиморфных маркеров, для которых была доказана статистическая значимость (*AGT* G-6T и *AGT* 235 M/T) или имелась тенденция к ней (+915 G/C *TGFb*, *CYBA* 242 C/T, *FXIII* 103 G/T, *ITGA2* 807 C/T, *PAI* -675 5G/4G). Нами произведено кодирование с присвоением одного балла (+1) генотипам с одним профибротическим аллелем, двух баллов (+2) — с двумя профибротическими аллелями (*AGT* 6A и *AGT* 235 T, *TGFb*

+915 C, *CYBA* 242 T, *FXIII* 103 T, *PAI* -675 4G). В случае выявления среди исследованных полиморфизмов 1 или 2 «протективных» аллелей (*ITGA2* 807 C) им присваивались -1/-2 балла, соответственно. В дальнейшем производилось суммирование всех «протективных» и «профибротических» генотипов, т.е. определялся генетический профиль каждого больного (табл. 4).

При корреляционном анализе выявлена взаимосвязь между суммой баллов аллелей и скоростью фиброза, при этом коэффициент корреляции Спирмена (r) составил 0,32, ($p < 0,001$). Другими словами, чем больше пациент имел «профибротических» и меньше «протективных» аллелей полиморфизмов, включенных в модель, тем быстрее шли процессы фиброза в печени.

В дальнейшем больные по суммарному баллу были разделены по квартилям на три группы:

- больные с суммарным баллом «1 и ниже» ($n = 23$);
- больные с суммарным баллом от «2 до 4» ($n = 57$);
- больные с суммарным баллом «5 и более» ($n = 38$).

В каждой группе определена медиана скорости фиброза в печени (см. табл. 3). Из рис. 4 видно, что сформированные группы статистически значимо различаются по скорости фиброза ($p = 0,016$). Методом множественных ранговых сравнений выявлен более высокий темп процессов фиброзирования в группе 3 по сравнению с группами 1 ($p = 0,002$) и 2 ($p = 0,021$). Статистически значимых различий между группами 1 и 2 не выявлено (см. рис. 4).

Учитывая литературные данные о «профибротическом» влиянии 3-го генотипа вируса гепатита С, а также полученную нами тенденцию к статистической значимости во встречаемости различных генотипов вируса у пациентов с медленным и быстрым развитием фиброза, мы включили в нашу модель дополнительный балл (0 — для второго ге-

Таблица 4. Балльная оценка генетического профиля у больных с медленным и быстрым прогрессированием фиброза

Группа	1			2			3				
Сумма баллов	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Фиброз медленный											
n	1	8	8	6	10	11	5	4	1	0	0
%	1,85	14,81	14,81	11,11	18,52	20,37	9,26	7,41	1,85	0,00	0,00
Фиброз быстрый											
n	0	1	5	8	11	11	12	11	1	3	1
%	0,00	1,56	7,81	12,50	17,19	17,19	18,75	17,19	1,56	4,69	1,56
Общие показатели											
n	1	9	13	14	21	22	17	15	2	3	1
%	0,85	7,63	11,02	11,86	17,8	18,64	14,41	12,71	1,69	2,54	0,85
Скорость фиброза, ед. фиброза/год											
Медиана (квартили)	0,10 (0,07–0,15)			0,13 (0,07–0,2)			0,19 (0,1–0,33)				
p	0,016										

Примечание. p-значение вычислялось для критерия Краскела–Уоллиса при сравнении групп 1, 2, 3.

Таблица 5. Балльная оценка генетического профиля у больных ХГС с учетом влияния генотипа вируса

Группа	I			II			III				
Суммарный балл	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n	2	8	10	10	15	14	16	13	1	4	1
Скорость фиброза, ед. фиброза/год											
n	20			39			35				
Медиана (квартили)	0,09 (0,06–0,11)			0,14 (0,07–0,22)			0,2 (0,1–0,33)				
p	0,001										

Примечание. p — значение вычислялось для критерия Краскела–Уоллиса при сравнении групп I, II, III.

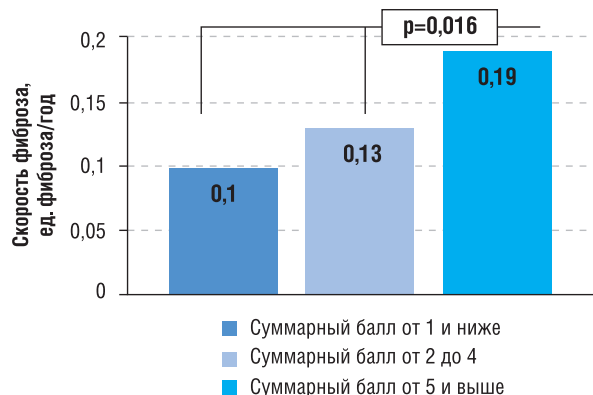


Рис. 4. Скорость фиброза у больных с суммарным баллом от 1 и ниже (группа 1), от 2 до 4 (группа 2), от 5 и более (группа 3)

типа вируса, 1 — для первого, 3 — для третьего). Медиана скорости фиброза для больных с разным суммарным баллом с учетом влияния генотипа вируса представлена в табл. 5.

Суммарный балл, учитывающий генотип вируса, коррелировал с темпами прогрессирования фиброза в печени ($r=0,39$, $p<0,001$).

Далее также по суммарному баллу больные были разделены по квартилям на три группы:

- больные с суммарным баллом «2 и ниже» (I; $n=20$);
- больные с суммарным баллом от «3 до 5» (II; $n=39$);
- больные с суммарным баллом «6 и более» (III; $n=35$).

В группах I, II, III вместе с увеличением суммарного балла отмечалось нарастание скорости фиброза ($p=0,0005$). Однако методом множественных ранговых сравнений статистически значимые различия были доказаны только для I и III групп ($p<0,001$), группы I и II, II и III между собой не отличались.

Нежелательные явления

Учет нежелательных явлений не проводился.

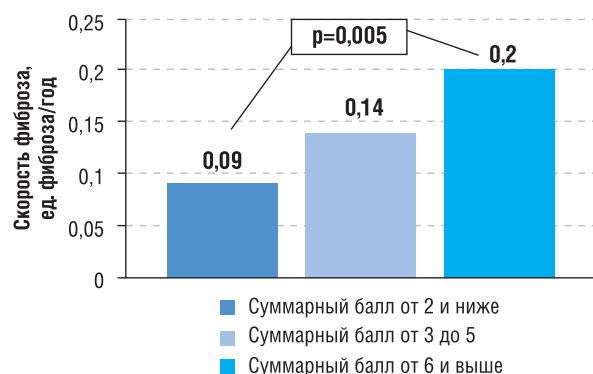


Рис. 5. Скорость фиброза у больных с суммарным баллом от 2 и ниже (группа I), от 3 до 5 (группа II), от 6 и более (группа III) с учетом влияния генотипа вируса

Обсуждение

В литературе нет единого мнения о влиянии полиморфизма исследуемых нами генов на течение ХГС. Кроме того, результаты многих работ нередко противоречат друг другу, что связано с недостаточным количеством исследований, изучающих одни и те же полиморфизмы, а также с обследованием различных популяций. Выводы многих наблюдений сложно сопоставимы друг с другом в связи с различным способом деления больных на группы: так, в одних работах авторы сравнивают между собой инфицированных и здоровых пациентов или группы с ХГС и ЦП, в других — с разными стадиями фиброза, а в третьих делят пациентов на группы с быстрым и медленным прогрессированием фиброза. Единого взгляда среди ученых на формирование групп сравнения не выработано, поскольку гены на разных стадиях болезни могут иметь непохожее проявление (инфицирование, переход в хроническую форму, прогрессирование фиброза печени или трансформация в цирроз, развитие осложнений и гепатоцеллюлярной карциномы). Особую сложность представляет изучение влияния на течение ХГС редко встречаемых мутаций, таких как *TNF α -238 G/A*, *HFE C282Y*, *TGFβ +915 G/C*, *FII 20210 G/A*, *FV 1691G/A*, что требует включения в исследования большого количества пациентов. Клиническая значимость комбинаций аллельных вариантов генов у больных ХГС на течение и прогноз болезни изучается лишь в немногих работах, еще в меньшем количестве исследований учитывается вклад клинических данных.

В нашем исследовании особый интерес представляют цитокины, участвующие в таких процессах, как воспаление, регенерация гепатоцитов и фиброгенез, типичными представителями которых являются *IL 1b*, *TNF α*, *IL 6*, *IL 10* и *TGF b1*. Поскольку считается, что до 50% индивидуальных различий в продукции цитокинов обусловлено наличием полиморфизма, закономерно было ожидать, что полиморфизмы, связанные с изменением продукции названных цитокинов, могут модифицировать естественное течение ХГС и служить маркером заболевания и его прогноза [2–5]. Предыдущие исследования нашей группы показали, что аллели генов *IL 1b -511 T*, *IL 6 -174 C*, *TGF b1 +915 C* ассоциированы с прогрессирующим вариантом течения ХГС и являются «профибротическими», а генотипы генов *IL 1b -511 CC* и *IL 6 -174 GG* связаны с медленным развитием фиброза [2]. Однако в этой работе деление больных на группы проводилось по другой методике: первую группу составили больные, у которых при давности инфицирования не менее 10 лет по данным биопсии печени была выявлена I стадия фиброза (F1 по Knodell), а вторую группу — пациенты с выраженным фиброзом или ЦП независимо от давности инфицирования.

В настоящем исследовании при делении больных на группы с быстрым и медленным фиброзом, согласно

методике, предложенной Т. Roynard и соавт. [1], нами не выявлено статистически значимого влияния полиморфных генетических маркеров генов цитокинов на темпы прогрессирования фиброза в печени больных ХГС. Однако имелась тенденция к статистической значимости при изучении полиморфизма гена *TGF b1 +915 G/C*: так, гетерозиготы GC чаще встречались в группе больных с быстро прогрессирующей болезнью печени (21,9 против 11,1%; $p=0,144$), в связи с чем данный маркер был в последующем включен в построение генетической модели. Мутантные гомозиготы CC в нашей выборке пациентов не выявлялись. Возможно, при увеличении количества пациентов различия были бы более выраженными.

Наши данные относительно полиморфизма гена *TNF α -238 G/A* согласуются с целым рядом других исследований, показавших отсутствие его влияния на течение ХГС [3, 4, 6, 7]. Однако в работе L.J. Yee и соавт. было показано, что аллель гена *TNF α -238A* встречался в 2 раза чаще у больных с циррозом печени, чем у больных с менее выраженным фиброзом [8]. В более поздней работе итальянских авторов было доказано, что генотипы полиморфизма генов *TNF α -238 G/A* и *-308 G/A*, ассоциированные с повышенной продукцией этого цитокина, достоверно чаще встречаются у больных с более выраженным фиброзом [9].

658

Влияние полиморфизма гена *IL 1b* непосредственно на скорость фиброза у больных ХГС не изучалось, поэтому сопоставить наши данные с другими исследованиями невозможно. Считается, что *IL 1b* ингибирует эффекты интерферона-альфа [10], вследствие чего предполагается, что высокий уровень *IL 1b* ассоциирован с быстрым прогрессированием фиброза, а также с плохим ответом на интерферонотерапию [11]. В исследовании M.J. Bahr и соавт. достоверно чаще у больных ХГС и циррозом печени в исходе ХГС по сравнению со здоровыми людьми выявлялся генотип гена *IL 1b -511 TT* [12].

В литературе широко обсуждается ассоциация различных полиморфизмов гена *IL 10* с особенностями течения ХГС, учитывая его важную роль в воспалении, фибро- и туморогенезе [13]. В наиболее крупном многоцентровом исследовании S. Knapp и соавт. было показано, что -1082 AA генотип гена *IL 10* чаще выявлялся у больных с быстрым развитием ЦП (до 20 лет) по сравнению с больными с медленно прогрессирующим ЦП (более чем через 30 лет) [14]. Н. Hamada и соавт. установили, что GC-гаплотип, ассоциированный с высокой продукцией *IL 10*, достоверно чаще выявлялся у больных ХГС с медленным прогрессированием фиброза, чем у больных с быстрым [5]. Однако эти данные не были подтверждены ни в нашем исследовании, ни в работе P.K. Constantini и соавт. [15].

При анализе данных литературы нам не удалось найти работ по изучению влияния полиморфизма гена *IL 6* на прогрессирование фиброза печени и сопоставить их с нашими данными. Но в работе S. Barret и соавт. установили, что -174 CC генотип гена *IL 6* достоверно чаще выявлялся у больных со спонтанным клиренсом вируса по сравнению с больными, у которых произошла хронизация HCV-инфекции [7].

Одним из наиболее изученных профиброгенных факторов является *TGF b1*. Считается, что при воспалении в ткани печени *TGF b1* активирует фиброгенез посредством стимуляции синтеза и ингибирования деградации внеклеточного матрикса. Исследования влияния полиморфизма гена *TGF b1* весьма противоречивы в связи с популяционными различиями. В исследовании E.E. Powell и соавт. установлено, что Arg/Arg-гомозиготы по 25-му кодону

гена *TGF b1* статистически достоверно чаще имели более тяжелую стадию фиброза по сравнению с 25 Arg/Pro или 25 Pro/Pro-генотипом [3]. В работе немецких исследователей также установлена связь между полиморфизмом гена *TGF b1* и темпами прогрессирования фиброза. J. Gewaltig и соавт. показали, что носительство больными ХГС вариантного аллеля полиморфизма гена *TGF b1 Arg 25 Pro* приводит почти к трехкратному увеличению скорости прогрессирования фиброза печени [16]. C.G. Tag и соавт. показали, что аллель Pro в 25 кодоне гена *TGF β* в два раза чаще встречается у пациентов с ХГС и более продвинутой стадией фиброза (F3–4 по METAVIR) по сравнению с пациентами с фиброзом F0–2 по METAVIR [17]. В более позднем исследовании японских ученых, обследовавших 206 больных ХГС и 101 человека из контрольной группы, авторами не было выявлено носительства +915 G/C полиморфизма гена *TGF b1* ни в одном случае, что свидетельствует о практически полном отсутствии данного генетического полиморфизма в японской популяции [18]. Н. Wang и соавт. установили, что полиморфизм гена *TGF b1 +915 G/C* является фактором риска прогрессирования фиброза у больных европейского происхождения, но не азиатского [19]. Среди наших больных мутации гена *TGF b1 +915 G/C* также встречались редко, и выявить их влияния на прогрессирование фиброза в печени нам так и не удалось.

Известно, что у больных ХГС очень часто наблюдаются биохимические и морфологические признаки перегрузки железом [20], чему дополнительно способствует избыточное всасывание железа в желудочно-кишечном тракте при наличии мутации в гене гемохроматоза (*HFE*). В литературе нет единого мнения в отношении влияния полиморфизма гена *HFE* на течение и прогноз ХГС. A. Erhardt и соавт., обследовав 401 пациента с ХГС, установили, что как полиморфизм C282Y, так и H63D являются независимыми факторами прогрессирования фиброза печени у больных ХГС [21]. В работе A. Geier и соавт. на 166 больных ХГС показано, что более выраженный фиброз и высокая активность печеночного процесса у гетерозигот по гену гемохроматоза встречались в 4,5 раз чаще, чем у больных ХГС с диким вариантом гена *HFE* [22], что находит подтверждение и в работе чешских авторов [23]. В отличие от вышеказанного, в работе французских и ряда других авторов не найдено ассоциации ни одного из исследованных полиморфизмов гена *HFE* (C282Y и H63D) с развитием ЦП [24, 25], что согласуется и с нашими результатами.

В патогенезе фиброза печени хорошо известно участие цитокинов с вазоактивными свойствами. Считается, что вазодилаторы (NO, релаксин) проявляют антифибротический эффект, тогда как вазоконстрикторы (норадреналин, ангиотензин II) — профиброгенный. Изучение полиморфизма гена ангиотензиногена в -6-м положении с заменой G на A у больных ХГС показало, что носители -6 AA генотипа чаще имеют более тяжелую стадию фиброза, чем больные с -6 GA- и -6 GG-генотипами [3]. В более позднем и крупном исследовании E.H. Forrest и соавт. с изучением того же полиморфизма гена ангиотензиногена, а также полиморфизма гена *ATRI 1166 A/C* не было установлено взаимосвязей со стадиями фиброза [26]. В нашем же исследовании носительство аллелей M и A гена *AGT* по локусам 235 M/T и G-6A, соответственно, служило неблагоприятным фактором прогрессирования скорости фиброза, генотип MM по локусу 235 M/T в данном случае обладал протективными свойствами, а генотипы GA и AA по локусу G-6A — профиброгенными. Можно предположить, что выявление влияния полиморфиз-

ма гена *AGT* на скорость фиброза в нашей работе обусловлено именно учетом длительности инфицирования при формировании групп больных, тогда как в работах предыдущих авторов оценивалась только стадия фиброза. Нами так же, как другими исследователями, не найдено корреляции между полиморфизмом гена *ATRI 1166 A/C* и прогрессированием болезни печени.

Важную роль в развитии синусоидальной эндотелиальной дисфункции играет внутрипеченочный окислительный стресс, реализованный через фермент NADPH-оксидазу. Субъединица p22-phox, кодируемая геном *CYBA*, необходима для ферментативной активности NADPH-оксидазы, а генетически обусловленное изменение активности или экспрессии этого белка могут влиять на течение многих заболеваний, связанных с окислительным стрессом. В доступной нам литературе мы не встретили работ, посвященных роли полиморфизма гена *CYBA C242T* на течение и прогноз хронических заболеваний печени.

В нашем исследовании показано, что генотип ТТ гена *CYBA 242 C/T* является «профиброгенным». Механизм, лежащий в основе выявленной ассоциации носительства ТТ-генотипа с быстрым прогрессированием фиброза, у больных ХГС неясен. Он может объясняться влиянием на апоптоз или экспрессию генов под влиянием реактивных форм кислорода, либо сцеплением данного полиморфизма с еще не выявленным фактором, но маловероятно, что снижение ферментативной активности NADPH-оксидазы ускоряло развитие фиброза печени и ремоделирование внутрипеченочного сосудистого русла.

Синусоидальная эндотелиальная дисфункция характеризуется снижением биодоступности NO в паренхиме печени, что может быть связано с полиморфизмом гена *NOS3*. Мы также не встретили в литературе работ по исследованию ассоциаций данного полиморфизма с течением и прогнозом ХГС. Нами не обнаружено отличий в распределении аллелей и генотипов полиморфизма *NOS3* в группах больных ХГС с быстрым и медленным прогрессированием фиброза.

Гипергомоцистеинемия — важный независимый фактор эндотелиальной дисфункции, приводящей к развитию тромбов, — происходит при нарушении фермента MTHFR. Полиморфизм C677T гена *MTHFR* опосредует образование менее активного варианта фермента и недостаточной утилизации гомоцистеина из кровотока. В исследовании N. Maharshak и соавт. носительство мутаций *MTHFR 677 C/T* и *FV 1691G/A* в данном исследовании не оказывало влияния на скорость процессов фиброобразования в печени [27]. L.E. Adinolfi и соавт. показали, что гипергомоцистеинемия ассоциирована с ТТ-генотипом *MTHFR 677 C/T* ($r=0,367$; $p=0,001$), а стеатоз коррелировал с полиморфизмом *MTHFR 677 C/T*, гомоцистеинемией и фиброзом [28]. В нашем исследовании распределение аллелей и генотипов полиморфизма 677 C/T гена *MTHFR* в группах больных ХГС с быстрым и медленным прогрессированием фиброза печени не различалось между собой.

Обычно заболевания печени ассоциируют с гипокоагуляцией. Вместе с тем на стадии цирроза печени описаны и гиперкоагуляционные состояния с развитием тромбозов различной локализации. Влияние полиморфизма генов гемостаза на течение ХГС, по данным литературы, также неопределенно. M. Wright и соавт. выявили, что скорость нарастания фиброза значительно выше у пациентов с мутацией Лейдена (*FII 20210 G/A*; $p=0,004$) [29], а больные, гетерозиготные по гену *FV 1691G/A*, быстрее развивают цирроз печени (в сроки менее 30 лет). Похожие

данные были получены и на другой выборке пациентов в работе A. Poujol-Robert и соавт. [30], в то время как в исследовании C. Goulding и соавт., включавшем только женщин, вышеуказанное не подтвердилось [31]. В исследовании K. Dik и соавт. показано, что мутации по гену *FXIII 103 G/T* увеличивали скорость развития фиброза в печени у больных ХГС в 4,7 раза ($p=0,01$) [32]. Кроме того, исследователями было показано, что при сочетании двух мутаций генов (*PAI-675 5G/4G* и *FXIII 103 G/T*) темп прогрессирования фиброза увеличивался еще больше — в 5 раз ($p=0,02$). Полиморфизм других генов (*FV 1691G/A*, *FII 20210 G/A*) системы свертывания не оказывал статистически значимого влияния на стадию фиброза в печени и скорость его развития, что согласуется с нашими данными. Однако мутации данных генов практически не встречались в нашей группе больных. Нами отмечено, что в группе с быстрым прогрессированием фиброза чаще встречался 4G аллель гена *PAI -675 5G/4G* и генотип ТТ гена *FXIII 103 G/T*, в связи с чем сделан вывод об их «профибротический» роли, и они были включены в разрабатываемую генетическую модель. Однако различия имели только тенденцию к статистической значимости.

T. Asselah и соавт. при изучении экспрессии 240 генов в ткани печени больных гепатитом С выявили повышение количества мРНК *ITGA2* в биопсийном материале у пациентов с более продвинутыми стадиями фиброза, что свидетельствует об активации системы интегринов ($p=0,00024$) [33]. Полиморфизм генов тромбоцитарных рецепторов в данной работе не исследован. При оценке влияния полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов на скорость фиброза мы выявили «протективное» влияние мутантной гомозиготы ТТ гена *ITGA2 807 C/T*. В доступной нам литературе нет сведений о роли данного полиморфизма в течении и развитии хронических заболеваний печени. Данный генетический маркер изучен в кардиологии и ассоциирован с предрасположенностью к ишемической болезни сердца и инфаркту миокарда [34]. Возможно, более высокая концентрация рецепторов тромбоцитов, обусловленная этой мутацией, способствует более быстрому ремоделированию ткани печени и «рассасыванию» микротромбов.

Совершенствование технологии проведения ДНК-диагностики привело к переходу от исследования одного полиморфного маркера к десяtku или даже сотне в разных генах. Изучение комбинации аллелей, ассоциированных с прогрессированием фиброза печени, значительно повысило надежность и достоверность результатов исследований. Одной из первых попыток изучения комбинации полиморфизмов, имеющих однонаправленный эффект в патогенезе ХГС, была работа E.E. Powell и соавт. [3]. В работе J. Armendariz-Borunda и соавт. показано, что комбинация полиморфизмов генов *TGFb +915 G/C*, *PAI -675 5G/4G*, *AGT G-6A* увеличивает риск продвинутого фиброза у больных с хроническим гепатитом С [35].

Еще более убедительные данные по целесообразности изучения комбинации полиморфизма нескольких генов получены в работе M.M. Richardson и соавт. [36]. Исследователи, изучив 8 полиморфизмов, установили, что с прогрессированием фиброза были ассоциированы 6, и показали, что с увеличением числа профибротических аллелей у больных ХГС вероятность развития ЦП значительно возрастает.

В работе японских авторов было проанализировано 269 полиморфизмов в 103 генах-кандидатах. Ученые обнаружили, что с самопроизвольным клиренсом HCV-инфекции были ассоциированы 24 полиморфизма в 20 генах, а с постоянно нормальным уровнем АЛТ — 27 по-

лиморфизмов в 15 генах (в том числе полиморфизм гена *IL 1b -511 C/T*) [37].

В более поздней работе американских авторов, проанализировавших 20 573 полиморфизма, было отобрано 39, носительство которых с высокой степенью достоверности предсказывало наличие у больного выраженного фиброза/цирроза печени [38].

В нашей работе мы так же, изучив генетический профиль больных с ХГС по 21 полиморфизму, выявили 7 основных полиморфных маркеров (*AGT G-6T* и *AGT 235 M/T*, *915 G/C TGFb*, *CYBA 242 C/T*, *FXIII 103 G/T*, *ITGA2 807 C/T*, *PAI -675 5G/4G*), связанных с прогрессированием фиброза в печени. В дальнейшем с помощью специальной системы баллов нами была построена генетическая модель, которая может быть использована для определения прогноза ХГС. Включение в модель специального балла для генотипа вируса не привело к нивелированию эффекта генетических факторов, что согласуется с данными литературы [39].

Заключение

Генетический полиморфизм генов цитокинов, эндотелиальной дисфункции, ренин-ангиотензиновой системы и системы гемостаза является фактором, определяющим индивидуальные особенности прогрессирования фиброза печени у больных ХГС. Установлены аллели, ассоцииро-

ванные с прогрессирующим типом течения ХГС — «профибротические» (*AGT -6A* и *AGT 235T*, *TGFb 915 C*, *CYBA 242T*, *FXIII 103T*, *PAI -6754G*), и, наоборот, «протективные», ассоциированные с медленным прогрессированием фиброза (*ITGA2 807T*). Введен интегральный показатель, характеризующий разность между суммарным накоплением «профибротических» и «протективных» аллелей в комбинации геномных маркеров, выявлена зависимость скорости фиброза от данного интегрального показателя. На основе генетического профиля пациентов с учетом генотипа вируса построена балльная шкала для прогнозирования скорости фиброза. Таким образом, используя предложенную математическую модель, определение генетического профиля больных ХГС и генотипа вируса позволит прогнозировать течение заболевания, определять сроки медицинского вмешательства и начала терапии.

Источник финансирования

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-50-00029).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):47–55. doi: 10.1055/s-2000-9258
- Самоходская ЛМ, Игнатова ТМ, Абдуллаев СМ, Краснова ТН, Некрасова ТП, Мухин НА, Ткачук ВА. Прогностическое значение комбинации аллельных вариантов генов цитокинов и гемохроматоза у больных хроническим гепатитом С. *РЖГГК.* 2007;17(2):50–56.
- Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2000;31(4):828–833. doi: 10.1053/he.2000.6253.
- Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol.* 36(2):271–277. doi: 10.1016/S0168-8278(01)00243-4.
- Hamada H, Yatsushashi H, Yano K, Arisawa K, Nakao K, Yano M. Interleukin-10 promoter polymorphisms and liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C in Japan. *J Hepatol.* 2003;39(3):457–8. doi: 10.1016/S0168-8278(03)00246-0
- Rosen HR, McHutchison JG, Conrad AJ, Lentz JJ, Marousek G, Rose SL, et al. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(3):714–720. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05552.x
- Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol.* 2003;71(2):212–218. doi: 10.1002/jmv.10472.
- Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun.* 2000;1(6):386–390. doi: 10.1038/sj.gene.6363696.
- Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, et al. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection--association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2005;42(4):505–510. doi: 10.1016/j.jhep.2004.11.026.
- Takahara T, Fukuyama Y, Saito S, Ogino T, Miyajima N, Kohase M. IL-1, EGF, and HGF suppress the antiviral activity of interferon in primary monkey hepatic parenchymal cells. *Jpn J Infect Dis.* 1999;52(2):45–8.
- Tian Z, Shen X, Feng H, Gao B. IL-1 beta attenuates IFN-alpha beta-induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J Immunol.* 2000;165(7):3959–3965. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3959.
- Bahr MJ, El Menuawy M, Boeker KHW, Musholt PB, Manns MP, Lichtinghagen R. Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2003;23(6):420–425. doi: 10.1111/j.1478-3231.2003.00873.x.
- Hennig BJ, Frodsham AJ, Hellier S, Knapp S, Yee LJ, Wright M, et al. Influence of IL-10RA and IL-22 polymorphisms on outcome of hepatitis C virus infection. *Liver Int.* 2007;27(8):1134–1143. doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01518.x.
- Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics.* 2003;55(6):362–369. doi: 10.1007/s00251-003-0594-5.
- Patricia KC, Marta W-S, Michael C, Anna B-K, Ian GM, Mathew EC, et al. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver.* 2002;22(5):404–412. doi: 10.1034/j.1600-0676.2002.01553.x.
- Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2002;316(1–2):83–94. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00738-0.
- Tag CG, Mengsteab S, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, Weiskirchen R. Analysis of the transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with chronic hepatitis C infection. *Cytokine.* 2003;24(5):173–181. doi: 10.1016/j.cyto.2003.08.007.
- Suzuki S, Tanaka Y, Orito E, Sugauchi F, Hasegawa I, Sakurai M, et al. Transforming growth factor-beta-1 genetic polymorphism in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(10):1139–1143. doi: 10.1046/j.1440-1746.2003.03161.x.

19. Wang H. Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 2005;11(13):1929. doi: 10.3748/wjg.v11.i13.1929.
20. Alberti A, Vario A, Ferrari A, Pistis R. Review article: chronic hepatitis C - natural history and cofactors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(s2):74–78. doi: 10.1111/j.1365-2036.2005.02602.x.
21. Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, Kappert G, Adams O, Donner A, et al. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol*. 2003;38(3):335–342. doi: 10.1016/s0168-8278(02)00415-4.
22. Geier A, Reugels M, Weiskirchen R, Wasmuth HE, Dietrich CG, Siewert E, et al. Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2004;24(4):285–294. doi: 10.1111/j.1478-3231.2004.0928.x.
23. Pácal L, Husa P, Znojil V, Kan ková Ki. HFE C282Y gene variant is a risk factor for the progression to decompensated liver disease in chronic viral hepatitis C subjects in the Czech population. *Hepatol Res*. 2007;37(9):740–747. doi: 10.1111/j.1872-034X.2007.00118.x.
24. Lebray P, Zylberberg H, Hue S, Poulet B, Carnot F, Martin S, et al. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2004;11(2):175–182. doi: 10.1046/j.1365-2893.2003.00488.x.
25. Dostalíkova-Cimburova M, Kratka K, Stransky J, Putova I, Cieslarova B, Horak J. Iron Overload and HFE Gene Mutations in Czech Patients with Chronic Liver Diseases. *Dis Markers*. 2012;32(1):65–72. doi: 10.1155/2012/790464.
26. Forrest EH, Thorburn D, Spence E, Oien KA, Inglis G, Smith CA, et al. Polymorphisms of the renin-angiotensin system and the severity of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 2005;12(5):519–524. doi: 10.1111/j.1365-2893.2005.00630.x.
27. Maharshak N. Increased fibrosis progression rates in hepatitis C patients carrying the prothrombin G20210A mutation. *World J Gastroenterol*. 2011;17(45):5007. doi: 10.3748/wjg.v17.i45.5007.
28. Adinolfi LE, Ingrosso D, Cesaro G, Cimmino A, D'Anto M, Capasso R, et al. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2005;41(5):995–1003. doi: 10.1002/hep.20664.
29. Wright M. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut*. 2003;52(8):1206–1210. doi: 10.1136/gut.52.8.1206.
30. Poujol-Robert A, Boëlle P-Y, Poupon R, Robert A. Factor V Leiden as a risk factor for cirrhosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2004;39(4):1174–1175. doi: 10.1002/hep.20166.
31. Goulding C, O'Brien C, Egan H, Hegarty JE, McDonald G, O'Farrelly C, et al. The impact of inherited prothrombotic risk factors on individuals chronically infected with hepatitis C virus from a single source. *J Viral Hepat*. 2007;14(4):255–259. doi: 10.1111/j.1365-2893.2006.00790.x.
32. Dik K, de Bruijne J, Takkenberg RB, Roelofs JJ, Tempelmanns MJ, Dijkgraaf MGW, et al. Factor XIII Val34Leu mutation accelerates the development of fibrosis in patients with chronic hepatitis B and C. *Hepatology Research*. 2012;42(7):668–676. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00963.x.
33. Asselah T, Bièche I, Laurendeau I, Paradis V, Vidaud D, Degott C, et al. Liver Gene Expression Signature of Mild Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;129(6):2064–2075. doi: 10.1053/j.gastro.2005.09.010.
34. Wu G, Xi Y, Yao L, Su L, Yan Y, Li M, et al. Genetic polymorphism of ITGA2C807T can increase the risk of ischemic stroke. *Int J Neurosci*. 2014;124(11):841–851. doi: 10.3109/00207454.2013.879718.
35. Armendáriz-Borunda J, Rincón AR, Muñoz-Valle JF, Bueno-Topete M, Oregón-Romero E, Islas-Carbajal MC, et al. Fibrogenic Polymorphisms (TGF- β , PAI-1, AT) in Mexican Patients With Established Liver Fibrosis. Potential Correlation With Pirfenidone Treatment. *J Investig Med*. 2008;56(7):944–953. doi: 10.231/JIM.0b013e3181891512.
36. Richardson MM. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. *J Med Genet*. 2005;42(7):e45–e45. doi: 10.1136/jmg.2005.032557.
37. Huang H, Shiffman ML, Cheung RC, Layden TJ, Friedman S, Abar OT, et al. Identification of Two Gene Variants Associated With Risk of Advanced Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1679–1687. doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.032.
38. Hissar SS, Kumar M, Tyagi P, Goyal A, Pv S, Agarwal S, et al. Natural history of hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection in India. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(4):581–587. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05649.x.
39. Bochud P-Y, Cai T, Overbeck K, Bochud M, Dufour J-F, Mühlhaupt B, et al. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2009;51(4):655–666. doi: 10.1016/j.jhep.2009.05.016.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Самоходская Лариса Михайловна, кандидат медицинских наук, доцент факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: slm@fbm.msu.ru

Старостина Екатерина Евгеньевна, аспирант факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский проспект, д. 31, корп. 5, e-mail: starostinaee@gmail.com

Яровая Елена Борисовна, доктор физико-математических наук, доцент механико-математического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: yarovaya@mech.math.msu.ru

Краснова Татьяна Николаевна, кандидат медицинских наук, доцент факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент кафедры внутренних и профессиональных болезней и пульмонологии Медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова»

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: krasnovamgu@yandex.ru

Мухин Николай Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой внутренних болезней факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, директор клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева ГБОУ ВПО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова»

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: moukhin-nephro@yandex.ru

Ткачук Всеволод Арсеньевич, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, декан факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: vat@fbm.msu.ru

Садовничий Виктор Антонович, доктор физико-математических наук, профессор, академик РАН, ректор МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: info@rector.msu.ru

DOI: 10.15690/vramn560

Р.А. Мухамадияров¹, Н.В. Рутковская¹, О.Д. Сидорова², Л.С. Барбараш¹

¹ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Кемерово, Российская Федерация

² Кемеровская государственная медицинская академия Минздрава России,
Кемерово, Российская Федерация

Исследование клеточного состава кальцинированных биопротезов клапанов сердца

С позиций оценки возможных механизмов развития структурных дисфункций, ассоциированных с кальцификацией ксеноткани, исследован клеточный состав эксплантированных эпоксиобработанных ксеноаортальных биопротезов клапанов сердца. В створках ксеноклапанов выявлены многочисленные и разнообразные клетки с хорошо сохранившейся внутренней структурой. Наибольшую их концентрацию определяли в трех зонах: на поверхности образцов, в толще ксеногенной ткани в местах разволокнения и деструкции коллагена, а также вблизи отложений кальция. На поверхности створок наблюдали преимущественно моноциты. Клетки, идентифицируемые в толще образца и вблизи кальциевых минерализатов, по морфологическим признакам были отнесены к двум популяциям: элементам иммунной системы (макрофаги, гигантские многоядерные клетки, плазматические клетки, нейтрофилы) и клеткам соединительной и мышечной ткани (фибробласты, фиброциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки). Показано, что развитие дегенеративных изменений створок биопротезов клапанов сердца, ассоциированных с кальцификацией, сопровождается инфильтрацией клеток в их структуру, что позволяет предположить наличие клеточноопосредованных процессов патологической минерализации.

Ключевые слова: биопротезы клапанов сердца, кальцификация, клеточная инфильтрация.

(Для цитирования: Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Сидорова О.Д., Барбараш Л.С. Исследование клеточного состава кальцинированных биопротезов клапанов сердца. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 662–668. Doi: 10.15690/vramn560)

Введение

Кальцификация химически модифицированного ксеногенного материала является одним из основных факторов, ограничивающих долговечность функционирования биопротезов (БП) клапанов сердца в организме реципиента и, соответственно, лимитирующих их широкое клиническое применение. Развитие структурных дисфункций вследствие первичной тканевой несостоятельности с отложением кальциевых депозитов в створках имплантированных протезов диктует необходимость выполнения повторных хирургических вмешательств у категории пациентов с ожидаемой продолжительностью жизни свыше десяти лет [1]. Несмотря на постоянное совершенствование моделей БП и продолжающийся поиск эффективных способов предимплантационной обработ-

ки, повышающих их минералорезистентность, данная проблема все еще далека от своего разрешения.

Существует теория, что кальцификация мягких тканей представляет собой активный процесс, управляемый на клеточном и биохимическом уровнях [2, 3], при этом стадийность его развития и сложная иерархия регулирующих факторов детально не исследованы. В настоящее время механизмы кальцификации (дистрофического обызвествления) активно изучаются на моделях атеросклеротического поражения сосудистой стенки и аортального стеноза [4–6], однако работы, посвященные исследованию дегенеративных изменений БП клапанов сердца, крайне немногочисленны. Вместе с тем их результаты дают основание полагать, что на темпы формирования структурных дисфункций БП, помимо механических воздействий и характеристик имплантируемого устройства, оказывают

R.A. Mukhamadiyarov¹, N.V. Rutkovskaya¹, O.D. Sidorova², L.S. Barbarash¹

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

² Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian Federation

Cellular Composition of Calcified Bioprosthetic Heart Valves

With the aim to assess the mechanisms of the structural dysfunctions associated with xenograft tissue calcification, we investigated the cellular composition of the explanted xenoaortic epoxy-treated bioprosthetic heart valves. In the leaflets, we revealed multiple cells with retained internal structure. Most of them located on the leaflet surface, at the areas of collagen destruction, and near calcium deposits. Monocytes were the predominant cell fraction on the leaflet surface whilst immune (macrophages, multinucleated giant cells, plasma cells, neutrophils) and connective tissue (fibroblasts, fibrocytes, endothelial, and smooth muscle cells) cells prevailed at the areas of collagen destruction and near calcium deposits. Calcification of the leaflets was accompanied by cellular infiltration, therefore suggesting that pathological mineralization may be associated with cell-mediated processes.

Key words: bioprosthetic heart valves, calcification, cellular infiltration.

(For citation: Mukhamadiyarov R.A., Rutkovskaya N.V., Sidorova O.D., Barbarash L.S. Cellular Composition of Calcified Bioprosthetic Heart Valves. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 662–668. Doi: 10.15690/vramn560)

влияние особенности метаболического статуса реципиента [2, 7, 8]. Из данных литературы известно о наличии идентичных патоморфологических изменений в атеросклеротических бляшках, створках нативного аортального клапана и БП, консервированных глутаровым альдегидом [6, 9, 10]. Приведенные выше факты позволяют предполагать существование универсальных механизмов патологической кальцификации мягких тканей [3, 6].

Целью настоящей работы явилось изучение клеточного состава эксплантационных эпоксиобработанных ксеноаортальных БП клапанов сердца с позиций оценки возможных механизмов развития структурных дисфункций, ассоциированных с кальцификацией ксеноткани.

Описание серии случаев

Исследованы эпоксиобработанные ксеноаортальные БП клапанов сердца (КемКор и Перикор, ЗАО Неокор, Кемерово), эксплантационные из митральной позиции у восьми пациентов (62,5% мужчин, $n=5$) по причине развития кальциевой дегенерации. Средний возраст реципиентов при первичных хирургических вмешательствах составил $58,1 \pm 7,8$ года (от 43 до 66 лет). Преобладающим этиологическим фактором формирования порока митрального клапана явилась ревматическая болезнь сердца (87,5%, $n=7$), в одном случае (12,5%) имела место недостаточность митрального клапана на фоне синдрома изолированной соединительнотканной дисплазии. Средний срок функционирования БП составил $8,75 \pm 2,8$ года (от 6 до 12 лет). На момент определения показаний к репротезированию у всех пациентов отсутствовали клинические и лабораторные признаки активности воспалительного процесса, данных за наличие инфицирования ксеногенного материала клапанов, согласно результатам эхокардиографических исследований, также получено не было.

При макроскопическом исследовании удаленных БП кальциевые депозиты представляли собой белесовато-желтые отложения, расположенные на поверхности и/или в толще створчатого аппарата. Кальцификаты частично или полностью замещали биологическую ткань, что приводило к разрушению отдельных участков створки или тотальной ее деструкции.

Для гистологических исследований эксплантационные ксеногенные клапаны целиком фиксировали в 10% забуференном формалине, затем вырезали из них образцы створок и выполняли декальцинацию в 9% растворе ЭДТА при $pH = 7,8$. В последующем осуществляли стандартные методы заключения в парафин и изготовления гистологических срезов с окраской полученных препаратов гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону. Оценку гистологической картины осуществляли методом световой микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Ультраструктурные исследования проводили с использованием оригинальной методики, позволяющей применять на одних и тех же образцах световую и электронную микроскопию [11]. Уникальность данного метода состоит в возможности изучения биологических тканей без удаления кальциевых включений, что позволило исследовать непосредственно кальциевые депозиты в местах их контактов с клетками при сохранении тонкой архитектоники объекта. Принцип метода основан на заключении исследуемого образца в эпоксидные смолы, получении шлифов, окрашивании красителями для электронной микроскопии. Створки БП фиксировали в двух сменах 4% раствора параформальдегида, с 0,1 М фосфатным буфером по 12 ч в каждом, обезжизивали в серии спиртов возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне и пропитывали смесью ацетон-смола. Далее их погружали в заливочную смолу в системе вакуумной импрегнации CitoVac (Struers, Дания) на 36 ч, переносили в свежую порцию смолы и полимеризовали в специальных контейнерах. В качестве заливочной смолы использовали Эпон (Sigma-Aldrich, США). Полученные образцы шлифовали до необходимой глубины и полировали поверхность при помощи прибора TegraPol-11 (Struers, Дания). Подготовленные пробы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, напыляли углеродом и исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в отраженных и обратно-рассеянных электронах с использованием электронного микроскопа Hitachi S 3400 N (Япония). Изображение, полученное в режиме обратно-рассеянных электронов, было аналогичным таковому при проведении просвечивающей электронной микроскопии, но имело негативный контраст.

В створках эпоксиобработанных клапанов, удаленных по причине развития кальциевой альтерации, были выявлены многочисленные и разнообразные по морфологии клетки с хорошо сохранившейся внутренней структурой. Наибольшую концентрацию клеточных элементов наблюдали в трех зонах: на поверхности образцов, в толще ксеногенной ткани в местах разволокнения и деструкции коллагена, а также вблизи отложений кальция.

На поверхности БП обнаруживали локальные клеточные скопления, как правило, в местах выраженной деструкции наружных слоев. В участках концентрации клеток коллагеновые волокна были разрыхлены и частично фрагментированы, а их окончания ориентированы перпендикулярно поверхности исследуемого образца (рис. 1а, б). Отмечены тесный контакт клеток с волокнами и их проникновение в толщу протеза в виде цепочек, расположенных вдоль волокон коллагена (рис. 1 в). При этом наблюдали различную глубину инвазии клеток, в некоторых областях ограниченную лишь поверхностным слоем, в других — значительно распространяющуюся в ткань створки (рис. 1в, г). По морфологическим характеристикам клетки на поверхности и в поверхностном слое БП могут быть отнесены

663

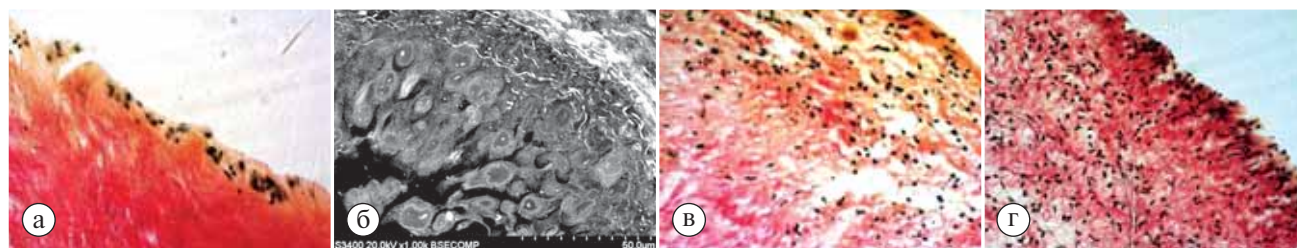


Рис. 1. Локализация клеток на поверхности (а, б) и близлежащих слоях (в, г) биопротеза. Условные обозначения: а, в, г — световая микроскопия, окраска по Ван-Гизону, ув. 400; б — сканирующая электронная микроскопия в обратно-рассеянных электронах, ув. 1000

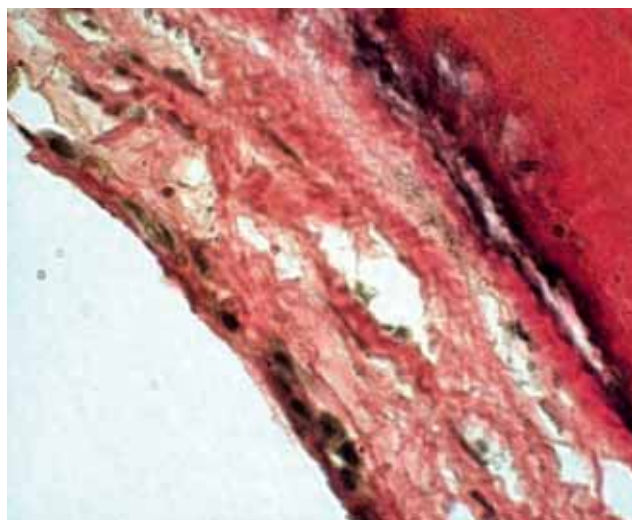


Рис. 2. Эндотелиоподобные клетки на поверхности исследуемого образца, ув. 400, окраска по Ван-Гизону

к моноцитам крови. Судя по морфофункциональным критериям (крупным и интенсивно окрашенным ядрам с четкими контурами), данные клетки находились в состоянии метаболической активности, некоторые из них — в стадии деления (см. рис. 1 б). Кроме того, на поверхности створки и прилегающем к ней внутреннем слое наблюдали большое количество неклеточного материала, окрашенного в желтый цвет, предположительно фибрина (см. рис. 1 в, г).

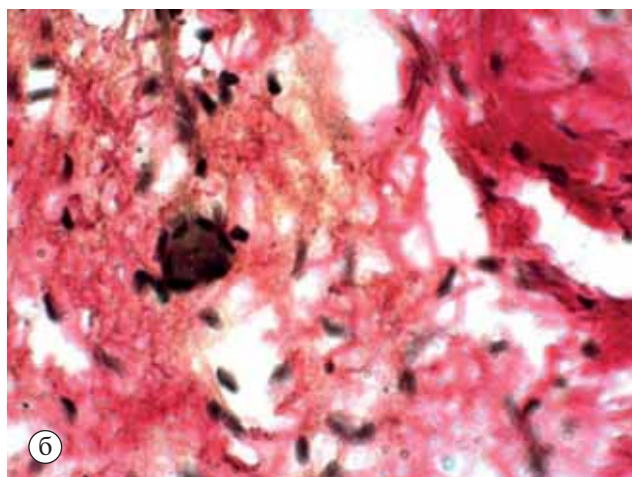
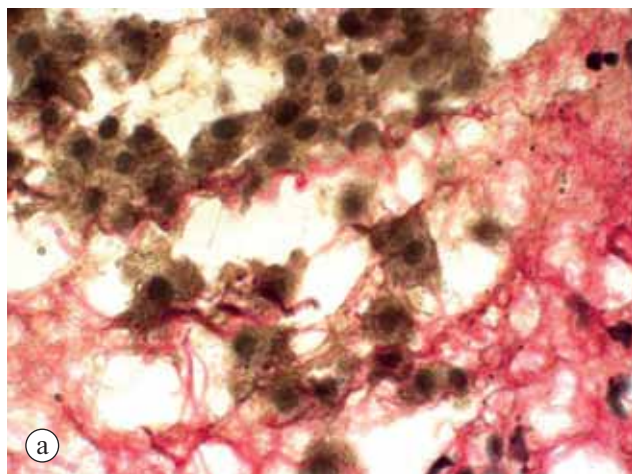


Рис. 3. Макрофаги (а) и гигантские многоядерные клетки (б) в составе биопротеза. Ув. 400, окраска по Ван-Гизону

Отдельные участки поверхностного слоя протеза были покрыты эндотелиоподобными клетками. В проекции этих зон в толще створки наблюдали лишь единичные клеточные элементы. Исходя из этого можно предположить, что эндотелизация поверхности препятствует взаимодействию моноцитов с тканью протеза и их миграции вглубь исследуемого образца (рис. 2).

Клетки, инфильтрирующие толщу створки, можно отнести к двум популяциям: элементам иммунной системы (макрофаги, гигантские многоядерные клетки, плазматические клетки, нейтрофилы) и клеткам соединительной и мышечной ткани (фибробласты, фиброциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки).

Макрофаги обычно наблюдали в зонах выраженной деструкции соединительнотканной основы БП. Часто они образовывали большие скопления и находились в тесном контакте с волокнами. В местах концентрации макрофагов отмечали нарушение структуры сложного переплетения пучков и волокон. При этом межпучковые пространства были расширены, а фрагментированные волокна образовывали ячеистые сети. Также выявляли деграцию и лизис коллагеновых структур. В цитоплазме макрофагов регистрировали большое количество вакуолей (рис. 3 а). Плазмциты, нейтрофилы, эозинофилы и гигантские многоядерные клетки располагались поодиночке в окружении волокон коллагена в толще исследуемых образцов (рис. 3 б).

Во внутренних слоях исследуемых створок БП обнаруживали фибробласты различной степени зрелости, которые встречались группами или в виде отдельных кле-

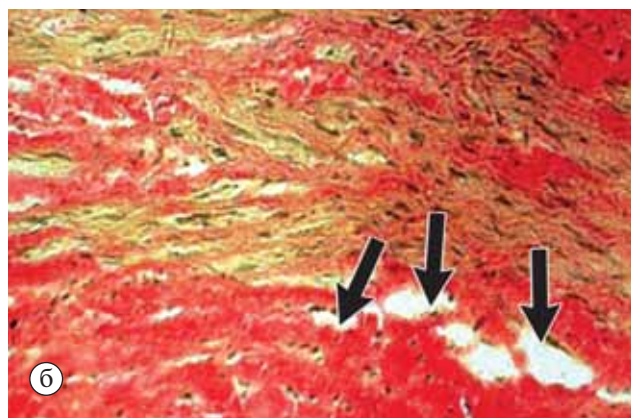
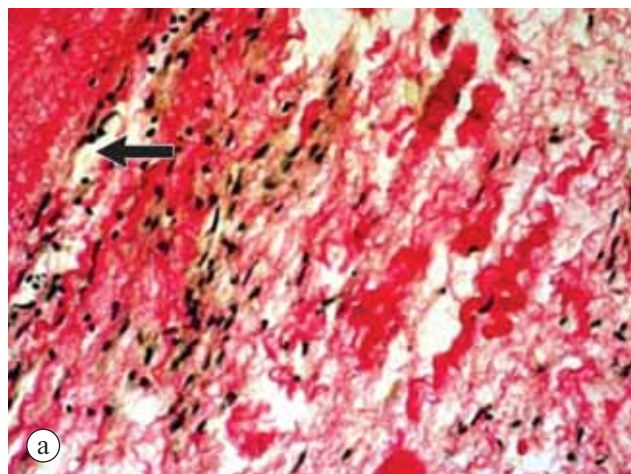


Рис. 4. Молодые фибробласты, заполняющие тканевые дефекты биопротеза. Условные обозначения: а — окраска гематоксилин-эозином; б — окраска по Ван-Гизону. Стрелками показаны капилляры. Ув. 200

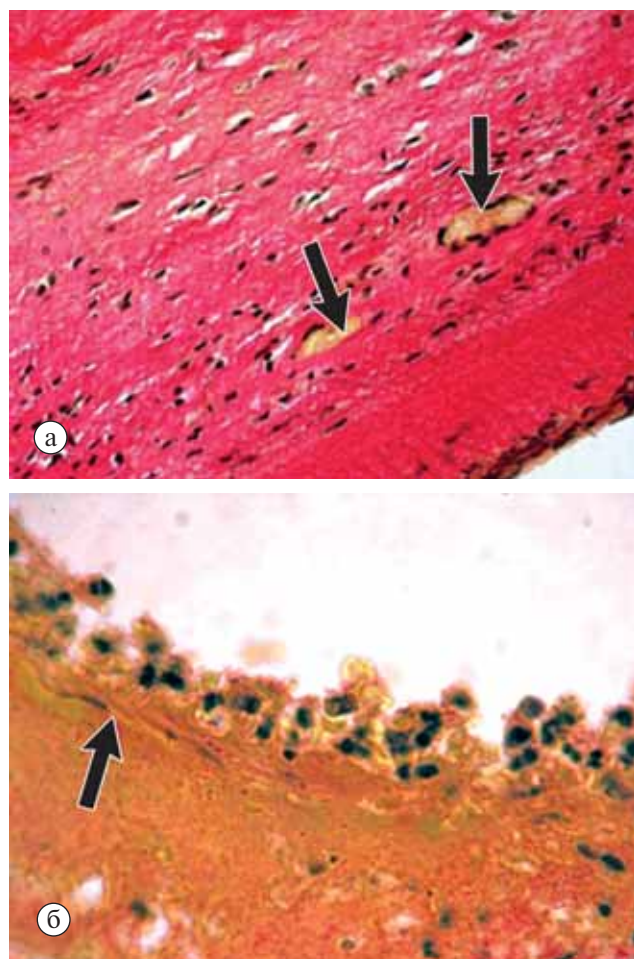


Рис. 5. Капилляры (показаны стрелками) вблизи поверхности биопротеза. Условные обозначения: а — поперечный срез капилляров, окраска гематоксилином-эозином, ув. 200; б — продольный срез через капилляр, окраска по Ван-Гизону, ув. 400

ток. Обычно они располагались между пучками волокон либо прикреплялись к стенкам полостей, образованных коллагеновыми структурами. В отдельных образцах в местах выраженной деструкции соединительнотканной основы и образования полостей большого объема отмечали фибробласты, активно формирующие новую ткань (рис. 4). Эта ткань образовывалась по типу своеобразных «заплат», закрывающих существующие дефекты створ-

ки. Свежеобразованные «заплат» были представлены фибробластами и компактными пучками коллагеновых волокон, сохранившими извитость и менее интенсивно, чем окружающий ксеногенный материал, окрашивающихся по Ван-Гизону. В некоторых случаях вновь образованная соединительная ткань занимала достаточно большой объем.

Кроме того, в толще ксеногенных образцов были выявлены клетки, идентифицированные как эндотелиоциты. Они выстилали щелевидные пространства между волокнами коллагена, образуя элементы, схожие с капиллярами. Нередко просветы таких новообразованных сосудов содержали эритроциты (рис. 5). Вблизи тканевых «заплат» наблюдали хорошо структурированные капилляры, которые, как правило, близко примыкали к участкам регенерации тканей и, вероятно, принимали участие в их кровоснабжении.

Часть клеток, обнаруженных в створках эксплантированных ксеногенных клапанов, по морфологическим признакам была отнесена к гладкомышечным. Они располагались как поодиночке, так и образовывали линейные структуры или скопления, окруженные свободным пространством (рис. 6).

При идентификации минеральных отложений отмечено, что наиболее распространенной локализацией являются внутренние слои створок БП, преимущественно в области оснований. Депозиты кальция характеризовались разнообразием форм, размеров и клеточного окружения. В результате исследования взаимодействия минерального материала с биологическими структурами обнаружены два варианта взаимоотношений. В первом случае кальцинат контактировал лишь с ксенотканью самой створки, при этом наблюдали ее интеграцию в структуру кальцината, в составе которого визуализировали волокна коллагена (рис. 7а). Во втором варианте в местах контакта минерального и биологического материала наблюдали присутствие клеток (рис. 7 б, г). Они либо образовывали плотный слой на границе с кальцинатом, либо располагались диффузно, формируя губчатую структуру, заполняющую пространство между минеральным депозитом и собственной тканью БП (см. рис. 7 г). По морфологическим характеристикам клетки, окружающие кальцинат, можно отнести к моноцитарному ряду и фибробластической группе.

В ряде случаев в толще исследуемых образцов створок наряду с клеточными элементами отмечали нали-

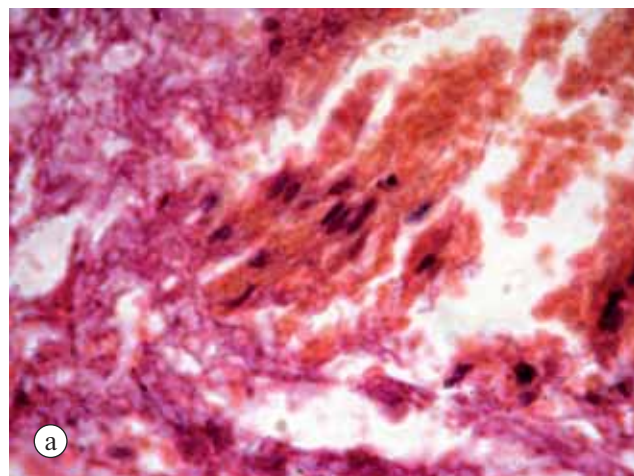


Рис. 6. Гладкомышечные клетки в структуре биопротеза. Условные обозначения: а — окраска гематоксилином-эозином, б — окрасивание по Ван-Гизону, ув. 400

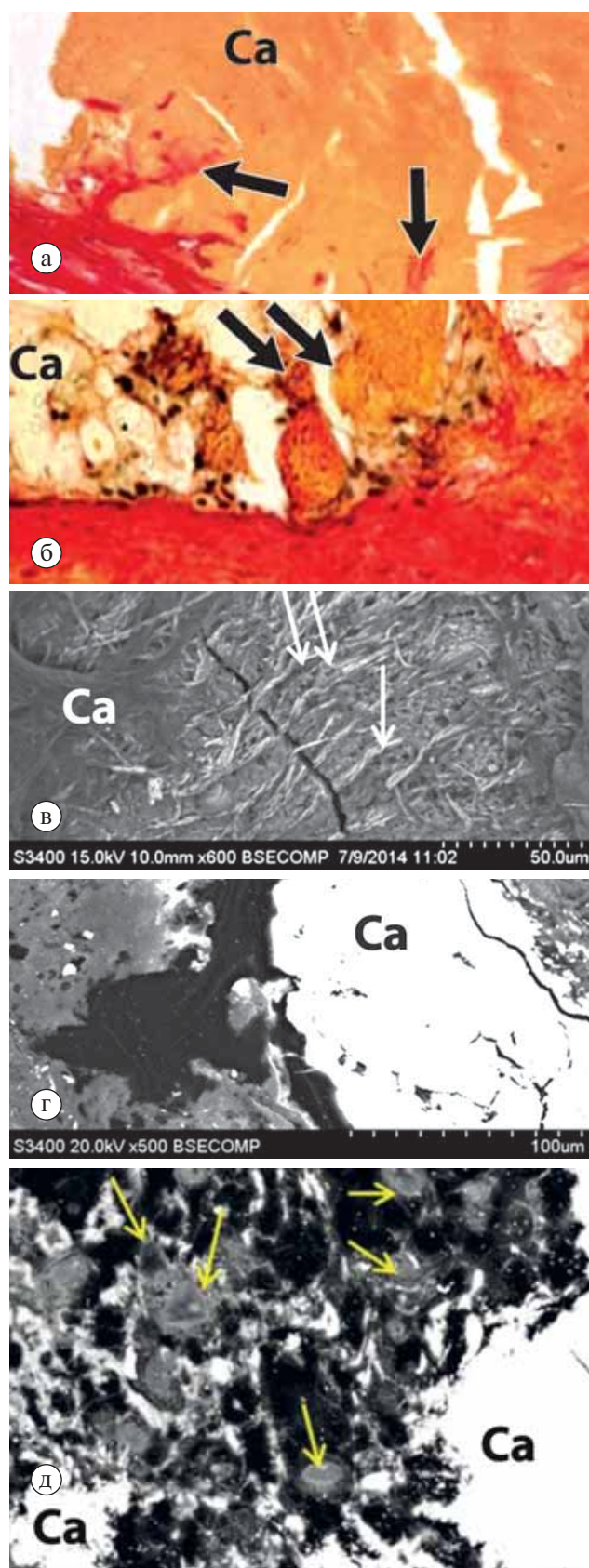


Рис. 7. Распределение отложений кальция в биологическом материале протеза. Условные обозначения: а, в, г — отсутствие клеток на границе между кальциевыми включениями и материалом биопротеза; б, д — наличие клеток вблизи включений кальция; а, б — световая микроскопия, окраска по Ван-Гизону; г, д — СЭМ в обратно-рассеянных электронах; в — СЭМ в отраженных электронах. Стрелками показаны: а, в — коллагеновые структуры в составе кальцификата; б, д — клетки. Ув: а, б — 400, в — 600, г — 500, д — 1000



Рис. 8. Кристаллические отложения холестерина. Ув. 200, окраска по Ван-Гизону

чие структурированных отложений, имеющих морфологическое сходство с кристаллами холестерина (рис. 8).

Обсуждение

Современные подходы к решению проблемы продления сроков функционирования БП клапанов сердца реализуются в нескольких направлениях, включающих усовершенствование конструктивных и механических характеристик имплантируемых клапанов, методов химической обработки ксеноткани, а также исследование факторов реципиента, способных оказывать влияние на темпы развития структурных дисфункций, и изучение тонких механизмов и процессов, лежащих в основе дистрофического обызвествления.

На основании существовавшей ранее гипотезы о решающем влиянии на структурную стабильность ксеногенной ткани особенностей консервирующего агента в клинике НИИ КПССЗ был разработан и внедрен альтернативный способ обработки БП. Использование диглицидового эфира этиленгликоля вместо традиционного глутарового альдегида стало итогом длительной исследовательской работы в области поиска путей повышения минералорезистентности биологических имплантатов, но отдаленные результаты наблюдений, к сожалению, не продемонстрировали ожидаемой устойчивости эпокси-обработанных клапанов к биодеградации, ассоциированной с кальцификацией.

В настоящее время к проблеме патологической минерализации мягких тканей привлечено внимание широкого круга исследователей, однако работы, изучающие различные нюансы данного процесса, по большей части касаются механизмов развития атеросклеротического поражения сосудистой стенки и/или дегенеративного стеноза нативного аортального клапана [4–6]. В связи с потенциальным вовлечением клеточных механизмов в реализацию данного патологического процесса возникает особый интерес к изучению состава эксплантационных БП с дальнейшей оценкой возможного участия идентифицированных клеток в развитии кальциевой альтерации эпоксиобработанной ксеноткани.

В настоящее время большинство исследователей разделяют предположение, что темпы развития кальцификации биологических материалов, определяемые совокупным влиянием факторов имплантата и реципиента,

подвержены активной регуляции на генетическом, клеточном и гуморальном уровне [12–16]. В свою очередь, на моделях атеросклероза и кальцинированного аортального стеноза убедительно продемонстрировано, что в основе кальцификации лежит проостеогенная клеточная трансформация, ассоциированная с экспрессией и транскрипцией тех же специфических маркеров и регуляторных белков, что и процессы физиологического остеогенеза [17–20]. Современная теория патологической минерализации мягких тканей подразумевает существование субпопуляций полипотентных клеток-предшественников, способных реагировать на внешние стимулы фенотипической трансформацией в направлении проостеогенных линий [21–23].

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что в процессе кальцификации происходит заселение БП клеточным материалом. Большое разнообразие и структурная сохранность клеток с высокой долей вероятности позволяют предполагать их принадлежность реципиенту. В пользу данного утверждения также свидетельствует выявленная миграция клеточных элементов с поверхности в глубину ткани створок. Установлено, что наиболее активное проникновение клеток из крови происходит в местах разрушения поверхностных слоев БП, откуда через образовавшиеся дефекты они перемещаются по ходу волокон. Еще одной морфологической особенностью взаимодействия клеток реципиента со структурами имплантированного клапана является наличие в зоне контакта фибрина, локализованного не только на поверхности, но и в прилегающем к ней слое исследуемых образцов створок. Имеющиеся данные не позволяют однозначно судить о роли фибрина в миграции клеток, однако не исключают его возможности обеспечивать адгезию клеточных элементов с поверхностью протеза.

Следует отметить, что среди клеток, инфильтрирующих ксеноткань клапана, нейтрофилы, лимфоциты и плазмоциты составляют лишь небольшую часть. Таким образом, проявления иммуновоспалительной реакции организма реципиента на имплантат, на наш взгляд, нельзя считать достаточно убедительными.

Наиболее представительной явилась группа клеток фибробластического дифферона, в том числе активно продуцирующих экстрацеллюлярный матрикс, что, вероятно, может отражать течение процессов ремоделирования, проявляющихся образованием так называемых тканевых заплат. Наличие неоваскуляризации ксеногенного материала, в свою очередь, способствует поддержанию репопуляции БП и обеспечению нормального функционирования клеток.

Наряду с новообразованием соединительной ткани в толще исследуемых образцов створок наблюдали зоны разрушения, являющиеся местами концентрации элементов моноцитарно-макрофагальной системы, активно лизирующих продукты деградации коллагена. Не исключено, что в одних участках данные клетки могли «уступать» место предшественникам фибробластов, что закономерно завершается новообразованием волокнистых структур, а в других — полипотентным клеткам, дифференцирующимся в направлении проостеогенных линий. В пользу последнего предположения свидетельствует обнаружение клеточных скоплений на границе кальцификата и материала БП.

В настоящее время ряд авторов разделяет точку зрения, что через дефекты поверхностного слоя БП в его толщу из системного кровотока наряду с мононуклеарами могут проникать полипотентные предшествен-

ники, способные подвергаться фенотипической проостеогенной трансформации [6, 22, 23]. В данном случае девитализированная ткань протеза выполняет роль своеобразной матрицы для фиксации стволовых и других клеток реципиента, циркулирующих в крови. Этот механизм минерализации известен как «циркулирующая клеточная теория» [23]. В роли хемоаттрактантов для клеток-предшественников, по всей вероятности, могут выступать окисленные липиды и/или холестерин, содержащиеся в ксеногенной ткани имплантируемых протезов [24]. Присутствие кристаллов холестерина в тесном контакте с клеточными элементами образцов створок может либо подтверждать его роль в обеспечении процессов клеточной миграции, либо свидетельствовать об идентичных механизмах, лежащих в основе патологической минерализации БП и атеросклеротического поражения стенок артерий. Последнее предположение совпадает с мнением исследователей о наличии универсальных процессов, лежащих в основе патологической минерализации элементов сердечно-сосудистой системы и биоимплантатов [3, 6].

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что в изучаемом материале параллельно протекают два разнонаправленных клеточно-опосредованных процесса: санация ксеногенной ткани при участии макрофагов и ее структурная регенерация, ассоциированная с активностью фибробластов реципиента. Можно ожидать, что удаление в процессе консервации и предимплантационной обработки протеза девитализированных клеток и разрушенных участков экстрацеллюлярного матрикса должно способствовать подавлению его кальцификации [2]. С другой стороны, часть клеток реципиента из клеточного пула, активно заселяющего БП, способна, дифференцируясь в клетки остеобластического ряда, потенцировать возникновение кальцийассоциированных дисфункций.

Представленных данных, безусловно, недостаточно для установления роли идентифицированных клеточных элементов в развитии кальциевой альтерации образцов эпоксиобработанных створок. В свою очередь, выявленное многообразие клеток предполагает различные варианты их контактов друг с другом и с окружающим ксеногенным материалом, который, видимо, также способен оказывать модулирующее влияние на межклеточные взаимодействия [18, 25] и гуморальные сигналы регуляции. Для понимания сложных процессов клеточной интеграции и трансформации в направлении остеобластных или остеокластных фенотипов, безусловно, необходимо проведение дальнейших углубленных и масштабных исследований.

Заключение

Полученные результаты позволяют подтвердить жизнеспособность известной теории об участии клеточно-опосредованных механизмов в развитии дистрофического обызвествления биоматериалов в организме реципиента применительно к использованию эпоксиобработанных ксеноаортальных протезов клапанов сердца. Наличие многочисленных структурно сохраненных клеток при гистологическом исследовании кальцинированных образцов створок может свидетельствовать о возможности реализации различных вариантов меж- и внутриклеточных взаимодействий, потенцирующих возникновение структурных дисфункций имплантированных клапанов. В свою очередь, параллелизм патоморфологических из-

менений, наблюдаемых при исследовании нативных элементов сердечно-сосудистой системы и девитализированных в процессе консервации БП, может предполагать наличие универсальных звеньев, составляющих патогенетическую основу развития минерализации мягких тканей. Последующие работы в данном направлении, в том числе исследования внутриклеточного проостеогенного сигнального каскада и модулирующего влияния комплекса разнообразных экзогенных и эндогенных факторов, по-

зволят не только проникнуть в суть данных изменений, но и определить возможности их фармакологической коррекции.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tillquist M., Maddox T. Cardiac crossroads: deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement. *Patient Prefer. Adherence*. 2011; 5: 91–99.
2. Schoen F.J., Levy R.J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 79: 1072–1080.
3. Aronow W.S. Osteoporosis, osteopenia and atherosclerotic vascular disease. *Arch. Med. Sci.* 2011; 7 (1): 21–26.
4. Miller J.D., Weiss R.M., Heistad D.D. Calcific aortic valve stenosis: methods, models and mechanisms. *Circ. Res.* 2011; 108: 1392–1412.
5. Hjortnaes J., Butcher J., Figueiredo J.L., Riccio M., Kohler R.H., Kozloff K.M., Weissleder R., Aikawa E. Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation. *Eur. Heart J.* 2010; 31 (16): 1975–1984.
6. Sophie E.P., Aikawa E. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ. Res.* 2011; 108: 1381–1391.
7. Mahjoub Y., Mathieu P., Senechal M., Larose E., Dumesnil J., Després J.P., Pibarot P. ApoB/ApoA ratio is associated with increased risk bioprosthetic valve degeneration. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 61 (7): 752–761.
8. Barbarash O., Rutkovskaya N., Hryachkova O., Gruzdeva O., Uchasova E., Ponasenko A., Kondyukova N., Odarenko Y., Barbarash L. Impact of recipient related factors on structural dysfunction rates of xenoaortic bioprosthetic heart valve. *Patient Pref. Adher.* 2015; 9: 389–399.
9. Cote C., Pibarot P., Despres J.P., Mohty D., Cartier A., Arsenault B.J., Couture C., Mathieu P. Association between circulating oxidized low density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis. *Heart.* 2008; 94: 1175–1180.
10. Shetty R., Pibarot P., Auger A., Janvier R., Dagenais F., Perron J., Couture C., Voisine P., Després J.P., Mathieu P. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur. J. Clin. Invest.* 2009; 39: 471–480.
11. Мухамадияров Р.А., Севостьянова В.В., Нохрин А.В., Головкин А.С. Способ изготовления образцов биологических тканей в комплексе с имплантированными элементами для исследования световой микроскопией. Патент РФ на изобр. № 2564895. 10 октября 2015.
12. Peacock J.D., Levay A.K., Gillaspie D.B., Tao G., Lincoln J. Reduced sox9 function promotes heart valve calcification phenotypes in vivo. *Circ. Res.* 2010; 106: 712–719.
13. Honge J.L., Funder J.A., Pedersen T.B., Kronborg M.B., Hasenkam J.M. Degenerative processes in bioprosthetic mitral valves in juvenile pigs. *J. Cardiothorac. Surg.* 2011; 6: 72.
14. Cremer P.C., Rodriguez L.L., Griffin B.P., Tan C., Rodriguez R., Johnston D.R., Pettersson G.B., Menon V. Early Bioprosthetic Valve Failure: A Pictorial Review of Rare Causes. *JACC.* 2015; 8 (6): 737–740. DOI: 10.1016/j.jcmg.2014.06.025.
15. Gang-Jian G., Tao Chen, Hong-Min Zhou, Ke-Xiong Sun, Jun Li. Role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in the mechanism of calcification of aortic valve. *J. of Huazhong University of Science and Technology.* 2014; 34 (1): 33–36.
16. Naira V., Lawa K. B., Lia A.Y., Phillips K.R.B., Davidd T.E., Butanya J. Characterizing the inflammatory reaction in explanted Medtronic Freestyle stent less porcine aortic bioprosthesis over a 6 year period. *Cardiovascular. Pathology.* 2012; 21: 158–168.
17. Miller J.D., Weiss R.M., Serrano K.M., Castaneda L.E., Brooks R.M., Zimmerman K., Heistad D.D. Evidence for active regulation of pro-osteogenic signaling in advanced aortic valve disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30: 2482–2486.
18. Chen J.H., Simmons C.A. Cell matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circulation Research.* 2011; 108: 1510–1524.
19. Hénaut L., Mentaverri R., Liabeuf S., Bargnoux A.S., Delanaye P., Cavalier E., Cristol J.P., Massy Z., Kamel S. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification. *Ann. Biol. Clin.* 2015; 1; 73 (3): 271–287.
20. Demer L.L., Tintut Y. Inflammatory, Metabolic, and Genetic Mechanisms of Vascular Calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34: 715–723.
21. Wylie-Sears J., Aikawa E., Levine R.A., Yang J.H., Bischoff J. Mitral valve endothelial cells with osteogenic differentiation potential. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 598–607.
22. Evrard S., Delanaye P., Kamel S., Cristole J.P., Cavalier E. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clinica Chimica Acta.* 2015; 438: 401–414.
23. Pal S.N., Golledge J. Osteo-progenitors in vascular calcification: a circulating cell theory. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011; 18: 551–559.
24. Muratov R., Britikov D., Sachkov A., Akatov V., Soloviev V., Fadeeva I., Bockeria L. New approach to reduce allograft tissue immunogenicity. Experimental data. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2010; 10 (3): 408–412.
25. Lavenus S., Ricquier J.C., Layrolle P. Cell interaction with nanopatterned surface of implants. *Nanomedicine.* 2010; 5 (6): 937–947.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Мухамадияров Ринат Авхадиевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела клинической и экспериментальной кардиологии НИИ КПССЗ

Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6, тел.: +7 (3842) 64-42-38, e-mail: rem57@rambler.ru

Рутковская Наталья Витальевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории кардиоваскулярного биопротезирования отдела клинической и экспериментальной кардиологии НИИ КПССЗ

Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6, тел.: +7 (3842) 64-53-60, e-mail: wenys@mail.ru

Сидорова Ольга Дмитриевна, кандидат медицинских наук, заведующая кафедрой патологической анатомии Кемеровской государственной медицинской академии

Адрес: 650056, Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22А, тел.: +7 (3842) 73-48-48, e-mail: goopy-777@rambler.ru

Барбараш Леонид Семёнович, академик РАН, главный научный сотрудник НИИ КПССЗ

Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6, тел.: +7 (3842) 64-33-08, e-mail: director@kemcardio.ru

DOI: 10.15690/vramn532

Л.М. Огородова¹, С.В. Федосенко¹, А.С. Попенко², В.А. Петров¹, А.В. Тяхт², И.В. Салтыкова¹,
И.А. Деев¹, Е.С. Куликов¹, Н.А. Кириллова¹, В.М. Говорун^{2,3}, Е.С. Кострюкова^{2,3}

¹ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Российская Федерация

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация

Сравнительный анализ орофарингеальной микробиоты у больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой различной степени тяжести

Обоснование. Характеристика орофарингеальной микробиоты при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и бронхиальной астме (БА) в зависимости от тяжести течения заболеваний является актуальной задачей, решение которой позволит уточнить роль микробиоты в их патогенезе. **Цель исследования:** сравнительный анализ состава орофарингеальной микробиоты при ХОБЛ и БА разной степени выраженности симптомов. **Методы.** В исследование включены 138 больных, из них 88 с ХОБЛ, 50 — с БА. Для каждого пациента был собран анамнез жизни, проведено физикальное исследование и получен мазок из орофарингеальной области. Определение таксономического состава проводилось секвенированием генов бактериальной 16S рРНК с последующим биоинформатическим и статистическим анализом. **Результаты.** При сравнительном анализе были найдены различия в представленности микроорганизмов. Для микробиоты больных ХОБЛ 1–2-й степени тяжести в сравнении с образцами ХОБЛ 3–4-й степени на фоне снижения представленности *Prevotella melaninogenica* характерно более высокое содержание *Brevibacterium aureum* и представителей рода *Scardovia*, *Coprococcus*, *Haemophilus*, *Moryella*, *Dialister* и *Paludibacter*. Микробиота пациентов с тяжелой БА в сравнении с таковой при легкой персистирующей форме на фоне более низкого содержания бактерий рода *Prevotella* характеризуется более выраженным присутствием *Bifidobacterium longum*, *Prevotella nanceiensis*, *Neisseria cinerea*, *Aggregatibacter segnis*, а также представителей рода *Odoribacter*, *Alloicoccus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Parvimonas* и *Sneathia*. При сравнении микробиоты больных БА и ХОБЛ для пациентов с БА отмечалась более высокая представленность *P. melaninogenica* и микроорганизмов рода *Selenomonas*, *Granulicatella*, *Gemella*, а также снижение *Prevotella nigrescens*, *Haemophilus influenzae* и *Aggregatibacter*, *Alloicoccus*, *Catonella*, *Mycoplasma*, *Peptoniphilus*, *Sediminibacterium*. При этом различия в составе орофарингеальной микробиоты у больных тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ очень тяжелого течения не выявлены. **Заключение.** Отсутствие различий в бактериальной композиции орофарингеальной микробиоты у больных с тяжелыми формами ХОБЛ и БА позволяет высказать предположение о сходстве состояния бронхолегочной системы при тяжелых стадиях развития данных заболеваний.

Ключевые слова: микробиота, метагеном, 16S рРНК секвенирование, бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких.

(Для цитирования: Огородова Л.М., Федосенко С.В., Попенко А.С., Петров В.А., Тяхт А.В., Салтыкова И.В., Деев И.А., Куликов Е.С., Кириллова Н.А., Говорун В.М., Кострюкова Е.С. Сравнительный анализ орофарингеальной микробиоты у больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой различной степени тяжести. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 669–678. Doi: 10.15690/vramn532)

Обоснование

Одними из наиболее распространенных хронических заболеваний бронхолегочной системы среди взрослого населения, приводящих к существенному снижению качества жизни, обуславливающих раннюю инвалидизацию и высокую смертность больных являются хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и бронхиальная астма (БА). Данные заболевания причисляются к социально значимым, так как они сопряжены с существенным экономическим и социальным ущербом. ХОБЛ и БА характеризуются как высокими прямыми (медикаментозное обеспечение, экстренная медицинская помощь), так и косвенными (длительные периоды нетрудоспособности, выплаты по инвалидности) затратами ресурсов здравоохранения [1]. Этиология данных заболеваний на настоящий момент четко не установлена, патогенез же связывают с персистирующим легочным воспалением, которое при ХОБЛ связано с активацией преимущественно Th1-звена, а при БА — Th2. Клиническая картина обеих патологий характеризуется обструкцией дыхательных путей — лабильной в случае БА и постоянной при ХОБЛ, полифенотипичностью [2], а также значительным влиянием обострений на состояние здоровья, качество жизни больных и прогноз.

В настоящее время человеческий организм принято рассматривать в свете его симбиотических отношений с населяющими его микроорганизмами [3]. Микробиота представляет собой сложную систему взаимосвязанных сообществ микроорганизмов, таких как бактерии, вирусы, археи, грибки и простейшие, населяющих различные биотопы организма человека — желудочно-кишечный тракт, кожу с ее придатками и легкие. В состав самого обширного биотопа организма — кишечника — входят более 1000 видов различных бактерий, совокупный геном которых превышает геном человека более чем в 150 раз [4]. Макроорганизм и его микробное население в нормальных условиях находятся в состоянии динамического равновесия, поэтому для микрофлоры каждой области тела человека характерно относительное постоянство, и имеются эволюционно сложившиеся закономерности в количественном и качественном (видовом) ее составе как на уровне организма в целом, так и отдельных его органов и систем. Изменения состояния макроорганизма выражаются сменой микробного пейзажа всех участков тела.

На протяжении долгого времени основным методом оценки бактериального разнообразия являлось классическое культивирование бактерий на питательных средах. Однако культуральные методики не дают полной

картины микробиоты человека, так как при их помощи можно выявить лишь около 10–40% бактерий, населяющих человеческий организм [5]. Появление новых культуронезависимых методик оценки микробиоты человека, основанных на детекции генов бактериальной 16S рРНК, позволило сделать огромный скачок в идентификации видового состава бактериальной флоры [6].

На настоящий момент появляется все больше информации об изменении состава микробиоты человека при различных заболеваниях и его роли в патогенезе различных расстройств, в том числе болезней органов дыхания [3]. Микробиота дыхательных путей при ХОБЛ и БА была охарактеризована ранее [7], однако сравнительная характеристика флоры при различных степенях тяжести течения этих заболеваний является актуальной задачей.

Цель исследования: проведение сравнительного анализа состава орофарингеальной микробиоты при хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме разной степени тяжести.

Методы

Дизайн исследования

Проведено одномоментное сравнительное неинтервенционное исследование в параллельных группах, в рамках которого произведен сбор мазков с задней стенки глотки для исследования орофарингеальной микробиоты. Всего в исследование было включено 138 человек: мужчины и женщины в возрасте от 40 до 70 лет с диагнозами легкой контролируемой и частично контролируемой БА, тяжелой неконтролируемой БА; ХОБЛ средней, а также тяжелой и крайне тяжелой степени тяжести. Длительность соответствующего заболевания составляла

не менее 12 мес на момент подписания информированного согласия. Число больных с ХОБЛ — 88, среди них 57 с легкой и средней степенью тяжести, 31 — с тяжелым и очень тяжелым течением болезни. Количество больных с БА составило 50 человек: 23 пациента с легкой персистирующей (контролируемой и частично контролируемой) и 27 с тяжелой неконтролируемой формой. Длительность соответствующего заболевания составляла не менее 12 мес на момент подписания информированного согласия.

Критерии соответствия

В исследование включали больных БА и ХОБЛ стабильного течения с отсутствием анамнеза обострений на протяжении 4 нед и приема антибиотиков в течение 3 мес и более. В исследование включались некурящие больные БА, а также бывшие курильщики, страдающие астмой, со значением индекса курения менее 10 пачка/лет. Индекс курения у больных ХОБЛ составлял 10 и более пачка/лет. В исследование не включались больные БА и ХОБЛ, страдающие онкопатологией, тяжелой сопутствующей патологией в стадии декомпенсации, а также больные другими клинически значимыми заболеваниями бронхолегочной системы, которые, по мнению исследователя, могли повлиять на результаты исследования.

Описание медицинского вмешательства

Для каждого пациента был собран анамнез жизни, проведены физикальное исследование и оценка состояния по опроснику mMRC и шкале Ю.Л. Куницыной и Е.И. Шмелёва (2003) [8]. Для получения микробиоты верхних дыхательных путей у всех участников исследования производился забор орофарингеальных мазков по стандартной методике.

L.M. Ogorodova¹, S.V. Fedosenko¹, A.S. Popenko², V.A. Petrov¹, A.V. Tyakht², I.V. Saltykova¹,
I.A. Deev¹, E.S. Kulikov¹, N.A. Kirillova¹, V.M. Govorun^{2, 3}, E.S. Kostryukova^{2, 3}

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

³ Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation

Comparison Study of Oropharyngeal Microbiota in Case of Bronchial Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Different Severity Levels

Background: The result of comparative study of oropharyngeal microbiota taxonomic composition in patients with different severity level of bronchial asthma (BA) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is presented in this paper. **Aims:** To compare oropharyngeal microbiota composition in case of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease in different severity levels. **Methods:** 138 patients, 50 with BA and 88 with COPD were studied. For each patient was collected anamnesis vitae, swab from the back of the throat and performed physical examination. High-throughput 16S ribosomal RNA gene sequencing and bioinformatic analysis was employed to characterize the microbial communities. **Results:** As a result of the study was found a number of differences on various taxonomic levels in microbiota's composition within group of patients with different severity level of BA and group of patients with different severity level of COPD and between those groups. COPD patients with GOLD 1–2 in comparison with GOLD 3–4 patients are marked by prevalence of species *Brevibacterium aureum*, genus *Scardovia*, *Coprococcus*, *Haemophilus*, *Moryella*, *Dialister*, *Paludibacter* and decrease of *Prevotella melaninogenica* species. BA patients with severe uncontrolled asthma in comparison with patients which have mild persistent asthma are marked by decrease of *Prevotella* and increase of species *Bifidobacterium longum*, *Prevotella nanceiensis*, *Neisseria cinerea*, *Aggregatibacter segnis* and genus *Odoribacter*, *Alloicoccus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Sneathia*. Patient's microbiota in BA group in comparison with COPD group is characterized by the prevalence of *Prevotella melaninogenica* and genus *Selenomonas*, *Granulicatella* u *Gemella*, and decrease of *Prevotella nigrescens*, *Haemophilus influenza* and genus *Aggregatibacter*, *Alloicoccus*, *Catonella*, *Mycoplasma*, *Peptoniphilus* u *Sediminibacterium*. There are no differences between microbiota composition in case of severe uncontrolled BA and very severe COPD. **Conclusion:** Lack of differences in oropharyngeal microbiota taxonomic composition between patients with severe uncontrolled BA and very severe COPD allow us to suggest a similarity of bronchopulmonary system condition in case of diseases' severe stages.

Key words: microbiota, metagenome, bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease.

(For citation: Ogorodova L.M., Fedosenko S.V., Popenko A.S., Petrov V.A., Tyakht A.V., Saltykova I.V., Deev I.A., Kulikov E.S., Kirillova N.A., Govorun V.M., Kostryukova E.S. Comparison Study of Oropharyngeal Microbiota in Case of Bronchial Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Different Severity Levels. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 669–678. Doi: 10.15690/vramn532)

Анализ в подгруппах

Сравнение представленности микроорганизмов в орофарингеальной микробиоте проводилось между группами больных с ХОБЛ и БА, группами больных легкой персистирующей БА и ХОБЛ 1–2-й степени тяжести, легкой персистирующей БА и ХОБЛ 3–4-й степени тяжести, тяжелой БА и ХОБЛ 1–2-й степени тяжести, а также тяжелой БА и ХОБЛ 3–4-й степени тяжести, а также внутри групп больных с ХОБЛ и БА: между больными ХОБЛ 1–2-й и 3–4-й степени тяжести, легкой персистирующей и тяжелой БА.

Методы регистрации исходов

Для оценки видового состава микробиоты использовалось секвенирование образцов по вариабельным регионам V3–V4 последовательности генов 16S рНК на приборе Illumina MiSeq согласно стандартному протоколу производителя.

Этическая экспертиза

Согласно решению Локального этического комитета по этике ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России от 21.03.2011 за № 1927, работа соответствует требованиям этической экспертизы.

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывался. Фильтрация прочтений секвенатора по качеству и их таксономическая классификация по байесовскому алгоритму произведены с помощью программного обеспечения QIIME [9]; в качестве референса использовалась база данных таксономий Greengenes версии V13.5 [10]. Для статистического анализа представленности бактериальных таксонов в образцах использовался пакет metagenomeSeq языка R [11]. Среднее число соотношенных по таксономии ридов на образец составило 2151 ± 245 (здесь и далее: среднее значение $\pm$ стандартное отклонение).

Результаты

Общая оценка таксономического состава орофарингеальной микробиоты у пациентов с ХОБЛ и БА

В ходе исследования выполнен анализ таксономического состава метагеномных сообществ образцов орофарингеальных мазков больных БА в сравнении с пациентами с ХОБЛ при помощи многомерного шкалирования (Multidimensional Scaling, MDS) по метрике Брея–Кертиса (Bray–Curtis). Расстояние между точками на графике указывает на степень сходства таксономического состава образцов. При сравнении таксономического состава бактериальных сообществ от больных ХОБЛ с образцами группы контроля (образцы БА) существенные различия не выявлены, что подчеркивает схожесть таксономического состава исследуемых групп образцов (рис. 1).

При дальнейшей оценке состава бактериальных сообществ выделены преобладающие таксоны, составляющие в сумме 95% от общего числа бактерий по всем образцам. При сравнении данных анализа таксономического состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ и БА, полученных с использованием линейной регрессии, оптимизированной под метагеномные данные (пакет metagenomeSeq статистического языка R), выявлены статистически значимые различия в представленности некоторых отделов и родов микроорганизмов между группами. В частности, образцы орофаринге-

альных мазков больных БА в сравнении с образцами пациентов с ХОБЛ характеризуются достоверно более высоким содержанием микроорганизмов, относящихся к типу *Bacteroidetes* ($23,26 \pm 11,0$ и $21,1 \pm 13,1$, соответственно; $p = 0,0007$; рис. 2).

В то же время в группе образцов больных ХОБЛ по сравнению с группой контроля выявлена более высокая представленность микроорганизмов рода *Veillonella* ($14,71 \pm 9,3$ и $11,79 \pm 7,9$, соответственно; $p = 0,01$; рис. 3) и *Actinomyces* ($2,84 \pm 3,0$ и $2,49 \pm 2,4$, соответственно; $p = 0,01$; рис. 4).

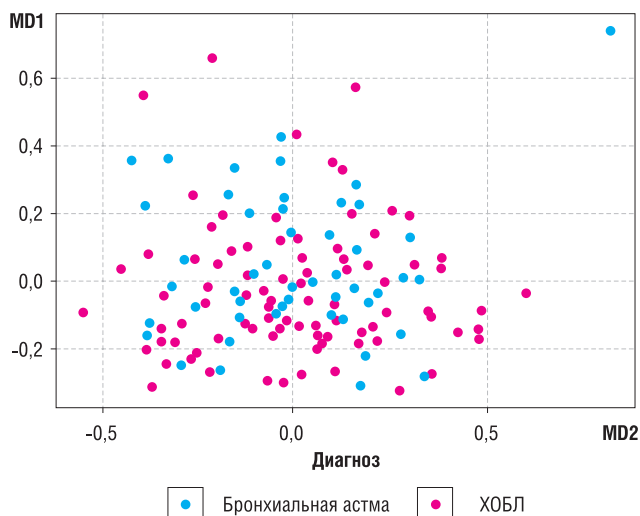


Рис. 1. График сходства таксономического состава метагеномов в образцах, полученных от больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ; $n = 88$) и бронхиальной астмой (БА; $n = 50$)

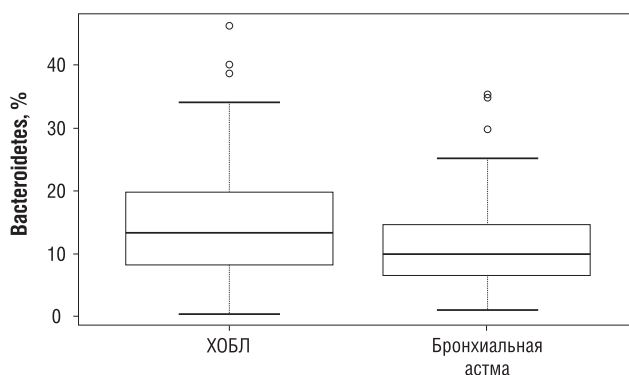


Рис. 2. Представленность типа *Bacteroidetes* в образцах орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмой

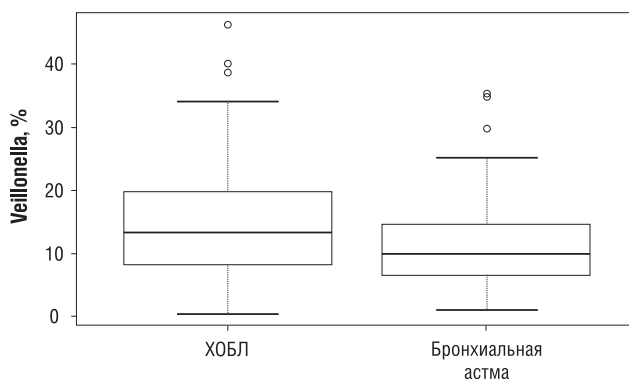


Рис. 3. Представленность рода *Veillonella* в образцах орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмой

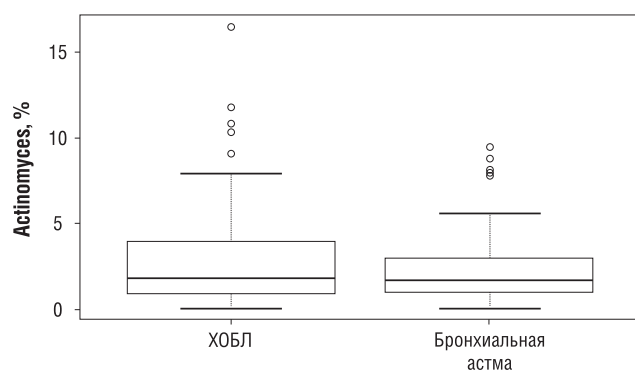


Рис. 4. Представленность рода *Actinomyces* в образцах орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмой

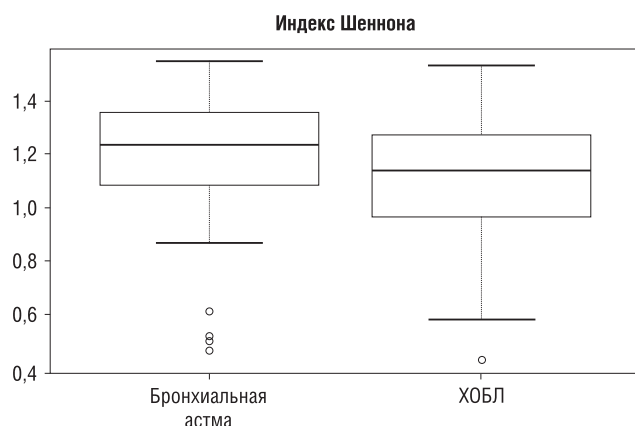


Рис. 5. Таксономическое разнообразие орофарингеальной микробиоты больных бронхиальной астмой ($n=50$) и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ; $n=88$)

Дополнительный анализ данных с помощью приложения metagenomeSeq позволил зарегистрировать ряд статистически значимых различий в таксономическом составе микробиоты между группами орофарингеальных

мазков больных БА и ХОБЛ. Так, образцы больных БА по сравнению с мазками пациентов с ХОБЛ характеризовались более высокой представленностью *Prevotella melaninogenica* и микроорганизмов таких родов, как *Selenomonas*, *Granulicatella* и *Gemella*, но меньшей — *Prevotella nigrescens*, *Haemophilus influenzae* и представителей рода *Aggregatibacter*, *Alcaligenaceae*, *Alloiococcus*, *Catonella*, *Mycoplasma*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcaceae* и *Sediminibacterium* (табл. 1).

С помощью анализа методом обобщенных линейных моделей выполнена оценка сходства и различий таксономического состава орофарингеальной микробиоты между группами больных легкой персистирующей БА и ХОБЛ 1–2-й степени тяжести, легкой персистирующей БА и ХОБЛ 3–4-й степени тяжести, тяжелой БА и ХОБЛ 1–2-й степени тяжести, а также тяжелой БА и ХОБЛ 3–4-й степени тяжести. В результате анализа обнаружено, что группа образцов больных легкой контролируемой и частично контролируемой астмой в отличие от образцов больных ХОБЛ легкого и среднетяжелого течения характеризуется более высокой представленностью как микроорганизмов рода *Fusobacterium* ($5,27 \pm 5,4$ и $3,05 \pm 4,2$, соответственно; $p=0,0007$), так и в целом представителей типа *Fusobacteria* ($9,53 \pm 8,4$ и $6,41 \pm 5,9$, соответственно; $p=0,00028$). В то же время в образцах больных ХОБЛ 1–2-й степени была выше представленность бактерий типа *Firmicutes* ($54,03 \pm 16,1$ и $46,44 \pm 17,8$, соответственно; $p=0,00039$) и рода *Veillonella* ($14,49 \pm 9,3$ и $11,25 \pm 6,6$, соответственно; $p=0,0094$) по сравнению с мазками пациентов с БА легкой стадии. В свою очередь, у больных тяжелой неконтролируемой БА содержание в орофарингеальных мазках микроорганизмов рода *Fusobacterium* достоверно выше, чем в образцах больных ХОБЛ легкого и среднетяжелого течения ($5,23 \pm 3$ и $3,055 \pm 4,2$, соответственно; $p=0,00023$). Важно отметить, что не получено статистически значимых различий в составе орофарингеальной микробиоты у больных тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения ($p>0,05$).

При проведении оценки различий таксономического разнообразия (альфа-разнообразия) орофарингеаль-

Таблица 1. Род микроорганизмов, представленность которых при анализе metagenomeSeq статистически значимо различается в образцах орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмой (БА)

Операционная таксономическая единица	Коэффициент наклона прямой*	Р-значение**	Состав метабенома (М±м) в образцах больных БА ($n=50$), %	Состав метабенома (М±м) в образцах больных ХОБЛ ($n=88$), %
<i>Alcaligenaceae</i>	-4,799	0,027	$0,065 \pm 0,466$	$0,466 \pm 0$
<i>Alloiococcus</i>	-1,728	0,0002	$0,029 \pm 0,19$	$0,19 \pm 0,005$
<i>Peptostreptococcaceae</i>	-1,586	0,00016	$0,022 \pm 0,081$	$0,081 \pm 0,004$
<i>Sediminibacterium</i>	-1,024	0,035	$0,034 \pm 0,085$	$0,085 \pm 0,013$
<i>Peptoniphilus</i>	-0,898	0,032	$0,057 \pm 0,253$	$0,253 \pm 0,023$
<i>Mycoplasma</i>	-0,747	0,00013	$0,053 \pm 0,134$	$0,134 \pm 0,027$
<i>Catonella</i>	-0,458	0,031	$0,104 \pm 0,129$	$0,129 \pm 0,068$
<i>Aggregatibacter</i>	-0,449	0,0084	$0,11 \pm 0,178$	$0,178 \pm 0,072$
<i>Prevotella nigrescens</i>	-0,343	0,0006	$0,207 \pm 0,636$	$0,636 \pm 0,152$
<i>Selenomonas</i>	-0,238	0,004	$0,461 \pm 0,392$	$0,392 \pm 0,37$
<i>Granulicatella</i>	-0,096	0,0075	$1,976 \pm 1,555$	$1,555 \pm 1,873$
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-0,041	0,0038	$11,014 \pm 7,879$	$7,879 \pm 10,929$
<i>Gemella</i>	0,186	0,00013	$0,89 \pm 0,706$	$0,706 \pm 1,11$
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,352	0,00882	$0,158 \pm 0,574$	$0,574 \pm 0,222$

Примечание. Здесь и в табл. 4, 5: * — чем выше значение коэффициента наклона прямой по модулю, тем сильнее выявленное влияние (значительное различие); ** представлены Р-значения (p-value) с поправкой на множественное сравнение по формуле Бонферрони.

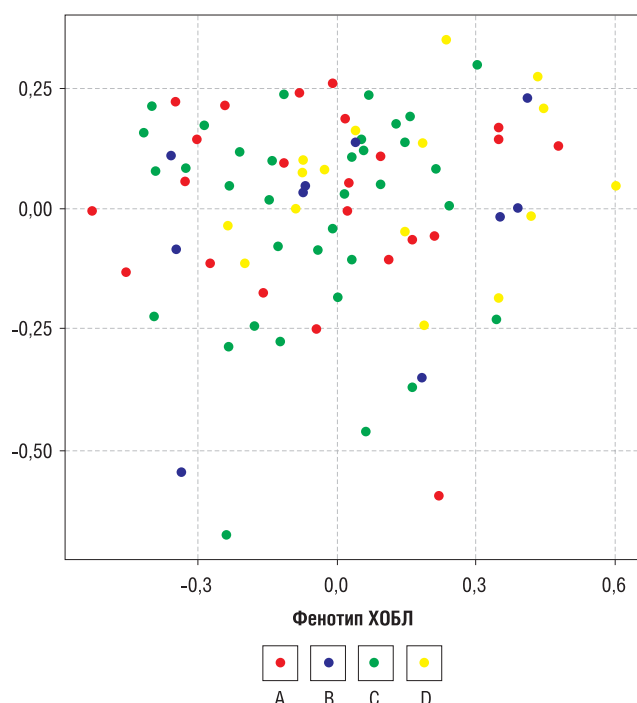


Рис. 6. График сходства таксономического состава метагеномов больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ; n =88)

Примечание. Тип А — пациенты с ХОБЛ 1–2-й степени тяжести с невыраженными симптомами и редкими обострениями, тип В — больные ХОБЛ 1–2-й степени тяжести с выраженными симптомами и редкими обострениями, тип С — больные ХОБЛ 3–4-й степени тяжести с невыраженными симптомами и частыми обострениями, тип D — больные ХОБЛ 3–4-й степени тяжести с выраженными симптомами и частыми обострениями.

ных микробиотических сообществ больных БА и ХОБЛ на основании сравнения значений индекса разнообразия Шеннона не выявлены статистически значимые различия в родовой представленности микроорганизмов, составляющих орофарингеальную микробиоту пациентов.

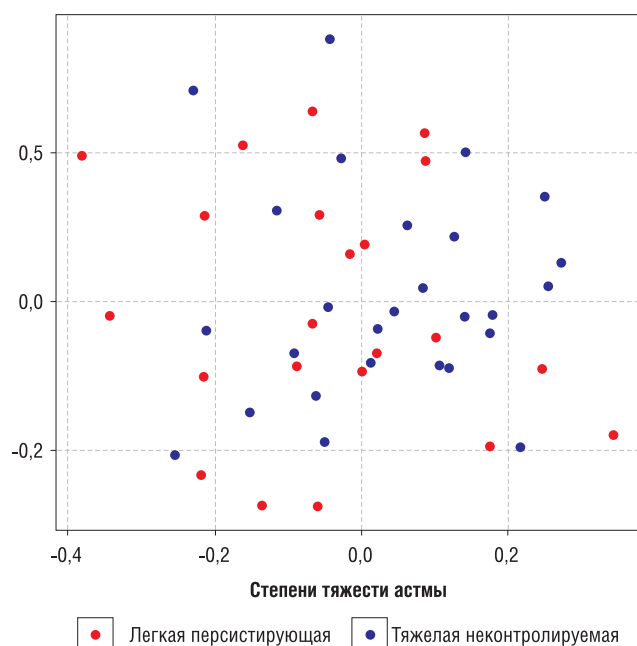


Рис. 7. График сходства таксономического состава метагеномов больных бронхиальной астмой (n =50)

Таблица 2. Преобладающий род микроорганизмов (в сумме 95% от метагенома во всех образцах орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких; n =88)

Род микроорганизмов	Состав метагенома*, %
<i>Streptococcus</i>	31,12±16,86
<i>Prevotella</i>	18,16±10,2
<i>Veillonella</i>	14,71±9,24
<i>Fusobacterium</i>	3,37±3,79
<i>Neisseria</i>	3,29±7,26
<i>Leptotrichia</i>	3,1±3,54
<i>Haemophilus</i>	3,01±4,79
<i>Actinomyces</i>	2,83±2,97
<i>Rothia</i>	2,26±1,82
<i>Porphyromonas</i>	2,12±4,15
<i>Granulicatella</i>	1,87±1,91
<i>Actinobacillus</i>	1,65±5,25
<i>Clostridiales</i>	1,5±1,69
<i>Gemella</i>	1,11±1,16
<i>Campylobacter</i>	1,04±1,37
<i>Gemellaceae</i>	0,77±1,1
<i>Megasphaera</i>	0,64±0,74
<i>Atopobium</i>	0,6±0,81
<i>Coprococcus</i>	0,59±0,58
<i>Capnocytophaga</i>	0,47±0,98
<i>Neisseriaceae</i>	0,46±1,15
<i>Selenomonas</i>	0,39±0,38

Примечание. Здесь и в табл.3: * — данные, представленные в виде $M \pm m$, означают среднее значение ± стандартное отклонение.

Таблица 3. Преобладающий род микроорганизмов (в сумме 95% от метагенома во всех образцах орофарингеальных мазков больных бронхиальной астмой; n =50)

Род микроорганизмов	Состав метагенома*, %
<i>Streptococcus</i>	28,71±15,51
<i>Prevotella</i>	19,26±8,5
<i>Veillonella</i>	11,79±7,91
<i>Fusobacterium</i>	5,25±4,93
<i>Neisseria</i>	4,54±7,31
<i>Leptotrichia</i>	3,3±5,58
<i>Porphyromonas</i>	2,85±4
<i>Haemophilus</i>	2,83±3,54
<i>Actinomyces</i>	2,48±2,39
<i>Rothia</i>	2,04±1,87
<i>Actinobacillus</i>	2±11,88
<i>Granulicatella</i>	1,97±1,55
<i>Clostridiales</i>	1,58±1,27
<i>Campylobacter</i>	1,23±1,04
<i>Gemella</i>	0,89±0,7
<i>Megasphaera</i>	0,65±0,85
<i>Gemellaceae</i>	0,59±0,67
<i>Capnocytophaga</i>	0,54±1,21
<i>Neisseriaceae</i>	0,53±1,07
<i>Coprococcus</i>	0,52±0,43
<i>Atopobium</i>	0,49±0,47
<i>Selenomonas</i>	0,47±0,39

В то же время при сравнении показателей таксономического разнообразия орофарингеальной микробиоты у больных БА и ХОБЛ на уровне типов выявлено, что значение среднего индекса Шеннона для группы образцов больных ХОБЛ несколько ниже, чем значение индекса альфа-разнообразия, рассчитанного для группы образцов больных БА ($1,10 \pm 0,24$ и $1,18 \pm 0,25$, соответственно, $p = 0,031$; рис. 5).

Оценка таксономического состава орофарингеальной микробиоты внутри групп пациентов с ХОБЛ и БА

С использованием многомерного шкалирования при оценке таксономического состава микробиотических сообществ внутри групп пациентов с ХОБЛ (рис. 6) и БА (рис. 7) с различной степенью тяжести течения заболеваний значимых различий не обнаружено.

Далее были выделены наиболее представленные таксоны метагеномных сообществ внутри групп больных БА и ХОБЛ (табл. 2, 3). Наиболее представленными родами ($\geq 10\%$ в структуре идентифицированных метагеномов внутри групп) являются *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella*. Среди преобладающих микроорганизмов, состав-

ляющих от 2 до 10% микробиоты, в образцах больных ХОБЛ следует выделить роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Porphyromonas* (см. табл. 2), а в образцах пациентов с БА — *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Actinobacillus* (см. табл. 3).

Исследование особенностей состава орофарингеальной микробиоты внутри группы больных БА в зависимости от тяжести заболевания с помощью пакета metagenomeSeq обнаружило, что в сравнении с легкой персистирующей (контролируемой и частично контролируемой) астмой образцы орофарингеальных мазков пациентов с тяжелой БА на фоне более низкого содержания бактерий рода *Prevotella* характеризуются более выраженным присутствием *Bifidobacterium longum*, *Prevotella nanceiensis*, *Neisseria cinerea*, *Aggregatibacter segnis*, а также представителей родов бактерий *Odoribacter*, *Alloiococcus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Moraxellaceae* и *Sneathia* (табл. 4).

Результаты анализа с использованием пакета приложений metagenomeSeq выявили, что орофарингеальной микробиоте больных ХОБЛ 1–2-й степени тяжести в

Таблица 4. Микроорганизмы, представленность которых при анализе metagenomeSeq статистически значимо различается в образцах орофарингеальных мазков больных легкой контролируемой/частично контролируемой и тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой (БА)

Операционная таксономическая единица	Коэффициент наклона прямой*	P-значение**	Состав метагенома (M $\pm$ m) в образцах больных легкой БА (n =23), %	Состав метагенома (M $\pm$ m) в образцах больных тяжелой БА (n =27), %
<i>Odoribacter</i>	-3,823	0,00893	0,075 $\pm$ 0,276	0,276 $\pm$ 0,002
<i>Alloiococcus</i>	-2,429	0,00347	0,058 $\pm$ 0,279	0,279 $\pm$ 0,005
<i>Bifidobacterium longum</i>	-2,357	0,00043	0,067 $\pm$ 0,197	0,197 $\pm$ 0,006
<i>Lactobacillus</i>	-1,71	0,0022	0,06 $\pm$ 0,201	0,201 $\pm$ 0,011
<i>Prevotella nanceiensis</i>	-0,406	0,00063	0,504 $\pm$ 1,509	1,509 $\pm$ 0,356
<i>Megasphaera</i>	-0,259	0,03213	0,731 $\pm$ 0,815	0,815 $\pm$ 0,583
<i>Neisseria cinerea</i>	-0,241	0,00127	1,292 $\pm$ 2,288	2,288 $\pm$ 1,056
<i>Prevotella</i>	-0,12	0,00016	5,964 $\pm$ 4,546	4,546 $\pm$ 5,301
<i>Parvimonas</i>	0,488	0,00745	0,187 $\pm$ 0,389	0,389 $\pm$ 0,302
<i>Aggregatibacter segnis</i>	1,225	0,01546	0,021 $\pm$ 0,043	0,043 $\pm$ 0,076
<i>Sneathia</i>	1,825	0,00033	0,013 $\pm$ 0,046	0,046 $\pm$ 0,082
<i>Moraxellaceae</i>	4,393	0,00069	0,001 $\pm$ 0,009	0,009 $\pm$ 0,166

Таблица 5. Микроорганизмы, представленность которых при анализе metagenomeSeq статистически значимо различается в образцах орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) 1–2-й и 3–4-й степени тяжести

Операционная таксономическая единица	Коэффициент наклона прямой*	P-значение**	Состав метагенома (M $\pm$ m) в образцах больных ХОБЛ 1–2-й степени (n =57), %	Состав метагенома (M $\pm$ m) в образцах больных ХОБЛ 3–4-й степени (n =31), %
<i>Brevibacterium aureum</i>	-3,442	0,04849	0,23 $\pm$ 0	0,042 $\pm$ 0,23
<i>Scardovia</i>	-1,607	0,01633	0,086 $\pm$ 0,005	0,028 $\pm$ 0,086
<i>Lachnospiraceae</i>	-0,381	0,00048	0,398 $\pm$ 0,256	0,385 $\pm$ 0,398
<i>Veillonellaceae</i>	-0,304	0,04597	0,605 $\pm$ 0,242	0,328 $\pm$ 0,605
<i>Coprococcus</i>	-0,245	0,00344	0,779 $\pm$ 0,531	0,708 $\pm$ 0,779
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0,054	0,01189	9,325 $\pm$ 11,122	10,575 $\pm$ 9,325
<i>Gemellaceae</i>	0,245	0,00102	0,9 $\pm$ 0,835	0,654 $\pm$ 0,9
<i>Haemophilus</i>	0,329	0,0132	1,063 $\pm$ 0,383	0,255 $\pm$ 1,063
<i>Moryella</i>	0,628	0,00878	0,121 $\pm$ 0,13	0,071 $\pm$ 0,121
<i>Dialister</i>	0,643	0,00023	0,194 $\pm$ 0,196	0,11 $\pm$ 0,194
<i>Paludibacter</i>	0,853	0,01817	0,131 $\pm$ 0,078	0,037 $\pm$ 0,131
<i>Leptotrichiaceae</i>	1,035	0,00551	0,092 $\pm$ 0,072	0,024 $\pm$ 0,092

сравнении с 3–4-й степенью тяжести на фоне снижения представленности *P. melaninogenica* свойственно более высокое содержание *Brevibacterium aureum* и представителей рода *Scardovia*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, *Coprococcus*, *Gemellaceae*, *Haemophilus*, *Moryella*, *Dialister*, *Paludibacter* и *Leptotrichiaceae* (табл. 5).

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

При внутригрупповом сравнении микробиотического ландшафта орофарингеальной области как у больных с БА, так и у пациентов с ХОБЛ отмечается изменение состава микробиоты в зависимости от тяжести заболевания.

Обсуждение основного результата исследования

Орофарингеальная микробиота больных с легкой персистирующей (контролируемой и частично контролируемой) БА в сравнении с пациентами, страдающими тяжелой астмой, характеризуется более выраженной представленностью бактерий рода *Prevotella*. Для большинства микроорганизмов этого рода характерна противовоспалительная активность в случае БА, которая заключается, в частности, в индукции синтеза интерлейкина 10 Т-клетками [12]. Однако при тяжелой БА на фоне снижения общей представленности рода *Prevotella* отмечается более выраженное присутствие вида *P. nanceiensis*. Данная бактерия относится к условно-патогенным микроорганизмам, способным вызывать инфекции дыхательных путей, мочеполовой системы и бактериемию [13]. Установлено, что легочное воспаление, вызываемое *P. nanceiensis*, опосредуется преимущественно активацией Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) [14], а чрезмерная активация TLR2 приводит к развитию тахифилаксии к препаратам бета-2 агонистов адреналиновых рецепторов, применяемых для лечения БА [15], и поддержанию нейтрофильной компоненты легочного воспаления. Основываясь на этом, можно предположить, что *P. nanceiensis* может служить фактором риска, обуславливающим рост резистентности к бронхолитикам у больных БА, приближая фенотип пациентов к таковому при нейтрофильной астме.

По данным метаанализа, бактерия *Bifidobacterium longum* ранее обнаруживалась в микробиоте кишечника у детей с аллергической симптоматикой, являясь ее значимым компонентом [16]. Нами было показано присутствие этой бактерии в орофарингеальном мазке у больных с тяжелой БА, что отражало сложную взаимосвязь биотопов человеческого организма и комплексного влияния состояния здоровья на микрофлору.

Neisseria cinerea присутствует в микробиоте орофарингеальной области как у здоровых людей, так и больных БА [17]. Этот микроорганизм считается непатогенным, который, однако, в случае иммуносупрессии способен вызывать образование деструктивных полостей легочной паренхимы [18].

Известно, что при снижении числа бактерий рода *Prevotella* в легочной ткани происходит рост представленности *Parvimonas* [19]. Сходная закономерность была выявлена и нами на примере микробиоты орофарингеальной области. Бактерии рода *Parvimonas* являются условно-патогенными микроорганизмами, играющими роль в развитии агрессивного периодонтита [20]. *Aggregatibacter segnis* также относится к условно-патогенным микроорганизмам, вызывающим периодонтит [21]. Связь *Aggregatibacter segnis* с БА установлена впервые, однако известно, что периодонтопатогенные бактерии играют роль

в патогенезе ХОБЛ [22], что также показано нами далее. Интересен факт более выраженного присутствия этого микроорганизма у больных с тяжелой БА по сравнению с легкой формой, что несколько приближает состав микробиоты тяжелой БА к ХОБЛ. Сходная закономерность наблюдается и для рода периодонтопатогенных бактерий *Megasphaera* [23].

Кроме того, известно о росте *Lactobacillus*, которые более представлены у больных с тяжелой БА, а также в микробиоте легочной ткани, взятой во время трансплантации легких у больных крайне тяжелой ХОБЛ [24]. И, наконец, стоит отметить более выраженное присутствие бактерий рода *Alloicoccus* у больных тяжелой БА по сравнению с легкой. Нами показана достоверно более высокая представленность этих бактерий у больных ХОБЛ по сравнению с совокупной выборкой больных БА. Выявленное нами увеличение обсемененности орофарингеальной области бактериями этих родов у больных тяжелой неконтролируемой БА, вероятно, может быть рассмотрено в качестве одного из факторов, сближающих фенотипически сходные варианты тяжелого течения БА и ХОБЛ у ряда пациентов.

Обсеменение дыхательных путей микроорганизмами семейства *Moraxellaceae* у новорожденных ассоциировано с последующим развитием хронического легочного воспаления и бронхообструктивного синдрома [25], которые являются предикторами развития БА. Нами было обнаружено повышение представленности этих бактерий у больных с тяжелой БА по сравнению с больными с легкой степенью заболевания, что говорит об их возможном влиянии на патогенез и течение астмы.

Кроме того, нами обнаружено более выраженное присутствие в микробиоте больных тяжелой БА представителей бактериальных родов *Odoribacter* и *Sneathia*, для которых еще не было показано ассоциации с этой болезнью.

Исследование состава бактериального ландшафта орофарингеальной микробиоты у пациентов с различными степенями тяжести ХОБЛ показало противоположную картину. Так, у больных ХОБЛ 3–4-й степени тяжести по сравнению пациентами с 1–2-й степенью отмечается снижение представленности *P. melaninogenica*. Кроме того, в орофарингеальной микробиоте у больных ХОБЛ 1–2-й степени тяжести отмечается более выраженное присутствие таких родов и семейств условно-патогенных микроорганизмов, как *Haemophilus*, *Leptotrichiaceae*, *Moryella*, *Lachnospiraceae*, и периодонтопатогенных бактерий семейств и родов *Scardovia* и *Veillonellaceae*. Также интересно более выраженное присутствие *Brevibacterium aureum* у больных ХОБЛ 1–2-й степени тяжести. Данная бактерия участвует в расщеплении цифлутрина — пестицида пиретроидного ряда [26]. Известно, что использование пестицидов увеличивает риск развития БА и ХОБЛ [27]. Учитывая более выраженную представленность условно-патогенных микроорганизмов при ХОБЛ 1–2-й степени по сравнению с 3–4-й степенью тяжести можно предположить, что в отличие от БА бактерии являются гораздо более значимым триггером, запускающим легочное воспаление, которое приводит к прогрессированию ХОБЛ впоследствии.

В целом, орофарингеальная микробиота больных БА и ХОБЛ характеризуется схожестью таксономического (качественного) состава как при межгрупповом, так и при внутригрупповом сравнении таксономического состава исследуемых групп образцов больных легкой персистирующей и тяжелой БА, а также мазков пациентов со среднетяжелой ХОБЛ в сравнении с орофарингеальными мазками больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого тече-

ния. При сравнении данных анализа таксономического состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ и БА выявлен ряд различий в представленности некоторых микроорганизмов.

Так, орофарингальная микрофлора больных БА характеризуется более высокой представленностью бактерий, относящихся к типу *Bacteroidetes*, которые являются значимым компонентом микробиоты здоровых индивидов [5]. Более выраженное присутствие *P. melaninogenica* является благоприятным фактором, благодаря способности данной бактерии несколько снижать активность воспаления в дыхательных путях, в частности путем модулирования иммунного ответа, а также препятствовать колонизации патогенных протеобактерий [14].

Уменьшение количества представителей рода *Granulicatella* и *Gemella* у больных с ХОБЛ, вероятно, отражает большую распространенность табакокурения у данной группы по сравнению с больными БА (индекс курения: среднее (БА) = 2,647, среднее (ХОБЛ) = 58,0412; $p < 0,05$), поскольку для данных бактерий показано снижение представленности в микробиоме ротовой полости в популяции курильщиков [28].

При анализе микробиоты пациентов отмечается выраженное присутствие *Haemophilus influenzae* в орофарингеальной микробиоте больных ХОБЛ в сравнении с пациентами, страдающими БА. *Haemophilus influenzae* — одна из самых частых находок у больных ХОБЛ как в обострении, так и вне его. Значимость и роль этой бактерии в патогенезе и течении ХОБЛ известна уже достаточно давно [29]. Носительство *Haemophilus influenzae* ассоциировано с более выраженным воспалением, высокой вероятностью развития обострений болезни и снижением легочного объема [30]. В состав рода *Mycoplasma*, который также повышен у больных ХОБЛ, входит возбудитель атипичных пневмоний — *M. pneumoniae*, также отмечается роль микоплазм в развитии венерических заболеваний. Роль микоплазменной инфекции в патогенезе стабильной ХОБЛ и ее осложнений остается дискуссионной. В орофарингеальной микробиоте больных ХОБЛ, а также в микробиоте здорового легкого отмечается более выраженное присутствие представителей рода *Actinomyces*, [31]. Согласно имеющимся данным, актиномицеты, в сравнении с другими легочными патогенами, такими как *Haemophilus*, *Veillonella* и *Moraxella*, оказывают гораздо меньшую стимуляцию легочных дендритных клеток на синтез провоспалительных цитокинов, таких как IL 12p70 и IL 23 [31].

Нами также было найдено преобладание у больных ХОБЛ, в сравнении с пациентами с БА, операционной таксономической единицы бактерий семейства *Alcaligenaceae*. В это семейство входят как непатогенные рода бактерий, населяющие природные биотопы, так и патогенные для человека микроорганизмы, относящиеся к роду *Bordetella*. Представители этого рода — патогены, вызывающие коклюш и инфекционный бронхит. Отмечается их роль в развитии обострений хронического бронхита [32].

Орофарингеальная флора больных ХОБЛ характеризовалась более выраженным, в сравнении с группой БА, присутствием нескольких родов бактерий, вовлеченных в патогенез воспалительных заболеваний тканей зуба и, вероятно, играющих роль в течении ХОБЛ. К таким бактериям можно отнести представителей рода *Aggregatibacter*, *Veillonella*, *Catonella*, семейства *Peptostreptococcaceae* и бактерий вида *P. nigrescens* [33, 34].

На настоящий момент появляется информация о влиянии микробиоты ротовой полости на тяжесть ХОБЛ. Об-

суждается возможность существования в ротовой полости пула условно-патогенных бактерий, которые могут иметь значение в патогенезе респираторных расстройств [35]. В ряде исследований отмечается связь между курением, наличием ХОБЛ и периодонтита. При персистирующем воспалении в случае периодонтита бактерии могут аспирироваться, вызывая воспаление нижних дыхательных путей и обострение заболевания. При лечении периодонтита у больных ХОБЛ снижается частота обострений по сравнению с нелеченным контролем, что, вероятно, подтверждает влияние патогенов ротовой полости на течение этой болезни [36]. Кроме того, более выраженное присутствие в орофарингеальной микробиоте больных ХОБЛ бактерий, наблюдаемых при периодонтите, может быть объяснено тем, что курение является фактором риска не только для ХОБЛ, но и для развития периодонтита [37]. Интересно, что представленность бактерий рода *Seletonomonas*, также участвующих в патогенезе периодонтита, у больных БА оказалась более высокой, чем у пациентов с ХОБЛ. Для этих бактерий, в отличие от вышеописанных, не показана ассоциация с курением: представленность данного патогена одинакова у курящих и некурящих больных с периодонтитом [38].

Следует также отметить преобладание у больных с ХОБЛ, по сравнению с пациентами, страдающими от БА, нескольких родов микроорганизмов, для которых ранее не показана связь с ХОБЛ и БА. Бактерии рода *Alloiococcus*, более представленные у больных с ХОБЛ, являются компонентами нормальной микробиоты, колонизирующими назофарингеальный регион, начиная с младенческого возраста. Эти микроорганизмы условно-патогенны, отмечается их роль в развитии среднего отита у детей [39].

Представители рода *Peptoniphilus* — анаэробные бактерии, населяющие в норме кожные покровы, половые органы и кишечник человека. Имеются данные об участии этих микроорганизмов в патогенезе различных гнойных инфекций, в том числе абсцессов [40] и хронического риносинусита [41].

Бактерии рода *Sediminibacterium* населяют природные и антропогенные биоценозы: эвтрофные озера, сточные воды, влажные почвы, а также систему городского водопровода, участвуя в процессе коррозии водопроводных труб посредством окисления ионов железа [42]. Их возможная роль в патогенезе ХОБЛ может сводиться к снижению эффективности реакции Фентона путем окисления ионов железа и, как следствие, улучшению защиты колоний патогенных микроорганизмов от окислительного стресса, индуцированного иммунной системой человека.

В свою очередь, не выявлены статистически значимые различия в составе орофарингеальной микробиоты у больных тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения.

Заключение

Таким образом, в таксономическом составе орофарингеальной микробиоты при ХОБЛ и БА были выявлены различия в представленности микроорганизмов на уровне семейств, родов и видов. В то же время различия в бактериальной композиции орофарингеальной микробиоты у больных с тяжелыми формами ХОБЛ и БА не выявлены, что позволяет высказать предположение о сходстве состояния бронхолегочной системы и сближении характера активности иммунной системы при тяжелых стадиях развития данных заболеваний. Такое сходство микро-

биотического ландшафта может говорить о возможном родстве этих двух болезней, рассматриваемом в рамках так называемой голландской гипотезы, однако более рациональным объяснением может послужить сходство влияния тяжелых патологических процессов на состояние дыхательной и иммунной системы.

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития на-

учно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение № 14.604.21.0075, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0075) с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета, который поддерживается Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- European Respiratory Society. European Lung White Book: Huddersfield, European Respiratory Society Journals. Ltd. 2003.
- Burgel PR, Paillasseur JL, Roche N. Identification of clinical phenotypes using cluster analyses in COPD patients with multiple comorbidities. *Biomed Res Int*. 2014;2014:420134. doi: 10.1155/2014/420134
- Cénit MC, Matzaraki V, Tigchelaar EF, Zhernakova A. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1981–1992. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.023
- Spasova DS, Charles D. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Surh Front Immunol*. 2014;5:318. doi: 10.3389/fimmu.2014.00318.
- Park H, Shin JW, Park SG, Kim W. Microbial communities in the upper respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2014;9(10):e109710. doi: 10.1371/journal.pone.0109710.
- Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res*. 2009;19(7):1141–1152. doi: 10.1101/gr.085464.108. Epub 2009 Apr 21.
- Sze MA, Hogg JC and Sin DD. Bacterial microbiome of lungs in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:229–238. doi: 10.2147/COPD.S38932.
- Кунцинина ЮЛ, Шмелев ЕИ. Противовоспалительная терапия больных при хронической обструктивной болезни легких. *Пульмонология*. 2003;2:111–116.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JJ, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335–6. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimera checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:5069–6002.
- Paulson JN, Pop M, Bravo HC. MetagenomeSeq: Statistical analysis for sparse high-throughput sequencing. Bioconductor package. URL: <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/metagenomeSeq.html> (Available: 22.11.2015).
- Hosoki K, Nakamura A, Kainuma K, Sugimoto M, Nagao M, Hiraguchi Y, Tanida H, Tokuda R, Wada H, Nobori T, Suga S, Fujisawa T. Differential activation of eosinophils by bacteria associated with asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(Suppl.2):16–22. doi: 10.1159/000350338
- Alauzet C, Mory F, Carlier JP, Marchand H, Jumas-Bilak E, Lozniewski A. *Prevotella nanceiensis* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57(Pt.10):2216–2220. doi: 10.1099/ijls.0.65173-0.
- Larsen JM, Musavian HS, Butt TM, Ingvorsen C, Thysen AH, Brix S. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma associated *Proteobacteria*, but not commensal *Prevotella* spp., promote toll like receptor 2 independent lung inflammation and pathology. *Immunology*. 2015;144(2):333–42. doi: 10.1111/imm.12376.
- Alkhouri H, Rumzum NN, Rahman MM, Fitz Patrick M, de Pedro M, Oliver BG, Bourke JE, Ammit AJ. TLR2 activation causes tachyphylaxis to β 2-agonists in vitro and ex vivo: modelling bacterial exacerbation. *Allergy*. 2014;69(9):1215–22. doi: 10.1111/all.12449.
- Melli LC, do Carmo-Rodrigues MS, Araújo-Filho HB, Solé D, de Moraes MB. Intestinal microbiota and allergic diseases: A systematic review. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015. doi: 10.1016/j.aller.2015.01.013 [Epub ahead of print].
- Ковалева ВВ, Андреева ЗМ, Федосеева ВН, Читаева ВГ. Выделение и идентификация нейссерий при бронхиальной астме. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1975;8:59–62.
- Kamar N, Chabbert V, Ribes D, Chabanon G, Faguer S, Mari A, Guitard J, Durand D, Rostaing L. Neisseria cinerea induced pulmonary cavitation in a renal transplant patient. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(7):2099–2100.
- Charlson ES, Chen J, Custers-Allen R, Bittinger K, Li H, Sinha R, Hwang J, Bushman FD, Collman RG. Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS One*. 2010;5(12):e15216. doi: 10.1371/journal.pone.0015216.
- Oettinger-Barak O, Sela MN, Sprecher H, Machtei EE. Clinical and microbiological characterization of localized aggressive periodontitis: a cohort study. *Aust Dent J*. 2014;59(2):165–171. doi: 10.1111/adj.12165.
- Nagasawa Y, Iio K, Fukuda S, Date Y, Iwatani H, Yamamoto R, Horii A, Inohara H, Imai E, Nakanishi T, Ohno H, Rakugi H, Isaka Y. Periodontal disease bacteria specific to tonsil in IgA nephropathy patients predicts the remission by the treatment. *PLoS One*. 2014;9(1):e81636. doi: 10.1371/journal.pone.0081636.
- Tan L, Wang H, Li C, Pan Y. 16S rDNA based metagenomic analysis of dental plaque and lung bacteria in patients with severe acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Periodontol Res*. 2014;49(6):760–769. doi: 10.1111/jre.12159.
- Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3944–3955.
- Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, McDonough JE, Campbell JD, Brothers JF, Erb-Downward JR, Huffnagle GB, Hayashi S, Elliott WM, Cooper J, Sin DD, Lenburg ME, Spira A, Mohn WW, Hogg JC. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(4):438–445. doi: 10.1164/rccm.201502-0223OC.
- De Schutter I, Dreesman A, Soetens O, De Waele M, Crockaert F, Verhaegen J, Piérard D, Malfroot A. In young children, persistent wheezing is associated with bronchial bacterial infection: a retrospective analysis. *BMC Pediatr*. 2012;12:83. doi: 10.1186/1471-2431-12-83.
- Chen S, Dong YH, Chang C, Deng Y, Zhang XF, Zhong G, Song H, Hu M, Zhang LH. Characterization of a novel cyfluthrin degrading bacterial strain *Brevibacterium aureum* and its biochemical degradation pathway. *Bioresour Technol*. 2013;132:16–23. doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.002.
- Amame A, Baldi I, Tessier JF, Raherison C, Bouvier G. Occupational exposure to pesticides and respiratory health. *Eur Respir Rev*. 2015;24(136):306–319. doi: 10.1183/16000617.00006014.
- Thomas AM, Gleber-Netto FO, Fernandes GR, Amorim M, Barbosa L.F, Francisco AL, de Andrade AG, Setubal JC, Kowalski LP, Nunes DN, Dias-Neto E. Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa biofilms. *BMC Microbiol*. 2014;14:250. doi: 10.1186/s12866-014-0250-2.

29. Finney LJ, Ritchie A, Pollard E, Johnston SL, Mallia P. Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on *Haemophilus influenzae*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:1119–1132. doi: 10.2147/COPD.S54477.
30. Tufvesson E, Björner L, Ekberg M. Patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronically colonized with *Haemophilus influenzae* during stable disease phase have increased airway inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:881–889. doi: 10.2147/COPD.S78748.
31. Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, Søndergaard JN, Musavian HS, Butt TM, Brix S. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *PLoS One*. 2012;7(2):e31976. doi: 10.1371/journal.pone.0031976.
32. Bonhoeffer J, Bär G, Riffelmann M, Soler M, Heininger U. The role of *Bordetella* infections in patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Infection*. 2005;33(1):13–17.
33. Li Y, He J, He Z, Zhou Y, Yuan M, Xu X, Sun F, Liu C, Li J, Xie W, Deng Y, Qin Y, VanNostrand JD, Xiao L, Wu L, Zhou J, Shi W, Zhou X. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME J*. 2014;8(9):1879–1891. doi: 10.1038/ismej.2014.28.
34. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001;28(5):377–388.
35. Tan L, Wang H, Li C, Pan Y. 16S rDNA-based metagenomic analysis of dental plaque and lung bacteria in patients with severe acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Periodontol Res*. 2014;49(6):760–769. doi: 10.1111/jre.12159.
36. Kucukcoskun M, Baser U, Oztekin G, Kiyan E, Yalcin F. Initial periodontal treatment for prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *J Periodontol*. 2013;84(7):863–870. doi: 10.1902/jop.2012.120399.
37. Hyman JJ, Reid BC. Cigarette smoking, periodontal disease: and chronic obstructive pulmonary disease. *J Periodontol*. 2004;75:9–15.
38. Medikeri RS, Lele SV, Jain PM, Mali P, Medikeri MR. Quantification of *Selenomonas sputigena* in Chronic Periodontitis in Smokers Using 16S rDNA Based PCR Analysis. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(4):ZC13–17. doi: 10.7860/JCDR/2015/12550.5782.
39. Ashhurst-Smith C, Hall ST, Burns CJ, Stuart J, Blackwell CC. In vitro inflammatory responses elicited by isolates of *Alloicoccus otitidis* obtained from children with otitis media with effusion. *Innate Immun*. 2014;20(3):320–326. doi: 10.1177/1753425913492181.
40. Ulger-Toprak N, Lawson PA, Summanen P, O'Neal L, Finegold SM. *Peptoniphilus duerdenii* sp. nov. and *Peptoniphilus koenoeneniae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012;62(Pt.10):2336–2341. doi: 10.1099/ijs.0.031997-0.
41. Jung MY, Cho JH, Shin Y, Paek J, Park IS, Kim JS, Paek J, Park IS, Kim JS, Kim W, Ma JY, Park SJ, Chang YH. *Anaerobe*. 2014;30:30–34. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.07.005.
42. Wang H, Hu C, Hu X, Yang M, Qu J. Water Res. Effects of disinfectant and biofilm on the corrosion of cast iron pipes in a reclaimed water distribution system. 2012;46(4):1070–1078. doi: 10.1016/j.watres.2011.12.001.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Огородова Людмила Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, заведующая кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, заместитель министра науки и образования Российской Федерации
Адрес: 634001, Томск, Московский тракт, д. 2, e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Федосенко Сергей Вячеславович, кандидат медицинских наук, докторант кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 634001, Томск, Московский тракт, д. 2, e-mail: s-fedosenko@mail.ru

Попенко Анна Сергеевна, лаборант лаборатории биоинформатики ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России
Адрес: 107023, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: kirika77@gmail.com

Петров Вячеслав Алексеевич, младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 634001, Томск, Московский тракт, д. 2, e-mail: vyacheslav.a.petrov@mail.ru

Тягт Александр Викторович, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории биоинформатики ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России
Адрес: 107023, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: at@niifhm.ru

Салтыкова Ирина Владимировна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 634001, Россия, Томск, Московский тракт, д. 2, тел.: +7 (382) 251-49-67, e-mail: ira.salticova@mail.ru

Деев Иван Анатольевич, доктор медицинских наук, ассистент кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 634001, Томск, Московский тракт, д. 2, тел.: +7 (382) 251-49-67, e-mail: ivandeyev@yandex.ru

Куликов Евгений Сергеевич, доктор медицинских наук, доцент кафедры общей врачебной практики и поликлинической терапии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 634001, Томск, Московский тракт, д. 2, тел.: +7 (382) 251-49-67, e-mail: evgeny.s.kulikov@gmail.com

Кириллова Наталья Александровна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры общей врачебной практики и поликлинической терапии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 634001, Томск, Московский тракт, д. 2, тел.: +7 (382) 251-49-67, e-mail: kirillova@mail.ru

Говорун Вадим Маркович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета
Адрес: 107023, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: niifhm@fmba.ru

Кострюкова Елена Сергеевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией постгеномных исследований в биологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета
Адрес: 107023, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: el-es@yandex.ru

DOI: 10.15690/vramn569

А.В. Лазарева, О.А. Крыжановская, Ю.А. Бочарова, И.В. Чеботарь, Н.А. Маянский

Научный центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Распространенность металло-β-лактамаз и эффлюкс-механизмов у карбапенемрезистентных госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в г. Москве в 2012–2015 гг.

Обоснование. Синегнойная палочка — *Pseudomonas aeruginosa* — входит в число наиболее актуальных возбудителей оппортунистических инфекций, являясь одной из главных причин госпитальной заболеваемости. **Цель:** проанализировать роль металло-β-лактамаз (МБЛ) и эффлюкс-механизмов в формировании карбапенемрезистентности у госпитальных штаммов *P. aeruginosa*. **Методы.** В качестве объектов исследования были использованы 54 изолята *P. aeruginosa* от детей и взрослых пациентов из трех госпиталей города Москвы, полученных в течение 2012–2015 гг. Для всех штаммов были определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) меропенема. Все отобранные штаммы были протестированы на наличие МБЛ путем подавления их активности этилендиаминтетрауксусной кислотой. Оценка активности эффлюкс-систем производилась на основе определения степени подавления МПК под влиянием ингибитора эффлюкса карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразона. **Результаты.** Было выявлено 69% (37/54) МБЛ-продуцирующих штаммов [МБЛ(+)], значимость эффлюкс-механизмов в формировании карбапенемрезистентности подтверждена у 54% (29/54) штаммов. В 19% (10/54) карбапенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa* не обнаружено ни МБЛ, ни активности эффлюкс-систем. Распространенность МБЛ положительно коррелировала ($r^S = 0,068$) с активностью эффлюкса: среди бактерий с отсутствием эффлюкс-активности было 60% МБЛ(+)-штаммов, среди изолятов с умеренным эффлюксом — 74%, а в популяции с гиперэкспрессией эффлюкса 83% штаммов обладали МБЛ. **Заключение.** Полученные результаты иллюстрируют широкую распространенность важнейших механизмов карбапенемрезистентности — МБЛ- и эффлюкс-активности — и доказывают существование сложных сочетаний различных форм устойчивости у одного и того же штамма. Полученная информация может быть полезной для создания лечебно-профилактических методов борьбы с карбапенемрезистентностью.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотикорезистентность, карбапенемы, эффлюкс, металло-β-лактамазы.

(Для цитирования: Лазарева А.В., Крыжановская О.А., Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Распространенность металло-β-лактамаз и эффлюкс-механизмов у карбапенемрезистентных госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в г. Москве в 2012–2015 гг. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 679–683. Doi: 10.15690/vramn569)

679

A.V. Lazareva, O.A. Kryzhanovskaya, Yu.A. Bocharova, I.V. Chebotar', N.A. Mayanskiy

Scientific Centre of Children Health, Moscow, Russian Federation

The Prevalence of Metallo-β-Lactamases and Efflux-Mediated Mechanisms in Carbapenem Nonsusceptible Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in Moscow in 2012–2015

Background. *Pseudomonas aeruginosa*, the major nosocomial opportunistic pathogen, is an important cause of infectious morbidity and mortality among immunocompromised patients. **Objective.** To establish the role of metallo-β-lactamases (MBL) and efflux-mediated mechanisms in conferring carbapenem resistance in nosocomial isolates of *P. aeruginosa*. **Methods.** We analyzed carbapenem nonsusceptible nosocomial *P. aeruginosa* isolates obtained from pediatric and adult patients at three hospitals in Moscow in 2012–2015. Carbapenem susceptibility was assessed using the E-test. In addition, minimal inhibitory concentrations (MICs) of meropenem were tested by the broth microdilution method. The presence of MBL was determined using the EDTA-mediated suppression test. Efflux-dependent resistance was measured using an assay based on MIC modification by an ionophore carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazine (CCCP). **Results.** A total of 54 carbapenem nonsusceptible *P. aeruginosa* isolates was examined. The presence of an MBL was detected in 37 (69%) isolates, 29 (54%) isolates had efflux-mediated resistance. In 10 (19%) isolates neither MBL nor efflux activity was found. Five out of 6 isolates (83%) with highly active efflux were MBL-positive. Among isolates with low efflux activity, 74% (17/23) possessed MBL, whereas in isolates with no efflux the rate of MBL-positivity was 60% (15/25). **Conclusion.** The prevalence of MBL- and efflux-mediated carbapenem resistance in nosocomial *P. aeruginosa* is high. Moreover, our results reveal that several resistance mechanisms may combine at the isolate level. These data may contribute to the development of novel strategies in combating carbapenem resistance.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, carbapenems, efflux, metallo-β-lactamases.

(For citation: Lazareva A.V., Kryzhanovskaya O.A., Bocharova Yu.A., Chebotar' I.V., Mayanskiy N.A. The Prevalence of Metallo-β-Lactamases and Efflux-Mediated Mechanisms in Carbapenem Nonsusceptible Nosocomial *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated in Moscow in 2012–2015. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 679–683. Doi: 10.15690/vramn569)

Обоснование

Патологические процессы, ассоциированные с *Pseudomonas aeruginosa*, занимают одно из ведущих мест в структуре инфекционной заболеваемости [1, 2]. В России доля *P. aeruginosa* среди всех возбудителей бактериальных нозокомиальных инфекций составляет более 20% [3]. Одним из самых негативных свойств *P. aeruginosa* является способность быстро адаптироваться к антибиотикам. Около 60% госпитальных штаммов синегнойной палочки резистентны к антисинегнойным цефалоспорином — цефепиму и цефтазидиму, почти 70% — к пиперациллину/тазобактаму; к имипенему и меропенему устойчивы 88,0 и 66,8% изолятов *P. aeruginosa*, соответственно [3]. Главные механизмы резистентности синегнойной палочки связаны с ферментзависимым разрушением антибиотика, нарушением транспорта антибиотика внутрь клетки через мембранные поры и активацией выведения (эффлюкс) препарата из клетки во внешнюю среду [4]. В связи с особой опасностью пристальное внимание клиницистов привлекают изоляты, которые резистентны к антисинегнойным карбапенемам — меропенему, имипенему и дорипенему. Большинство публикаций о карбапенемрезистентности *P. aeruginosa* базируется только на фенотипической регистрации этого феномена диско-диффузионным способом, с помощью Е-тестов либо на бактериологических анализаторах Vitek, Phoenix и др. [5]. Во многих работах регистрация карбапенемрезистентности сочетается с попыткой объяснить ее возникновение с позиции лишь одного из механизмов — выработки специальных β-лактамаз, которые получили название карбапенемазы [6, 7]. Наиболее активные карбапенемазы относятся к группе металло-β-лактамаз (МБЛ) [8]. В отечественной литературе практически отсутствуют публикации, посвященные изучению эффлюкс-механизмов и их вклада в формирование карбапенемрезистентности. Вместе с тем информация обо всех возможных механизмах карбапенемрезистентности может оказаться крайне важной для разработки новых лечебных подходов, которые позволят преодолеть барьер устойчивости *P. aeruginosa* к этой группе антибиотиков.

Цель настоящей работы — проанализировать роль металло-β-лактамаз и эффлюкс-механизмов в формировании карбапенемрезистентности у госпитальных штаммов *P. aeruginosa*.

Методы

Дизайн исследования

Работа проводилась по типу исследования серии случаев.

Критерии соответствия

Включение изолятов *P. aeruginosa* в исследование проводилось на основе критерия нечувствительности к карбапенемам, который определялся диско-диффузионным способом согласно современным требованиям [9, 10]. При оценке чувствительности использовали терминологию Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), описывая штаммы как «резистентные» (resistant), «чувствительные» (susceptible) или штаммы с промежуточной чувствительностью (intermediate, or no fully susceptible isolates exist) [10].

Описание эксперимента

Исследование включало пять последовательных этапов:

- 1) отбор клинических изолятов *P. aeruginosa*;
- 2) тестирование изолятов *P. aeruginosa* на наличие МБЛ;
- 3) определение для отобранных изолятов минимальных подавляющих концентраций (МПК) меропенема и оценка их эффлюкс-активности;
- 4) статистическая обработка полученных результатов;
- 5) формально-логический анализ полученных результатов.

Условия проведения исследования и методы регистрации результатов

Все отобранные штаммы были протестированы на наличие МБЛ согласно методике подавления активности МБЛ этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) [11]. Для всех штаммов были определены МПК меропенема в диапазоне двукратных разведений, содержащих от 0,5 до 8192 мкг/мл этого антибиотика [12]. Критерий МПК50 подразумевал значение МПК для 50% исследованных штаммов, МПК90 — для 90%. Для оценки активности эффлюкс-систем в 96-луночном планшете проводили определение МПК меропенема в присутствии ионофора карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразона (Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone, CCCP) в конечной концентрации 25 мкг/мл. Для этого СССР добавляли к культуре синегнойной палочки в бульоне Мюллера—Хинтона (0,5 ед. по МакФарланду), содержащей указанные выше разведения меропенема. В качестве контроля использовали пробы без добавления СССР. Об активности эффлюкса судили по отношению (кратности уменьшения, КУ) МПК меропенема в культурах без СССР к МПК при его добавлении. При величине КУ <4 регистрировали отсутствие эффлюкса, при КУ в диапазоне от 4 до 16 — умеренную активность, при КУ >16 — его высокую активность. В целом КУ ≥4 расценивался как критерий эффлюкса, значимый для формирования карбапенемрезистентности [13].

Каждый штамм исследовали трехкратно в двух повторях.

Этическая экспертиза

Авторы декларируют, что в настоящем исследовании не проводилась работа с историями болезней, а также не использовались ткани человеческого организма либо животные ткани.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов выполнена при помощи программного пакета Statistica 6.0. Сравнение МПК проводили с помощью критерия Краскелла—Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Манна—Уитни, корреляции оценивались помощью коэффициента Спирмена.

Результаты

Участники исследования

В качестве объекта исследования были использованы 54 карбапенемрезистентных изолята *P. aeruginosa* от детей и взрослых пациентов из трех лечебно-профилактических учреждений г. Москвы, полученные в течение 2012–2015 гг. МПК меропенема исследованных штаммов варьировали в диапазоне от 8 до 4096 мкг/мл (рис.), МПК50 составила 512 мкг/мл, МПК90 — 2048 мкг/мл.

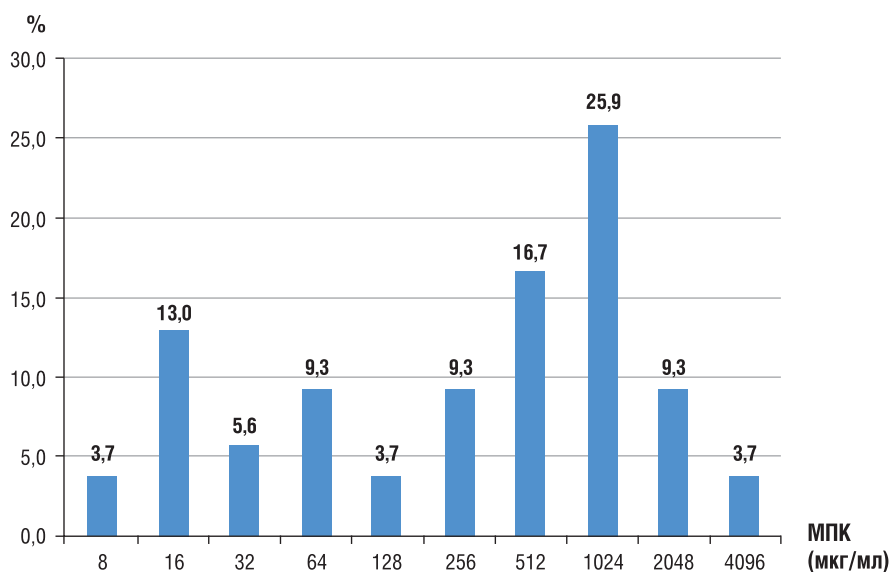


Рис. Распределение значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) меропенема у исследованных карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa* (n=54)

Примечание. По оси абсцисс — значения МПК меропенема (мкг/мл), по оси ординат — доля штаммов (%) с конкретным значением МПК.

Основные результаты исследования

Тест ЭДТА-зависимого подавления карбапенемазной активности выявил наличие МБЛ у 37 (69%) штаммов. У 29 (54%) штаммов под влиянием СССР наблюдалось уменьшение МПК в 4 и более раз, что свидетельствовало о наличии активного эффлюкса [эффлюкс(+)-штаммы]. У штаммов обнаружены различные сочетания продукции МБЛ и их эффлюкс-активности (табл. 1). Самым распространенным оказался вариант сочетания МБЛ(+) и эффлюкс(+): он встречался у 22 (41%) исследованных штаммов. Еще 15 (28%) штаммов обладали МБЛ, но не проявляли эффлюкс-активности. В 7 (13%) случаях регистрировался активный эффлюкс без продукции МБЛ. У 10 (19%) изолятов не было обнаружено ни МБЛ, ни активности эффлюкс-систем. Медианы (Ме) МПК всех перечисленных групп не отличались между собой (во всех случаях $p > 0,05$); в этих группах не было обнаружено корреляций между значениями МПК и наличием эффлюкса либо продукцией МБЛ.

Дополнительные результаты исследования

У эффлюкс(+)-штаммов КУ колебалась в диапазоне от 4 до 512 раз с Ме 4 (4; 16). В таблице показаны выраженность активации выведения препарата из клетки во внешнюю среду, значения МПК меропенема и наличие МБЛ у карбапенемрезистентных штаммов *P. aeruginosa*. У 25 штаммов (46%) эффлюкс меропенема отсутствовал;

умеренный уровень наблюдался у 23 (43%); 6 штаммов (11%) с КУ >16 были отнесены к группе с гиперактивным эффлюксом, в которой КУ варьировал в диапазоне от 64 до 512 раз. Ме МПК меропенема в группах с отсутствием эффлюкса или с его низким уровнем отличались между собой статистически незначимо ($p = 0,093$), но были значимо ниже значений МПК меропенема для группы штаммов с гиперактивностью эффлюкса ($p = 0,022$). Интересно, что процент распространения МБЛ имел положительную корреляцию (средний уровень корреляции, коэффициент корреляции Спирмена — $r^S = 0,068$) с уровнем активности эффлюкса: среди бактерий с отсутствием эффлюкс-активности было 60% МБЛ-продуцирующих штаммов, среди изолятов с умеренным эффлюксом — 74%, а в популяции с гиперэкспрессией — 83% (5 из 6 штаммов оказались МБЛ-положительными). И, наоборот, процент МБЛ-отрицательных штаммов уменьшался по мере нарастания активности эффлюкса.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Важнейшими находками настоящего исследования были штаммы с высокими значениями МПК меропенема — до 4096 мкг/мл, значительный процент распространенно-

Таблица 1. Активность эффлюкс-помп и значения МПК меропенема у МБЛ-позитивных и МБЛ-негативных штаммов *P. aeruginosa*

№	Активность эффлюкса	n (%)	МБЛ		МБЛ	
			Есть		Нет	
			n (%)	МПК меропенема, мкг/мл; Ме (25; 75)	n (%)	МПК меропенема, мкг/мл; Ме (25; 75)
1	Отсутствует (КУ <4)	25 (46)	15/25 (60)	256 (32; 1024) ¹	10/25 (40)	512 (512; 1024)
2	Умеренная (4 ≥ КУ ≤ 16)	23 (43)	17/23 (74)	128 (64; 512) ²	6/23 (20)	1024 (512; 1024)
3	Высокая (КУ >16)	6 (11)	5/6 (83)	2048 (1024; 2048) ³	1/6 (17)	4096

Примечание. МПК — минимальные подавляющие концентрации, МБЛ — металло-β-лактамаза, КУ — кратность уменьшения.

1 vs 2 — статистически незначимые различия ($p = 0,093$); 1 vs 3 — статистически значимые различия ($p = 0,017$); 2 vs 3 — статистически значимые различия ($p = 0,022$).

сти МБЛ-положительных (почти 70%) и эффлюкс-активных (54%) штаммов. Продукция МБЛ и эффлюкс-активность встречались в различных сочетаниях.

Обсуждение основного результата исследования

Данные о больших величинах МПК (до 4096 мкг/мл) для исследованных штаммов отличаются от результатов, полученных при широкомасштабном изучении госпитальных изолятов синегнойной палочки в России, Беларуси и Казахстане (2002–2010 гг.) [14]. В этом исследовании максимальные значения МПК меропенема для МБЛ-положительных штаммов составили 128 мкг/мл. Различие результатов может объясняться методикой оценки МПК. М.В. Edelstein и соавт. оценивали МПК, используя метод разведений антибиотиков в агаре (agar dilution method), который имеет ряд ограничений [14]. В настоящей работе МПК определялась более точным способом серийных разведений в бульоне. Высокие значения МПК нередко выявляются для современных госпитальных штаммов *P. aeruginosa*: в работе W. Zhao и соавт. все госпитальные штаммы, несущие ген *bla*_{IMP-10}, имели МПК 4096 мкг/мл и более [15].

Высокий уровень распространенности штаммов, продуцирующих МБЛ, не является особенным. Полученные в настоящей работе данные сходны с результатами исследования М.А. Al-Kabsi и соавт., которые обнаружили среди госпитальных карбапенемрезистентных изолятов 63% МБЛ-продуцирующих штаммов [16]. Такой большой процент МБЛ-штаммов среди карбапенемрезистентной популяции синегнойной палочки еще раз подтверждает исключительную значимость МБЛ в эволюции устойчивости бактерий к карбапенемам. Но, к сожалению, арсенал антикарбапенемных механизмов *P. aeruginosa* не исчерпывается только лактамазами, а определяется и другими механизмами [17]. В нашем исследовании почти у 54% исследованных изолятов было обнаружено значимое (в 4 раза и более) СССР-зависимое снижение МПК. Известно, что наиболее активное выведение β-лактамов из цитоплазмы синегнойной палочки реализуется через эффлюкс-системы MexCD-OpjG и MexAB-OpjM, работа которых ингибируется в присутствии СССР [18, 19]. Следовательно, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что более чем у половины изученных штаммов формирование карбапенемрезистентности происходило с участием эффлюкс-помп. Нередко у бактерий одного штамма является сочетание нескольких механизмов карбапенемрезистентности [15]. Прямые доказательства присутствия сочетанных механизмов следуют из анализа комбинаций МБЛ и эффлюкс-активности у конкретных штаммов. Около 40% изолятов продуцировали МБЛ и проявляли эффлюкс-активность одновременно. Данные соответствуют результатам, полученным в других лабораториях [20].

Наиболее интригующей выглядела группа карбапенемрезистентных штаммов (19%), у которых не было

обнаружено ни МБЛ, ни эффлюкса. Вероятное объяснение этого феномена связано с альтернативными механизмами формирования резистентности, оценка которых не входила в задачи настоящего исследования. Многочисленные работы иллюстрируют возможность развития устойчивости, обусловленной сериновыми карбапенемазами (например, ОХА-группа β-лактамаз), которые не ингибируются в присутствии ЭДТА [21]. Карбапенемрезистентность может быть следствием блокады поринопосредованного поступления карбапенема в цитоплазму бактерии [22]. Отсутствие корреляций между значениями МПК и наличием МБЛ не позволяет оценить вклад, который вносят эти механизмы в количественные показатели резистентности. Причина отсутствия корреляции может крыться в других, нерасшифрованных в настоящем исследовании механизмах устойчивости к карбапенемам. Интересной находкой была позитивная корреляция между уровнем эффлюкс-активности и распространенностью МБЛ. Это говорит о том, что два исследованных механизма резистентности могут работать в синергизме, вызывая рост ингибирующих концентраций карбапенемов до недостижимых в организме больного концентраций.

Заключение

Полученные результаты не только иллюстрируют распространенность важнейших механизмов карбапенемрезистентности — металло-β-лактамазной и эффлюкс-механизмов, но и доказывают существование сложных сочетаний различных вариантов устойчивости у одного и того же штамма. Около 40% карбапенемрезистентных нозокомиальных изолятов синегнойной палочки имеют комбинацию МБЛ-продукции и эффлюкс-механизмов, а у 19% штаммов карбапенемрезистентность не зависит ни от МБЛ, ни от эффлюкс-систем. Полученная информация может быть полезной для создания лечебно-профилактических методов борьбы с карбапенемрезистентностью.

Источник финансирования

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.607.21.0064, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0064).

Конфликт интересов

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руднов ВА, Бельский ДВ, Дехнич АВ. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2011;13(4):294–304.
2. Custovic A, Smajilovic J, Hadzic S, Ahmetagic S, Tihic N, Hadzagic H. Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. *Materia socio-medica*. 2014;26 (1):7–11. doi: 10.5455/msm.2014.26.7–11
3. Сухорукова МВ, Эйдельштейн МВ, Склеенова ЕЮ, Иванчик НВ, Тимохова АВ, Шек ЕА, Дехнич АВ, Козлов РС. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России. Результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРА-ФОН в 2011–2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014;16(4):273–279.
4. Страчунский ЛС, Белоусов ЮБ, Козлов СН. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. *Смоленск: НИИХ СГМА*. 2002. 586 с.
5. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-β-lactamase mediated resistances: a summary

- report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*. 2005;41(Suppl.4):276–278.
6. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier JD, Edelstein M, Frère JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagou V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(4):380–888. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.10.008
 7. Hrabák J, Cervená D, Izdebski R, Duljasz W, Gniadkowski M, Fridrichová M, Urbásková P, Zemlicková H. Regional spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 producing IMP-7 metallo- β -lactamase in Central Europe. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):474–475. doi: 10.1128/JCM.00684-10
 8. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*. 2015;47(2):81–97. doi: 10.3947/ic.2015.47.2.81
 9. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. Клинические рекомендации. М. 2014.
 10. EUCAST Clinical breakpoints bacteria. URL: <http://www.eucast.org>. (Available: 14.11.2015).
 11. Шевченко ОВ, Эйдельштейн МВ, Степанова МН. Металло- β -лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2007;1:211–218.
 12. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни. 2010.
 13. Ardebili A, Lari AR, Talebi M. Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Ann Lab Med*. 2014;34(6):433–438. doi: 10.3343/alm.2014.34.6.433
 14. Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'souza JW, Tapalski DV, et al. Spread of extensively resistant VIM-2 positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect. Dis*. 2013;13(10):867–876.
 15. Zhao WH, Hu Z, Chen G, Ito R, Hu ZQ. Contributions of IMP-10 metallo- β -lactamase, the outer membrane barrier and the MexAB-OprM efflux system to high level carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy*. 2009;55(3):168–174. doi: 10.1159/000217745
 16. Al-Kabsi AM, Yusof MYBM, Mansor M, Siok Yan GO, Manikam R, Sekaran SD. Multidrug efflux pumps over expression and its association with porin down regulation and β -lactamase production among nosocomial *P. aeruginosa* isolates from University of Malaya Medical Center, Malaysia. *IJCEBS*. 2015;3(2):125–135.
 17. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6):3–10. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.011
 18. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXYOprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(12):3322–3327. doi: 10.1128/AAC.44.12.3322-3327.2000
 19. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis*. 1998;27(Suppl.1):32–41.
 20. Xavier DE, Picao RC, Girardello R, Fehlberg LCC, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol*. 2010;10:217. doi: 10.1186/1471-2180-10-217
 21. Sacha P, Michalska A, Ojdana D, Wiecek P, Hauschild T, Majewski P, Tryniszewska E. Identification of plasmid OXA and other β -lactamase genes among carbapenem resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the Clinical University Hospital in northeastern Poland. *New Microbiol*. 2015;38(2):271–275.
 22. Li H, Luo YF, Williams BW, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012;302(2):63–68. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.10.001

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Лазарева Анна Валерьевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией микробиологии Научного центра здоровья детей

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (499) 134-53-87, **e-mail:** annalaz71@mail.ru

Крыжановская Ольга Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии Научного центра здоровья детей

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (499) 134-53-87, **e-mail:** o-kryzhanovskaya@yandex.ru

Бочарова Юлия Александровна, лаборант-исследователь лаборатории микробиологии Научного центра здоровья детей

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (499) 134-53-87, **e-mail:** ivrin7@mail.ru

Чеботарь Игорь Викторович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии Научного центра здоровья детей

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (499) 134-53-87, **e-mail:** nizarnn@yandex.ru

Маянский Николай Андреевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторным отделом Научного центра здоровья детей

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, **тел.:** +7 (499) 134-02-18, **e-mail:** mayansky@nczd.ru

Компоненты системы деградомы в прогрессии плоскоклеточных карцином головы и шеи

Все процессы опухолевой прогрессии тесно связаны с протеолитическими системами — внутриклеточными, внеклеточными, внутримембранными. Множество работ указывает на то, что протеазы функционируют как часть обширной многовекторной сети протеолитических взаимодействий. Нарушение строго контролируемого равновесия системы протеолиза описано при ряде заболеваний, включая онкологические. Статья посвящена обзору имеющихся в современной литературе данных о вкладе внутриклеточного, внеклеточного и внутримембранного протеолиза в процессы прогрессирования плоскоклеточного рака головы и шеи. Конкретные механизмы взаимодействия протеолитических систем разных уровней и локализаций при прогрессировании опухолевого процесса как в целом, так и при плоскоклеточном раке головы и шеи в частности остаются малоизвестными. Многогранность функций и сложность взаимосвязей протеолитических систем выдвигает на первый план важность изучения участия всех компонентов деградомы в прогрессии опухоли, что может прояснить сложные многозвеньевые механизмы канцерогенеза плоскоклеточного рака головы и шеи и выявить возможные маркеры прогрессии и/или мишени для терапевтических воздействий.

Ключевые слова: протеазы, деградомы, плоскоклеточный рак головы и шеи, метастазирование, маркеры.

(Для цитирования: Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Компоненты системы деградомы в прогрессии плоскоклеточных карцином головы и шеи. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 684—693. Doi: 10.15690/vramn563)

Введение

В структуре общей онкологической заболеваемости злокачественные опухоли головы и шеи занимают шестое ранговое место и составляют от 15 до 20%. Основным морфологическим типом опухолей головы и шеи является плоскоклеточный рак. Считается, что основными причинами смертности при плоскоклеточном раке головы и шеи (ПРГШ) являются рецидивы, лимфогенные метастазирование и, относительно реже, гематогенные метастазы, при этом почти 40% больных ПРГШ погибают уже на первом году после постановки диагноза [1]. Таким образом, поиск информативных и надежных маркеров для диагностики метастазов и рецидивов до их клинического проявления считается одним из путей по улучшению результатов лечения онкологических больных, а также актуальной задачей для практической онкологии и предметом пристального внимания для молекулярных исследований [2, 3]. Для получения эффективных и надежных диагностикомов важно иметь ясное представление о биологических характеристиках опухоли, о молекуляр-

ных путях злокачественной трансформации и прогрессии опухолевого процесса. Изучение молекулярного профиля биологической агрессивности опухоли будет иметь большое значение не только для разработки диагностических панелей, но может создать в последующем платформу для поиска новых мишеней таргетной терапии.

Известно, что биологическая агрессивность опухоли определяется способностью опухолевых клеток к инвазии и метастазированию, что является следствием приобретения ими целого ряда фенотипических характеристик, включающих дисрегуляцию адгезивных взаимодействий опухолевых клеток, приобретение клеткой локомоторного фенотипа, индукцию ангиогенеза, пролиферацию и выживаемость клеток в новом, не свойственном им микроокружении, а также продуцирование протеолитических ферментов [4].

Доказано, что все процессы развития опухолей тесно связаны с протеолитическими системами — внутриклеточными, внеклеточными, внутримембранными. Результаты множества работ указывают на то, что протеазы функционируют как обширная многовекторная

G.V. Kakurina, I.V. Kondakova, E.L. Choinzonov

Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russian Federation

Degradome Components in Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck

The process of tumor progression is closely related to the intracellular, extracellular and intramembranous proteolysis. Many studies indicate that the proteases function as part of an extensive multidirectional network of proteolytic interactions. Disturbance of strictly controlled equilibrium of the proteolytic system is described in a number of diseases, including cancer. The paper presents a review of the available data concerning the contribution of intracellular, extracellular and intramembrane proteolysis to the process of squamous cell head and neck carcinoma. Specific mechanisms of interaction of different proteolytic systems in cancer progression both in general and in squamous cell head and neck carcinoma remain underinvestigated. The versatility of functions and complexity of the relationships between proteolytic systems highlights the importance of studying the participation of all degradome components in tumor progression that may clarify the multi-link complex mechanisms of carcinogenesis of squamous cell head and neck carcinoma and to identify markers of progression and/or a targets for therapeutic intervention.

Key words: proteases, degradome, squamous head and neck cancer, metastasis, markers.

(For citation: Kakurina G.V., Kondakova I.V., Choinzonov E.L. Degradome Components in Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 684—693. Doi: 10.15690/vramn563)

сеть протеолитических взаимодействий [5]. Комплекс протеаз, состав которого строго координируется клетками и тканью, участвует в модуляции микроокружения опухолевых клеток и носит название ракового деградомы, представлен по крайней мере 569 протеазами пяти каталитических классов [6]. Основную часть протеолитических ферментов человеческого организма составляют металлосодежащие и сериновые протеазы, и, вероятно, поэтому большинство исследований ракового деградомы посвящены именно им [7–9].

Нарушение строго контролируемого равновесия системы протеолиза было показано при ряде патологий, таких как воспаления, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные и онкозаболевания. Известно, что активность протеолитических систем зависит от уровня экспрессии генов, кодирующих протеазы, от уровня их активаторов и ингибиторов, а также, по последним данным, от экспрессии микроРНК, регулирующих экспрессию генов и содержание белков. Изучение роли и участия широкого спектра протеаз на разных стадиях онкогенеза, связи между передачей сигналов в клетки и протеолизом может быть полезным источником в поиске диагностических и прогностических маркеров и новых подходов в противоопухолевой терапии.

Мембраноассоциированный протеолиз

Мембраноассоциированный, или внутримембранный, протеолиз в последнее время рассматривается как один из важных механизмов регуляции клеточных процессов. Внутримембранные или трансмембранные протеазы представляют собой интегральные мембранные белки с несколькими трансмембранными доменами. Субстраты этих протеаз, как правило, — трансмембранные белки, выполняющие широкий спектр биологически важных функций. Интегрированные в мембрану протеазы участвуют не только в деградации мембранных белков, но и в создании посредников, сигнальных молекул различных базовых клеточных процессов [10].

К внутримембранным протеазам относят мембранные и заякоренные сериновые протеиназы (Type II Transmembrane Serine Protease, TTSP; матриптаза и др.), белки семейства металлопротеаз-дизинтегринов (A Disintegrin and Metalloproteinase, ADAM), внутримембранные аспарагиновые протеазы (Signal Peptide Peptidase, SPP: SPPL2B, SPPL2BA), протеазы из семейства внутримембранных металлопротеаз (двухсайтовая протеаза, S2P; участвует в жировом обмене), матриксные металлопротеиназы (Matrix Metalloproteinases, MMP) 14, 17 и др., ромбовидные сериновые протеазы (ромбоиды), β - (BACE-1) и γ -секретазу [11, 12].

Матриптаза — сериновая протеаза мембранного типа II (МП-SP-1, TADG-15, Epithin, ST-14, TMPRSS6) — синтезируется в виде неактивного одноцепочечного зимогена, широко экспрессируется в различных эпителиальных клетках и вовлечена в ангиогенез, деградацию внеклеточного матрикса, участвует в регуляции активатора плазминогена урокиназного типа и, возможно, в активации калликреинового каскада [13]. Активация матриптазы индуцируется кислой средой клеточного микроокружения. В физиологических условиях ингибитор матриптазы является ингибитором активатора фактора роста гепатоцитов-1 (Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Type 1, HAI-1). Показано, что экспрессия матриптазы увеличена во многих типах опухолевых клеток,

включая рак молочной железы [14], простаты, яичников, почек, матки, толстой кишки, поджелудочной железы и пищевода, а также опухоли головы и шеи [15]. Кроме того, имеются данные, что избыточная экспрессия матриптазы в опухолевых клетках коррелирует с плохим прогнозом, в том числе и при плоскоклеточном раке полости рта [16]. *In vivo* показано, что нерегулируемая экспрессия матриптазы в эпидермальных кератиноцитах оказывает онкогенные эффекты через MET-AKT-mTOR-сигнальный путь, а именно через матриптазаопосредованную HGF/SF-активацию сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, который отвечает за уход от апоптоза, рост, пролиферацию клеток, активацию метаболизма. Авторы отмечают, что показанный ими в данном исследовании протеазаопосредованный путь передачи сигнала может иметь отношение к большому числу эпителиальных злокачественных опухолей [17]. С другой стороны, роль матриптазы в канцерогенезе эпителиальных опухолей может значительно варьировать в зависимости от типа ткани и клеточного микроокружения. Так, в ткани кишечника отсутствие матриптазы приводит к нарушению целостности эпителия, что в конечном итоге способствует развитию инвазивной аденокарциномы: эти данные соответствуют оригинальному названию гена матриптазы — супрессор опухоли 14 (A Tumor Suppressor 14, ST14). Точный механизм, лежащий в основе участия матриптазы в прогрессировании рака, остается неизученным. Известно, что матриптаза имеет такие субстраты, как про-HGF (фактор роста гепатоцитов), рецептор PAR-2, про-простазин и про-MSP, которые могут быть вовлечены в зависимые от микроокружения эффекты воздействия матриптазы на опухолевую прогрессию [15, 17]. Несмотря на возросший интерес к этой протеазе как к участнику канцерогенеза при различных опухолях, изучение роли матриптазы в иницировании опухоли и прогрессии ПРГШ остается на уровне клеточных культур и экспериментов на животных [17–19].

Из трансмембранных протеаз наиболее изучены белки семейства металлопротеаз-дизинтегринов ADAM, которые вовлечены в протеолиз цитокинов, факторов роста и шеддинг их рецепторов, молекул клеточной адгезии, рецептора Notch, который является ключевым в сигнальной трансдукции различных клеток [20]. Одной из ключевых функций адамализинов является протеолитический процессинг Notch-рецепторов и их лигандов. ADAM-опосредованное расщепление Notch представляет собой первый шаг регулируемого внутримембранного протеолиза (риппинга) рецептора, что ведет к активации Notch-пути. Классическая модель активации Notch включает ADAM-опосредованный протеолиз как обязательный шаг перед последующим γ -секретазаопосредованным процессингом этого рецептора. Протеолитический процессинг Notch-лигандов модулирует силу и продолжительность Notch-сигналов, приводит к генерации растворимых внутриклеточных доменов лигандов и может поддерживать двустороннюю передачу сигналов между клетками [20]. В частности, шеддинг внеклеточного домена Notch с помощью ADAM-17 и ADAM-10 способствует активации процессов ангиогенеза опухоли [21]. ADAM-10-опосредованный шеддинг E-кадгерина способствует уменьшению межклеточной адгезии и миграции эпителиальных клеток в клеточной культуре [22]. Показано, что тканевая экспрессия нескольких протеиназ семейства ADAM (ADAM-8, ADAM-9, ADAM-17, ADAM-28, ADAMTS-1, ADAMTS-8 и ADAMTS-15) значительно выше в метастазирующих опухолях ПРГШ, а высокая

экспрессия в опухолевой ткани ADAM-8 коррелирует с низкой выживаемостью. Авторы отмечают, что сывороточные уровни ADAM не всегда имели такую же прогностическую ценность [23]. Эксперименты, использующие трансфекцию ADAM-12 или таргетинг siRNA ADAM-12 в клеточных линиях рака полости рта, показали, что данная протеаза усилила миграцию и инвазивность опухолевых клеток. При этом авторами была отмечена положительная корреляция между уровнем экспрессии белков ADAM-12 и HER-2 [24].

Мультисубъединичный внутримембранный протеазный комплекс γ -секретазы состоит из четырех белков — пресенилина, никастрина, APH-1 и PEN-2. Учитывая, что субстратов для γ -секретазы определено достаточно большое количество, то изучение ее экспрессии в качестве показателя прогрессии опухолевого процесса представляется очень интересным. Известно, что γ -секретаза участвует в шеддинге различных рецепторов, в том числе VEGFR-1, ErbB-4, IGF1-R, и вовлечена в регуляцию сигнального пути Notch [25], компоненты которого рассматриваются в качестве мишеней противоопухолевой терапии. В настоящее время ингибиторы γ -секретазы находятся в преclinical стадии исследования в качестве таргетной терапии для солидного рака нескольких локализаций, включая рак носоглоточной зоны [URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=secretase>]. Протеолиз рецепторов Notch γ -секретазой, в частности компонентом комплекса пресенилином, требуется для выхода мембранного компонента NICD в клетку с последующим перемещением к ядру. NICD регулирует транскрипцию генов, участвующих в реализации программ дифференцировки, пролиферации и апоптоза (ES-1, HEY, Cyclin D1, NRARP, NF- κ B, p21, p53, pre-Ta, c-myc, IGF1-R, Survivin, Slug, Nanog) [26].

Семейство трансмембранных матриксных металлопротеиназ (MMP-MT) включает несколько членов — MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-23A, MMP-23B, MMP-24, MMP-25. В литературе для MT-MMP были описаны различные функции: и в качестве рецепторов, и активаторов для других MMP, и для локального протеолиза внеклеточного матрикса в околоклеточной области [27]. Анализ исследований экспрессии MMP у больных с раком различных локализаций показывает, что повышение экспрессии многих MMP, включая MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13, 14, в первичной опухоли и/или метастазах позитивно ассоциировано с такими характеристиками, как низкая дифференцировка опухолевых клеток, высокая инвазивность рака, высокая метастатическая активность, плохой прогноз, сокращение продолжительности жизни [28]. По данным литературы, наиболее ассоциирована с опухолевым процессом MMP-14 [29]. Одним из механизмов участия MMP-14 в опухолевой прогрессии можно считать непосредственное ее влияние на эндопротеолитическую модификацию поверхностных рецепторов клетки, в том числе CD44, тканевую трансглутаминазу, и α v β 3-интегрин, что позволяет опухолевой клетке регулировать рецепторный профиль в непрерывно изменяющейся окружающей среде экстраклеточного матрикса (ЭКМ) [30]. Координация экспрессии α v β 3-интегрина и различных MMP показана на многих клеточных линиях [31, 32], что говорит о возможном протеолитическом процессинге интегринавого рецептора для нужд опухолевой клетки и поддержания метастатического потенциала.

Неотъемлемая часть инвазии — процессы клеточной миграции, связанные с изменениями в цитоскелете [33]. Одним из ключевых клеточных процессов, ини-

цирующих начало инвазивной или метастатической программы опухолевой клетки, является эпителиально-мезенхимальный переход, результатом чего становится приобретение опухолевой клеткой фибробластоподобной морфологии, позволяющей поляризованную сборку цитоскелета в протрузии и ламеллоподии. В процессах сборки ламеллоподий участвует множество различных белков: члены семейства актиноподобных белков Arp и белки семейства WASP; G-белки (Rho, Rac и Cdc42), передающие сигнал на актиновый цитоскелет, что приводит к быстрой полимеризации актина в зонах образования инвадоподий [34]; белки семейства CAP, участвующие в ремоделировании цитоскелета, а также различные протеазы [35]. Способность раковых клеток формировать инвадоподии свидетельствует об агрессивности опухоли. Участки мембран, где происходит процесс сборки инвадоподии, богаты молекулами адгезии, белками, регулирующими сборку актина, тирозинкиназами, MMP и др. [36, 37]. Показано, что MMP-14 играет ключевую роль в инвазии путем взаимодействия и процессинга белков поверхности клеток, причем активность металлопротеиназы зависит от ее накопления на поверхности инвадоподии клеток. Накопление MMP-14 сопряжено с увеличенной экспрессией MMP-2 и MMP-9 в местах образования инвадоподий, и высокая экспрессия MMP-14, MMP-2, MMP-9 ассоциирована с инвазивным фронтом опухоли [37, 38]. При исследовании экспрессии генов в тканях больных ПРГШ показано, что у больных раком гортани и гортаноглотки уровень MMP-14 ассоциировался с содержанием ингибиторов тканевых металлопротеиназ (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, TIMP) 2 [39]. Показано, что экспрессия гена *MMP14* необходима для увеличения активности белка MMP-2 путем формирования тройного комплекса с про-MMP-2—TIMP-2—MMP-14 на поверхности клеток [40]. Известно, что MMP-2 специфически активна в отношении коллагена IV — ключевого структурного компонента базальных мембран [41].

Двухсайтовая протеаза относится к группе металлопротеаз, участвует в риппинге, например белков (SREBPs), участвующих в биосинтезе холестерина. S2P может функционировать в качестве антиоксиданта, что может быть связано с регуляцией активности НАДФН-оксидазы и экспрессии параоксаназы-2 (Paraoxonase-2, PON-2) [42], внутриклеточного антиоксидантного фермента из семейства гидролаз, повышение экспрессии которого является одним из защитных механизмов клетки от повреждающего действия свободных радикалов [43]. Однако для опухолевых клеток показано, что активность некоторых антиоксидантных ферментов снижается в фазе активной пролиферации и возрастает при переходе к фазе медленного стационарного роста *in vivo* [44]. Вероятно, эти факты могут объяснить устойчивость опухолевых клеток к свободно-радикальному повреждению [45]. О роли самой S2P в канцерогенезе известно крайне мало, работы единичны. Так, показано, что ингибирование активности этой протеазы ведет к накоплению белка SREBP-1 и фактора активации транскрипции (ATF-6), что индуцирует каспазаопосредованный апоптоз клеток липосаркомы. S2P предлагают в качестве диагностического маркера и терапевтической мишени при раке поджелудочной железы [патент «Targeting site-2 protease (s2p) for the treatment of pancreatic cancer». WO 2004078934 A2]. Таким образом, о роли этой протеазы в канцерогенезе известно крайне мало, поэтому биологическая роль, активность и функции S2P при физиологических и патологических состояниях требуют дальнейшего изучения.

Уникальным семейством считаются ромбоиды (RHBD-1, RHBD-2, митохондриальная Pcp-1) — внутримембранные сериновые протеазы, которые распределены в пределах плоскости мембраны и подвергают гидролизу субстраты, находящиеся внутри или около трансмембранных областей. Недавно показано, что ромбоиды участвуют в регуляции многих важных клеточных функций, что дает веское основание для изучения механизмов этих ферментов в развитии различных патологий [46]. Так, на эпителиальных клетках человека (клеточные линии инвазивного рака молочной железы MDA-MB-231 и рака шейки матки) было показано, что избыточная экспрессия ромбоида RHBD-2 приводит к усилению пролиферации клеток, снижению адгезии и подавлению апоптоза [47]. *In vitro* на клеточных линиях ПРГШ показано, что ромбоиды (RHBD-1) участвуют в активации рецептора эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Эти данные убедительно свидетельствуют, что RHBD-1 является важным компонентом механизма, ответственного за продукцию активированных EGFR-лигандов. Инактивация гена *RHBD-1* приводит к снижению активации EGFR, снижению способности опухолевых клеток к выживанию, пролиферации и инвазии, что может представлять новую мишень в разработке противоопухолевых терапевтических агентов [48]. Учитывая, что этот класс протеаз открыт сравнительно недавно, то уточнение каталитических механизмов, субстратной специфичности и конкретных механизмов участия в патогенезе различных заболеваний будет способствовать развитию новых знаний в медицине в целом.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о бесспорно важном и существенном вкладе мембраноассоциированного (внутримембранного) протеолиза в развитие ПРГШ, и в ближайшем будущем это направление исследований, несомненно, будет пополнено новыми данными.

Внутриклеточный протеолиз

Основными компонентами внутриклеточного протеолиза являются протеасомная, лизосомальная и кальпаиновая системы. К внутриклеточным протеолитическим системам также относят каспазы, нелизосомальные катепсины и другие протеазы. Все жестко регулируемые процессы внутриклеточного протеолиза необходимы для реализации множества базовых клеточных функций. Система внутриклеточного протеолиза вовлечена в регуляцию таких процессов, как пролиферация клеток, дифференциация, реакция на стресс и репарация ДНК.

Наиболее важную роль в деградации внутриклеточных белков играет протеасомная система, обладая трипсиноподобной, химотрипсиноподобной и каспазной активностью. Протеасомы играют важную роль в поддержании функциональной активности клеток, в частности в регуляции работы сигнальных систем, которые активируются при взаимодействии ростовых факторов с соответствующими рецепторами [49, 50]. Данные об участии протеасомной системы в механизмах метастазирования при ПРГШ в литературе малочисленны. Показано, что активность протеасом у больных злокачественными опухолями головы и шеи выше, чем в окружающей ткани. Показано, что поражение регионарных лимфоузлов у больных ПРГШ сопровождалось усилением процессов внутриклеточного протеолиза: с увеличением стадии опухоли происходило повышение

тотальной активности протеасом, снижение экспрессии LMP-2 субъединицы протеасом. Также было отмечено изменение экспрессии транскрипционного фактора NF-карпаВр50 и выявлены регрессионные зависимости экспрессии ядерного фактора NF-карпаВр65 от тотальной активности протеасом [51]. Вовлеченность внутриклеточных систем протеолиза в деградацию и процессинг белков, участвующих в контроле клеточного цикла, апоптозе и неоангиогенезе, привела к признанию протеасом в качестве терапевтической цели. Активно исследуются ингибиторы протеасом (бортезомиб, карфилзомиб, NPI-0052 и др.) в качестве монотерапии и в сочетании с другими противоопухолевыми средствами при различных опухолях — немелкоклеточном раке легкого, раке молочной железы, множественной миеломе и др. (URL: www.clinicaltrials.gov).

Механизмы участия убиквитин-протеасомной системы в канцерогенезе включают контроль ангиогенеза путем убиквитинирования компонентов VEGFR-сигнального пути и способствуют деградации PDGFR, что ингибирует опосредованный VEGF и PDGF ангиогенез, а также протеасомальное разрушение α -субъединицы транскрипционного фактора HIF-1, нарушаемое в условиях гипоксии, что приводит к накоплению HIF-1 в опухолевых клетках и активации транскрипции генов, участвующих в ангиогенезе [49]. Также известно, что протеасомы участвуют в посттрансляционной модификации полипептида p105 — предшественника NF-карпаВр50, что ведет к появлению активных форм транскрипционного фактора NF-карпаВ. Была показана связь между содержанием транскрипционного фактора NF-карпаВ и уровнем продукции фактора HIF1, что, возможно, обеспечивает косвенное участие NF-карпаВр50 в регуляции уровня ростового фактора VEGF и процесса неоангиогенеза в ткани ПРГШ [52]. Есть данные, что протеасомная деградация HEF-1 с участием PP-2A ведет к нарушению адгезивных контактов с ЭКМ *in vitro* [53]. Протеомный анализ клеточных линий ПРГШ SCC-9 идентифицировал белки, участвующие в клеточной миграции и инвазии — FAK (киназа фокальных контактов), паксиллин, кортактин и HEF-1 (Cas-L/Nedd9). Причем HEF-1 присутствовал в местах формирования инвадоподий локализованно с MMP-14. Авторы предполагают, что HEF1 может быть прогностическим фактором ПРГШ [54]. PP-2A и PPM-1B относятся к группе белков протеинфосфатаз (PPP и PPM): это многочисленная группа малоизученных ферментов, осуществляющих процесс дефосфорилирования различных субстратов, благодаря чему участвует в регуляции функциональной активности других ферментных систем. Протеинфосфатазы активно изучаются в качестве участников различных патологических процессов, в том числе и рака. Так, протеомный анализ сыворотки крови больных ПРГШ с метастазами показал увеличение содержания PPM-1B [55], что также свидетельствует об участии протеинфосфатаз в прогрессии данного заболевания.

Кальпаины представляют собой кальцийзависимые цитозольные цистеиновые протеиназы. В настоящее время известно 15 протеаз, из которых наиболее изучены и распространены кальпаин-1 и -2 и их специфический ингибитор кальпаистатин. Кальпаины — это протеазы «модуляторы», т.к. протеолиз, осуществляемый ими, является частичным, не деградирующим белок, а лишь изменяющим его структуру. Факт участия кальпаинов во многих клеточных процессах, таких как регуляция сигнальной, клеточной трансдукции и апоптоза, является

широко известным. Кальпаины участвуют в модуляции активности белков апоптоза, пролиферации и миграции клеток (p53, Bcl-2, Bcl-xl, Bid, Вах, каспазы-3, 7, 8, 9 и 12, NF- κ B). Несмотря на то, что многочисленные исследования подтверждают участие кальпаиновой системы в опухолевом росте, роль этих протеиназ в канцерогенезе во многом остается неясной. У больных ПРГШ отмечена связь увеличения активности кальпаинов с увеличением стадии заболевания и наличием метастазов в регионарные лимфоузлы [51].

Биологическая активность опухолевых клеток связана с продукцией некоторых катепсинов. Катепсины (лизосомальные протеазы) тесно связаны с инвазией и прогрессией ПРГШ. Для прогноза общей выживаемости у больных ПРГШ существенную помощь может оказать определение уровней экспрессии катепсинов D и H, стефинов A и B. В подгруппе пациентов с клинически неопределяемыми метастазами риск раннего рецидива можно оценить по внутриопухолевому содержанию MMP-2 и катепсина D, а риск развития метастазов наиболее велик при высоких уровнях стефинов A и B [41].

Каспазы (внутриклеточные цистеиновые аспартатспецифичные протеазы) участвуют в процессах апоптоза, некроза и воспаления. Для каждого типа клеток характерны уникальные каспазозависимые сигнальные пути. Регуляция сигнальных путей апоптоза и некроза с участием каспаз изучена достаточно полно [56]. Показано, что в опухолевых клетках могут нарушаться механизмы каспазоопосредованного каскада, приводящие к блокированию запуска апоптотической гибели, что способствует прогрессии злокачественного процесса, а также развитию резистентности к противоопухолевой терапии. Наиболее значимой инициаторной каспазой, приводящей к запуску рецепторопосредованного пути апоптоза, является каспаза-8. Митохондриальный путь апоптоза обычно опосредован активностью инициаторной каспазы-9. В обоих случаях ключевой эффекторной каспазой, приводящей к расщеплению клеточного субстрата, служит каспаза-3 [57]. *In vivo* показано, что определение мутаций гена, кодирующего каспазу-8, может служить маркером прогрессии ПРГШ [58].

Итак, в литературе представлен достаточно обширный пласт по изучению роли внутриклеточного протеолиза в прогрессии злокачественных новообразований. Появляются все новые данные по оценке внутриклеточных протеаз в прогрессии ПРГШ, расширяются знания о механизмах и функции вышеописанных протеаз при данной патологии. Эти новые знания, несомненно, будут полезны для создания новых, более точных диагностических инструментов и мишеней противоопухолевых препаратов.

Внеклеточный протеолиз

С онкогенезом и в частности с метастазированием исторически были связаны внеклеточные протеазы в связи с их способностью выполнять «клиринг пути» для опухолевых клеток. Известно, что метастазирующие клетки и опухолюассоциированные фибробласты для разрушения базальных мембран и межклеточного матрикса секретируют целый ряд ферментов — коллагеназы, расщепляющие коллаген ЭКМ; гепаразу, участвующую в гидролизе гепарансульфата — основного протеогликана базальной мембраны; катепсины — цистеиновые протеазы, которые в нормальных клетках локализируются перинуклеарно в лизосомах, а у метаста-

зирующих — на базальной поверхности клеток, что ассоциировано с инвазивным фронтом опухоли; плазмин, который участвует в деградации ЭКМ путем разрушения таких белков, как ламинин, фибронектин, тромбоспондин и др., а также через активацию предшественников матриксных металлопротеиназ (про-MMP); MMP, участвующих в разрушении почти всех компонентов межклеточного матрикса [41].

Сериновые протеазы (активатор плазминогена урокиназного типа, трипсин) достаточно широко исследованы на предмет взаимосвязи с опухолевой инвазией и метастазированием рака различных локализаций, в том числе при ПРГШ [59]. На основе механизмов действия ингибиторов сериновых протеаз в настоящее время изучаются препараты растительного происхождения: так, ингибитор BBI (Bowman-Birk Inhibitor) показал мощный антиканцерогенный эффект *in vivo* [60]. Однако при клиническом испытании в Ib-фазе этот ингибитор не был эффективен у больных с лейкоплакией слизистой оболочки полости рта по сравнению с плацебо [61].

К важнейшим протеазам, участвующим в опухолевой прогрессии, в том числе при ПРГШ, относят группу матриксных металлопротеиназ. Мультигенное семейство MMP, состоящее более чем из 20 секретируемых и связанных с поверхностью клетки цинкзависимых эндопептидаз, вовлечено в контроль роста злокачественных новообразований через метастазирование и ангиогенез. Важнейшими представителями семейства MMP являются различные неспецифические коллагеназы (MMP-1, MMP-8 и MMP-13) и специфические желатиназы (MMP-2 и MMP-9), матрилизин (MMP-7), стромелизины (MMP-3 и MMP-10). Активность MMP регулируется специфическими TIMP, из них три (TIMP-1, 2 и 4) секретируются в растворимой форме, а TIMP-3 связан с ЭКМ [62]. Субстратами для MMP могут быть не только компоненты ЭКМ, но и другие протеазы, а также хемотаксические молекулы, латентные формы факторов роста, растворимые и мембраноассоциированные белки, связывающие факторы роста, вследствие чего MMP регулируют различные процессы, включая ангиогенез, пролиферацию, апоптоз [9]. Количество вновь синтезируемых MMP регулируется в основном на уровне транскрипции, а протеолитическая активность существующих MMP контролируется как активацией проферментов, так и ингибированием активных ферментов эндогенными ингибиторами, α 2-макроглобулином и TIMP [63]. Работы по исследованию системы MMP-TIMP в процессах опухолевой трансформации и прогрессии достаточно многочисленны, однако интерес к этой протеолитической системе как к участнику и возможному маркеру процессов опухолевого роста продолжает оставаться на высоком уровне. У больных ПРГШ показано неравномерное распределение компонентов системы MMP между опухолевыми и стромальными клетками: экспрессия MMP-1, 2, 9 и TIMP-2 значительно выше в строме, чем в опухоли, а экспрессия TIMP-1 и EMMPRIN наблюдалась преимущественно в клетках карциномы. Авторы для прогноза общей и безрецидивной двухлетней выживаемости рекомендуют определение уровней TIMP-1 и MMP-9 в сыворотке крови больных ПРГШ и TIMP-1, 2 и MMP-9, 2 для прогноза метастазов в течение 2 лет после лечения. Определение фоновых значений в сыворотке крови TIMP-1 и 2 возможно для прогноза эффективности лучевой и химиолучевой терапии ПРГШ [8, 62]. Также отмечено, что при ПРГШ экспрессия компонентов MMP в опухоли и содержание в сыворотке зависят от возраста больных,

стадии опухолевого процесса и гистологического типа новообразования [39].

Механизмы участия ММР в процессах прогрессии опухоли исследуются достаточно активно. Известно, что один из этапов опухолевой прогрессии — это приобретение клетками опухоли свойства отделяться от исходной клеточной массы в результате дезорганизации адгезивных свойств. В эпителиальных клетках основными белками, ответственными за адгезивные свойства, являются Е-кадгерин и катенины, а за связывание клеток с коллагеном отвечают интегрины, которые участвуют также в передаче экстраклеточных сигналов до элементов цитоскелета; связывание клеток с другими компонентами ЭКМ и базальными мембранами осуществляется с помощью фибронектина и ламининов. Избыток интегринов, например, при плоскоклеточном раке полости рта, носоглотки и гортани коррелирует с высокой степенью злокачественности опухоли [64]. В последнее время получены доказательства, что участие интегринов в прогрессии опухолей тесно связано с экспрессией ММР. Так, *in vitro* было показано, что экспрессия $\alpha\beta 3$ -интегрина — универсального рецептора для витронектина, фибронектина, остеопонтина, тромбоспондина — связана с экспрессией ММР-2, причем экспрессия ММР-2 была зарегистрирована раньше экспрессии $\alpha\beta 3$ -интегрина на переднем крае мигрирующих клеток меланомы [65].

В механизмы приобретения инвазивного фенотипа эпителиальными клетками вовлечены процессы дезорганизации Е-кадгерин-катениновых комплексов и сверхэкспрессия матриксных металлопротеиназ (ММР) [66]. Нужно отметить тесную взаимосвязь между членами семейства металлопротеиназ в инициации всех этапов опухолевой прогрессии. Так, один из механизмов деградации Е-кадгерина включает каскад активации EGFR протеазой ADAM-10, который приводит к стимуляции экспрессии ММР-9, который в свою очередь деградирует Е-кадгерин. Шеддинг Е-кадгерина приводит к перемещению β -катенина к ядру и ведет к усилению клеточной пролиферации. Кроме этого, сверхэкспрессия ММР-3 вызывает каскад событий, включая расщепление Е-кадгерина, ведущих к инициации эпителиально-мезенхимального перехода [67].

Неотъемлемой частью инвазии являются процессы клеточной миграции, связанные с изменениями в цитоскелете, когда опухолевая клетка приобретает фибробластоподобную морфологию, позволяющую поляризованную сборку цитоскелета в протрузии и ламеллоподии. Большая роль в процессах сборки ламеллоподий, образования протрузий и инвадоподий отводится ММР мембранного типа, о чем писалось выше. Протеазы, участвующие в процессе созревания подосомы и инвадоподии, принадлежат к таким основным классам, как матриксные металлопротеиназы (ММР-2, ММР-9, ММР-14, ADAM), катепсины, сепсаза (поверхностно экспрессируемая сериновая протеаза) и урокиназный активатор плазминогена [29]. Как уже сообщалось выше, в процессах сборки ламеллоподий участвует множество различных белков. Так, например, показано, что экспрессия ММР-9 эпителиальными клетками дыхательных путей связана с экспрессией САР-1 [68], белка семейства аденилилизклазаассоциированных протеинов (Catabolite Gene Activator Protein, САР), относящихся к актинсвязывающим белкам, которые принимают участие в регуляции актинового цитоскелета и Ras/cAMP-сигнального пути. Предполагаемый механизм участия САР-1 в регуляции подвижности клеток — комплекси-

рование с талином (белком, прикрепляющим актин к мембране) и киназой фокальных контактов (FAK) [2, 3], активность которой сопряжена с увеличением синтеза ММР [69, 70]. У больных с ПРГШ, имеющих метастазы в регионарные лимфоузлы, при сравнительной оценке протеома сыворотки крови отмечено увеличение содержания САР-1 по сравнению с группой больных без признаков метастазирования [55], в связи с чем авторы предлагают для прогноза агрессивности заболевания изучать минорные белки, такие как САР-1, матриксный экстракцеллюлярный фосфогликопротеид (MEPE), протеинфосфатаза 1В (PPM-1В).

Известно, что до 95% ингибированных коллагеназ (ММР) в плазме крови находится в комплексе с $\alpha 2$ -макроглобулином, поэтому определить функциональный вклад плазменного ММР в процесс злокачественной прогрессии достаточно сложно [28]. Таким образом, важно изучать не только систему ММР—TIMP, но и неспецифические ингибиторы ММР. Так, при исследовании протеома сыворотки крови больных ПРГШ было обнаружено увеличение интенсивности окрашивания белковых полос, содержащих $\alpha 2$ -макроглобулин, по сравнению с группой здоровых доноров, что говорит в пользу увеличения количества этого белка [55]. Возможно, увеличение $\alpha 2$ -макроглобулина связано не только с его ингибирующим действием в отношении ММР. Если учесть, что комплекс $\alpha 2$ -макроглобулин-протеиназа связывается с рецептором $\alpha 2$ -макроглобулина (LDL-RP) и подвергается интернализации (погружение внутрь клетки) для деградации [71], а также данные о новых внутриклеточных механизмах регуляции активности ММР [72], можно предположить существование новых механизмов опухолевой прогрессии. Так, например, активная форма ММР-3 присутствует в ядерных компартментах злокачественных и нетрансформированных гепатоцитов, что представляет собой важный и неоцененный аспект функций ММР-3 [73].

Таким образом, участие внеклеточного протеолиза в развитии опухолевого процесса при ПРГШ имеет существенный объем, однако необходима детальная характеристика различных внеклеточных протеаз в ассоциации со всеми процессами опухолевой прогрессии. Обсуждение роли внеклеточных протеиназ при онкогенезе остается актуальным до настоящего времени, а понимание молекулярных механизмов сложного взаимодействия между опухолью и окружающей стромой представляет одну из основных проблем в онкологии. Выявление новых биологических функций ММР и идентификация новых субстратов, в том числе выходящая за пределы классической роли разрушения ЭКМ, имеют немаловажное значение для понимания механизмов опухолевой прогрессии и метастазирования.

Протеолитическая сеть

Накоплено достаточно данных, чтобы с уверенностью сказать о существовании связи между протеолитическими системами. Так, например, доступны сведения об однонаправленном изменении внутриклеточного и внеклеточного протеолиза, в частности протеасомной активности и активности ММР [74]. В экспериментальных работах на кардиофибробластах стимуляция ММР была связана с активацией NF- κ B, которая эффективно снижалась путем предварительной обработки клеток ингибиторами протеасом. Ингибирование протеасом в культуре клеток вело к ингибированию экспрессии ММР-2 и ММР-9.

В то же время, по некоторым данным, применение ингибиторов протеасом, напротив, повышало уровень MMP-2. Предполагается, что с помощью ингибиторов протеасом возможно избирательно регулировать синтез и биологическую активность некоторых металлопротеиназ [75]. Также экспериментально показано, что существует взаимосвязь внутриклеточного протеолиза с участием кальпаиновой системы и системы MMP: в клетках лимфомы человека линии ТНР-1 угнетение кальпаиновой системы ее специфическим ингибитором CP1B снижало экспрессию металлопротеиназ 2 и 9 [76]. Работы по связи мембраноассоциированного протеолиза с экстраклеточным процессом ферментативного разложения белка носят экспериментальный характер. Так, на клеточной линии рака желудка AZ521 было показано, что матриптаза активирует MMP-3: авторы предполагают, что активированная матриптазой MMP-3 так же, как и прямое действие матриптазы, поддерживает рост опухоли и ангиогенез, способствует деградации ЭКМ микроокружения опухолевой клетки [77]. Продemonстрировано также, что матриптаза участвует в процессинге активатора плазминогена урокиназного типа (pro-uPA), фактора роста гепатоцитов (pro-HGF/SF) [78] и рецептора PAR-2, индуцирует экспрессию генов *MMP-1*, *MMP-3* и *MMP-13* при остеоартрозе [79]. На клеточных линиях HSC-4 было показано, что MT1-MMP (MMP-14) вызывает шеддинг белка HAI-1, который активирует матриптазу, при этом клетки HSC-4 продемонстрировали характерный инвазивный рост в геле [80].

Заключение

Таким образом, конкретные механизмы взаимодействия протеолитических систем, включающих протеазы разных локализаций при прогрессировании опухолевого процесса, как в целом, так и при ПРГШ остаются малоизвестными и требуют пристального изучения. Многогранность функций и сложность взаимосвязей протеолитических систем выдвигает на первый план важность изучения участия всех компонентов деградомы в прогрессии опухоли, что поможет получить новые мишени для диагностики и терапевтического вмешательства. В этом аспекте мало изучена взаимосвязь мембраноассоциированного протеолиза с внутриклеточным и внеклеточным процессом разложения. Учитывая

экспериментальные наработки по фундаментальному значению мембраноассоциированного протеолиза в реализации многих клеточных функций и программ, при различных патологиях и канцерогенезе, будет актуальна оценка вклада мембраноассоциированных протеаз в прогрессию ПРГШ во взаимосвязи с внутриклеточным и внеклеточным протеолизом.

Знания о молекулярных механизмах онкогенеза становятся все более и более востребованными в клинической онкологии. Благодаря изучению и пониманию деталей молекулярных основ той или иной патологии будет создана своего рода платформа для клинической профилактической медицины. Существующие работы в области исследований патогенеза ПРГШ и понимание того, что протеолитические системы являются неотъемлемой частью молекулярных механизмов прогрессии данного заболевания, в конечном счете говорят об актуальности проблемы. Следует отметить, что многочисленные факты, свидетельствующие о повышенной экспрессии и активности, изменении локализации протеаз из различных классов, связанных с опухолевой прогрессией, секреции некоторых специфических протеаз в опухолевых клетках, не дают полной уверенности в использовании компонентов деградомы для точного и индивидуального прогноза заболевания. Концепция использования ингибиторов протеаз для лечения онкозаболеваний, в том числе для ПРГШ, в конечном итоге оказалась достаточно сложной, так как составляющие компоненты опухолевой прогрессии не ограничиваются лишь протеолитической активностью протеаз, и развитие опухоли — это сложный мультистадийный процесс. На сегодняшний день остаются открытыми многие вопросы: например, какова доля вклада в прогрессию ПРГШ внутриклеточных, внутри-мембранных и внеклеточных протеолитических систем; существует ли баланс между этими системами; имеет ли место нарушение этого баланса при прогрессировании ПРГШ? Решение этих вопросов может прояснить сложные многозвеньевые механизмы канцерогенеза ПРГШ и выявить возможные маркеры прогрессии и/или мишени для терапевтических воздействий этого заболевания.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Чойнзонов ЕЛ, Балацкая ЛН, Кицманюк ЗД, Мухамедов МР, Дубский СВ. Реабилитация больных опухолями головы и шеи. *Томск: Изд-во НТЛ*. 2003. 296 с.
- Какурина ГВ, Кондакова ИВ, Чойнзонов ЕЛ. Постгеномные технологии в прогнозе метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи. *Российский биотерапевтический журнал*. 2011;10(3):31–36.
- Какурина ГВ, Кондакова ИВ, Чойнзонов ЕЛ. Прогнозирование метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи. *Вопросы онкологии*. 2012;58(1):26–32.
- Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):239–252. doi: 10.1038/nrc2618
- Mason SD, Joyce JA. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol*. 2011;21(4):228–237.
- Edwards D. The Cancer Degradome: Proteases and Cancer Biology. *New York, London: Springer*. 2008. 926 p. doi: 10.1007/978-0-387-69057-5
- Ugalde AP, Ordóñez GR, Quirós PM. Puente XS, López-Otín C. Metalloproteases and the degradome. *Methods Mol Biol*. 2010;622:3–29. doi: 10.1007/978-1-60327-299-5_1
- Клишо ЕВ, Кондакова ИВ, Чойнзонов ЕЛ, Черемисина ОВ, Чижевская СЮ, Шишкин ДА. Прогностическая значимость определения металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных плоскоклеточным раком органов головы и шеи. *Онкохирургия*. 2011;3(1):17–22.
- Спирина ЛВ, Кондакова ИВ, Клишо ЕВ, Какурина ГВ, Шишкин ДА. Металлопротеиназы как регуляторы неоангиогенеза в злокачественных новообразованиях. *Сибирский онкологический журнал*. 2007;1:67–71.
- Lemberg MK, Freeman M. Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Res*. 2007;17(11):1634–1646. doi: 10.1101/gr.6425307

11. Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. Regulated Intramembrane Proteolysis: A Control Mechanism Conserved from Bacteria to Humans. *Cell*. 2000;100(4):391–398.
12. Lemberg MK. Intramembrane Proteolysis in Regulated Protein Trafficking. *Traffic*. 2011;12(9):1109–1118. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01219.x
13. Magdolen V. Novel cancer related biomarkers. In: Kallikrein related peptidases. Ed. V Magdolen, CP. Sommerhoff, F Hans, S Manfred. Berlin: Walter de Gruyter. 2012. P. 226.
14. Welman A, Sproul D, Mullen P, Muir M, Kinnaird AR, Harrison DJ, Faratian D, Brunton VG, Frame MC. Diversity of Matriptase Expression Level and Function in Breast Cancer. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e34182. doi: 10.1371/journal.pone.0034182
15. Kawaguchi M, Kataoka H. Mechanisms of Hepatocyte Growth Factor Activation in Cancer Tissues. *Cancers*. 2014;6(4):1890–1904. doi: 10.3390/cancers6041890
16. Cheng MF, Huang MS, Lin CS, Lin LH, Lee HS, Jiang JC, Hsia KT. Expression of matriptase correlates with tumour progression and clinical prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2014;65(1):24–34.
17. Szabo R, Rasmussen AL, Moyer AB, Kosa P, Schafer JM, Molinolo AA, Gutkind JS, Bugge TH. c-Met-induced epithelial carcinogenesis is initiated by the serine protease matriptase. *Oncogene*. 2011;30(17):2003–2016. doi: 10.1038/ncr.2010.586
18. Lyons JG, Patel V, Roue NC, Fok SY, Soon LL, Halliday GM, Gutkind JS. Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. *Cancer Res*. 2008;68(12):4525–4530. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-6735
19. Sales KU, Friis S, Konkel JE, Godiksen S, Hatakeyama M, Hansen KK, Rogatto SR, Szabo R, Vogel LK, Chen W, Gutkind JS, Bugge TH. Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase driven pre-malignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis. *Oncogene*. 2015;34(3):346–356. doi: 10.1038/ncr.2013.563
20. Алейник АН, Кондакова ИВ. Сигнальная система notch и онкогенез. *Вопросы онкологии*. 2012;58(5):593–596.
21. Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development*. 2007;134(15):2709–2718. doi: 10.1242/dev.004184
22. Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and β -catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(26):9182–9187. doi: 10.1073/pnas.0500918102
23. Zielinski V, Brunner M, Heiduschka G, Schneider S, Seemann R, Erovic B, Thurnher D. ADAM8 in squamous cell carcinoma of the head and neck: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2012;12:76. doi: 10.1186/1471-2407-12-76
24. Rao VH, Kandel A, Lynch D, Pena Z, Marwaha N, Deng C, Watson P, Hansen LA. A positive feedback loop between HER2 and ADAM12 in human head and neck cancer cells increases migration and invasion. *Oncogene*. 2012;31(23):2888–2889. doi: 10.1038/ncr.2011.460
25. Boulton ME, Cai J, Grant MB. Gamma-Secretase: a multifaceted regulator of angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2008;12(3):781–795. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00274.x
26. Egloff AM, Grandis JR. Molecular Pathways: Context dependent approaches to Notch targeting as cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2012;18(19):5188–5195. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2258
27. Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Ao Z, Arleth AJ, Ohlstein EH. Upregulated expression of human membrane type-5 matrix metalloproteinase in kidneys from diabetic patients. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281(2):F309–317.
28. Рогова ЛН, Шестернина НВ, Замечник ТВ, Фастова ИА. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах. *Вестник новых медицинских технологий*. 2011;XVIII(2):86.
29. Murphy DA and Courtneidge SA. The ‘ins’ and ‘outs’ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(7):413–426. doi: 10.1038/nrm3141
30. Ratnikov BI, Rozanov DV, Postnova TI, Baci PG, Zhang H, DiScipio RG, Chestukhina GG, Smith JW, Deryugina EI, Strongin AY. An Alternative Processing of Integrin α v subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:7377–7385. doi: 10.1074/jbc.M109580200
31. Albrechtsen R, Kveiborg M. ADAM12 redistributes and activates MMP-14, resulting in gelatin degradation, reduced apoptosis and increased tumor growth. *J Cell Sci*. 2013;126(P20):4707–4720. doi: 10.1242/jcs.129510
32. Берман АЕ, Козлова НИ, Морозевич ГЕ. Интегрины как потенциальная мишень для целевой терапии рака. *Биомедицинская химия*. 2013;59(3):239–248.
33. Спирина ЛВ, Кондакова ИВ. Миграция клеток и онкогенез. *Российский онкологический журнал*. 2010;3:49–53.
34. Machesky LM. Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. *FEBS*. 2008;582(14):2102–2111. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.039
35. Yu X, Zech T, McDonald L, Gonzalez EG, Li A, Macpherson I, Schwarz JP, Spence H, Futó K, Timpson P, Nixon C, Ma Y, Anton IM, Visegrády B, Insall RH, Oien K, Blyth K, Norman JC, Machesky LM. N-WASP coordinates the delivery and F-actin-mediated capture of MT1-MMP at invasive pseudopods. *JCB*. 2012;199(3):527–544. doi: 10.1083/jcb.201203025
36. Miyazawa Y, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi H, Sakai R. CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia mediated invasion of cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2013;11(6):628–637. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0544
37. Poincloux R, Lizarraga F, Chavrier P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt.17):3015–3024. doi: 10.1242/jcs.034561
38. Akanuma N, Hoshino I, Akutsu Y, Murakami K, Isozaki Y, Maruyama T, Yusup G, Qin W, Toyozumi T, Takahashi M, Suito H, Hu X, Sekino N, Matsubara H. MicroRNA-133a regulates the mRNAs of two invadopodia related proteins, FSCN1 and MMP14, in esophageal cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(1):189–198. doi: 10.1038/bjc.2013.676
39. Малахова ЕВ, Кондакова ИВ, Черемисина ОВ, Какурина ГВ, Меньшиков КЮ. Экспрессия генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в тканях опухолей у больных раком гортани и гортаногалотки. *Сибирский онкологический журнал*. 2012;1:36–40.
40. Katayama A, Bandoh N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S. Expressions of matrix metalloproteinases in early stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004;10:634–640. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-0864-02
41. Клишова ЕВ, Кондакова ИВ, Чойнзонов ЕЛ, Васильева ОС. Прогностическая значимость протеаз у больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2005;25(2):82–91.
42. Gu Y, Lee W, Shena J. Site-2 protease responds to oxidative stress and regulates oxidative injury in mammalian cells. *Sci Rep*. 2014;4:6268. doi: 10.1038/srep06268
43. Rosenblatt M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase-2 activity is increased

- whereas cellular paraoxonase-3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:468–474. doi: 10.1161/01.ATV.0000059385.95664.4D
44. Кондакова ИВ, Какурина ГВ, Смирнова ЛП, Борунов ЕВ. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами. *Сибирский онкологический журнал.* 2005;1:58–61.
45. Кондакова ИВ, Загребельная ГВ. Влияние комбинации пероксидных радикалов с оксидом азота на синтез ДНК в опухолевых клетках. *Биомедицинская химия.* 2004;50(6):576–582.
46. Freeman M. Rhomboid proteases and their biological functions. *Annu Rev Genet.* 2008;42:191–210. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091628
47. Cheng TL, Lai CH, Jiang SJ, Hung JH, Liu SK, Chang BI, Shi GY, Wu HL. RHBDL2 Is a Critical Membrane Protease for Anoikis Resistance in Human Malignant Epithelial Cells. *Scientific World Journal.* 2014;2014:ID 902987.
48. Zou H, Thomas SM, Yan ZW, Grandis JR, Vogt A, Li LY. Human rhomboid family-1 gene RHBDF1 participates in GPCR-mediated transactivation of EGFR growth signals in head and neck squamous cancer cells. *FASEB J.* 2009;23(2):425–432. doi: 10.1096/fj.08-112771
49. Spirina LV, Yunusova NV, Kondakova IV, Kolomiets LA, Koval VD, Chernyshova AL, Shpileva OV. Association of growth factors, HIF-1 and NF- κ B expression with proteasomes in endometrial cancer. *Molecular Biology Reports.* 2012;39:8655–8662. doi: 10.1007/s11033-012-1720-y
50. Спирина ЛВ, Кондакова ИВ. Роль внутриклеточного специфического протеолиза в онкогенезе. *Вопросы онкологии.* 2008;54(6):690–694.
51. Спирина ЛВ, Кондакова ИВ, Чойнзонов ЕЛ, Шарова НП, Чижевская СЮ, Шишкин ДА. Активность и субъединичный состав протеасом в плоскоклеточных карциномах головы и шеи. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2010;149(1):89–92.
52. Spirina LV, Kondakova IV, Choyzonov EL, Chigevskaya SY, Shishkin DA, Kulbakin DY. Expression of vascular endothelial growth factor and transcription factors HIF-1, NF-KB expression in squamous cell carcinoma of head and neck; association with proteasome and calpain activities. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139:625–633. doi: 10.1007/s00432-012-1366-0
53. Zheng M, McKeown-Longo PJ. Cell adhesion regulates Ser/Thr phosphorylation and proteasomal degradation of HEF1. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt.1):96–103. doi: 10.1242/jcs.02712
54. Lucas JT Jr., Salimath BP, Slomiany MG, Rosenzweig SA. Regulation of invasive behavior by vascular endothelial growth factor is HEF1-dependent. *Oncogene.* 2010;29(31):4449–4459. doi: 10.1038/onc.2010.185
55. Какурина ГВ, Кондакова ИВ, Чойнзонов ЕЛ, Шишкин ДА, Черемисина ОВ. Особенности протеома сыворотки крови больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. *Сибирский онкологический журнал.* 2013;2(56):62–66.
56. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J Biol Chem.* 2009;284:21777–21781. doi: 10.1074/jbc.R800084200
57. Miura M. Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(10). doi: 10.1101/cshperspect.a008664
58. Li C, Egloff AM, Sen M, Grandis JR, Johnson DE. Caspase-8 mutations in head and neck cancer confer resistance to death receptor-mediated apoptosis and enhance migration, invasion, and tumor growth. *Mol Oncol.* 2014;8(7):1220–1230. doi: 10.1016/j.molonc.2014.03.018
59. Harrison LB. Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. Ed. Louis BH, Roy BS, Waun KH. 2013. NY: Lippincott Williams & Wilkins. 2004. 1077 p.
60. Palavalli MH, Natarajan SS, Wang TT, Krishnan HB. Imbibition of Soybean Seeds in Warm Water Results in the Release of Copious Amounts of Bowman Birk Protease Inhibitor, a Putative Anticarcinogenic Agent. *J Agric Food Chem.* 2012;60(12):3135–3143. doi: 10.1021/jf205308w
61. Armstrong WB, Taylor TH, Kennedy AR, Melrose RJ, Messadi DV, Gu M, Le AD, Perloff M, Civantos F, Goodwin WJ, Wirth LJ, Kerr AR, Meyskens FL Jr. Bowman birk inhibitor concentrate and oral leukoplakia: a randomized phase IIb trial. *Cancer Prev Res (Phila).* 2013;6(5):410–418. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0004
62. Кондакова ИВ, Клишо ЕВ, Савенкова ОВ, Шишкин ДА, Чойнзонов ЕЛ. Патогенетическая значимость системы матричных металлопротеиназ при плоскоклеточном раке головы и шеи. *Сибирский онкологический журнал.* 2011;1:29–33.
63. Gilles C, Polette M, Coraux C. Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 γ 2 chain degradation to mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci.* 2001;114:2967–2976.
64. Мнихович МВ, Циперович К, Яхонсон М, Гитерман Ц, Гаврилюк АА, Фомина ЛВ, Гуминский ЮИ, Вернигородский СВ, Тернов ММ, Мигляс ВГ. Межклеточные взаимодействия при инвазии клеток: морфологические и молекулярно-биологические особенности. *Вісник морфології.* 2013;19(1):198–208.
65. Jiao Y, Feng X, Zhan Y, Wang R, Zheng S, Liu W, Zeng X. Matrix metalloproteinase-2 Promotes α v β 3 Integrin Mediated Adhesion and Migration of Human Melanoma Cells by Cleaving Fibronectin. *PLoS One.* 2012;7(7):e41591. doi: 10.1371/journal.pone.0041591
66. Nawrocki-Raby B, Gilles Ch, Polette M, Martinella-Catusse C, Bonnet N, Puchelle E, Foidart JM, Van Roy F, Birembaut P. E-Cadherin Mediates MMP Down-Regulation in Highly Invasive Bronchial Tumor Cells. *Am J Pathol.* 2003;163(2):653–661. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63692-9
67. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell.* 2010;141(1):52–67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015
68. Xie SS, Hu F, Tan M, Duan YX, Song XL, Wang CH. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-9 and adenylyl cyclase-associated protein 1 in chronic obstructive pulmonary disease. *J Int Med Res.* 2014;42(6):1272–1284. doi: 10.1177/0300060514548290
69. Hu Y, Xu S, Jin W, Yi Q, Wei W. Effect of the PTEN gene on adhesion, invasion and metastasis of osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2014;32(4):1741–1747. doi: 10.3892/or.2014.3362
70. Какурина ГВ, Кондакова ИВ, Черемисина ОВ, Шишкин ДА, Чойнзонов ЕЛ. Аденилил-циклаза-ассоциированный протеин-1 в развитии плоскоклеточных карцином головы и шеи. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015;160(11):648–651.
71. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt.19):3719–3727. doi: 10.1242/jcs.00063
72. Sawicki G. Intracellular regulation of matrix metalloproteinase-2 activity: new strategies in treatment and protection of heart subjected to oxidative stress. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:130451. doi: 10.1155/2013/130451. doi: 10.1155/2013/130451
73. Hockenbery DM. MMPs in Unusual Places. *Am J Pathol.* 2006;169:1101–1103. doi: 10.2353/ajpath.2006.060553
74. Кондакова ИВ, Какурина ГВ, Спирина ЛВ, Черемисина ОВ, Шишкин ДА. Оценка внеклеточного и внутриклеточного протеолиза при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани. *Сибирский онкологический журнал.* 2014;3:45–50.

75. Awasthi N, Wang-Su ST, Wagner BJ. Downregulation of MMP-2 and 9 by proteasome inhibition: a possible mechanism to decrease LEC migration and prevent posterior capsular opacification. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 2008;49(5):1998–2003. doi: 10.1167/iovs.07-0624
76. Popp O, Heidinger M, Ruiz-Heinrich L. The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 and invasion by leukemic THP-1 cells. *Biol Chem.* 2003;384:951–958. doi: 10.1515/BC.2003.107
77. Jin X, Yagi M, Akiyama N, Hirosaki T, Higashi S, Lin CY, Dickson RB, Kitamura H, Miyazaki K. Matrilysin activates stromelysin (MMP-3) and promotes tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci.* 2006;97(12):1327–1334. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00328.x
78. Uhlund K. Matrilysin and its putative role in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(24):2968–2978. doi: 10.1007/s00018-006-6298-x
79. Milner JM, Patel A, Davidson RK, Swingle TE, Desilets A, Young DA, Kelso EB, Donell ST, Cawston TE, Clark IM, Ferrell WR, Plevin R, Lockhart JC, Leduc R, Rowan AD. Matrilysin is a novel initiator of cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(7):1955–1966. doi: 10.1002/art.27476
80. Domoto T, Takino T, Guo L, Sato H. Cleavage of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 by membrane-type MMP-1 activates matrilysin. *Cancer Sci.* 2012;103(3):448–455. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02162.x

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Какурина Гелена Валерьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник
Томского научно-исследовательского института онкологии

Адрес: 634050, Томск, пер. Кооперативный, д. 5, **тел.:** +7 (3822) 51-40-97, **e-mail:** kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Кондакова Ирина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии
опухолей Томского научно-исследовательского института онкологии

Адрес: 634050, Томск, пер. Кооперативный, д. 5, **тел.:** +7 (3822) 51-25-29, **e-mail:** kondakova@oncology.tomsk.ru

Чойнзонов Евгений Лхамцэренович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
директор Томского научно-исследовательского института онкологии

Адрес: 634050, Томск, пер. Кооперативный, д. 5, **тел.:** +7 (3822) 51-10-39, **e-mail:** info@oncology.tomsk.ru

DOI: 10.15690/vramn566

Ю.А. Успенская, Ю.К. Комлева, Е.А. Пожиленкова, В.В. Салмин, О.Л. Лопатина,
А.А. Фурсов, П.В. Лаврентьев, О.А. Белова, А.Б. Салмина

Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого,
Красноярск, Российская Федерация

Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления

В обзоре литературы обсуждается разнообразие эндогенных лигандов RAGE-рецепторов, играющих важную роль в сигнальной трансдукции в физиологических условиях и при патологии. RAGE-рецепторы опосредуют многие физиологические функции, такие как рост клеток, апоптоз, выживание и регенерация; участвуют в воспалительных реакциях, индуцируя секрецию цитокинов и хемокинов; способствуют элиминации апоптотических клеток, являются участниками врожденного иммунного ответа. Рассмотрены механизмы образования растворимых форм RAGE, а также роль мембранной и растворимой форм рецепторов в передаче сигнальной информации при активации клеток. Признанными лигандами RAGE являются продукты неферментативного гликирования белков, бета-амилоид, ядерные белки HMGB1, кальцийсвязывающие белки S100A4, S100A8/A9, S100A12 и S100B. В статье обсуждаются механизмы продукции лигандов RAGE, секреции их из клеток различной природы, их взаимодействие с рецепторами и последствия этого взаимодействия для клеток и тканей. Особое внимание уделено анализу роли лигандов RAGE в развитии воспаления, в частности при повреждении головного мозга и нейродегенерации.

Ключевые слова: RAGE, лиганды, нейровоспаление, сигнальная трансдукция.

(Для цитирования: Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Пожиленкова Е.А., Салмин В.В., Лопатина О.Л., Фурсов А.А., Лаврентьев П.В., Белова О.А., Салмина А.Б. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 694–703. Doi: 10.15690/vramn566)

RAGE-белки: общие представления о регуляторной активности

Рецептор конечных продуктов гликирования белков (Receptor For Advanced Glycation End Products, RAGE) является трансмембранным гликопротеином типа I, принадлежащим суперсемейству иммуноглобулинов (Ig) [1]. RAGE состоит из трех основных доменов — внеклеточного лигандсвязывающего, одинарной трансмембранной спирали и С-терминального короткого домена, который не обладает ферментативной активностью [2]. Тем не менее С-концевой цитоплазматический домен имеет важное значение для передачи сигналов [3]. Эктодомен RAGE состоит из трех молекул Ig с V-, C1- и C2-доменами, которые отвечают за взаимодействие со специфичными лигандами [4].

RAGE опосредует многие физиологические функции, такие как рост нейронов, выживание и регенерация, играет важную роль в воспалительных реакциях, индуцируя продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, способствует элиминации апоптотических клеток, является главным медиатором врожденного иммунного ответа [1, 5]. RAGE может участвовать и в ряде патологических процессов, включая сахарный диабет, болезнь Альцгеймера, системный амилоидоз и опухолевый рост [6]. Например, повышенные концентрации конечных продуктов гликирования (Advanced Glycation End Products, AGEs), наблюдаемые при диабете, приводят к увеличению экспрессии рецептора в клетках стенки кровеносных сосудов, включая эндотелиальные и сосудистые гладкомышечные клетки, а также к активации циркулирующих иммунных клеток [7]. Активация RAGE тесно связана

Yu.A. Uspenskaya, Yu.K. Komleva, E.A. Pozhilenkova, V.V. Salmin, O.L. Lopatina,
A.A. Fursov, P.V. Lavrentiev, O.A. Belova, A.B. Salmina

Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Ligands of RAGE-Proteins: Role in Intercellular Communication and Pathogenesis of Inflammation

The review contains data on the diversity of endogenous ligands of RAGE receptors (receptor for advanced glycation end products) that play an important role in the signal transduction in (patho) physiological conditions. RAGE takes part in various physiological processes like cell growth and survival, apoptosis and regeneration. They serve as regulators of inflammatory reactions due to their ability to induce secretion of cytokines and chemokines. In addition, they facilitate elimination of apoptotic cells and mediate innate immune response. We discuss mechanisms of soluble RAGE production as well as the role of membrane and soluble forms of the receptor in cell signaling. Several endogenous ligands of RAGE are well-known: advanced glycation end products (AGE), amyloid-beta (Aβ), nuclear high mobility group box 1 proteins (HMGB1), and calcium-binding proteins S100A4, S100A8/A9, S100A12 and S100B. The review is focused on the mechanisms of the ligands production, their secretion from the cells of various origin, interaction with RAGE, and associated intracellular signal transduction pathways. Special attention is paid to the role of RAGE in pathogenesis of inflammation, particularly, in brain injury and neurodegeneration.

Key words: RAGE, ligands, neuroinflammation, signal transduction.

(For citation: Uspenskaya Yu.A., Komleva Yu.K., Pozhilenkova E.A., Salmin V.V., Lopatina O.L., Fursov A.A., Lavrentiev P.V., Belova O.A., Salmina A.B. Ligands of RAGE-Proteins: Role in Intercellular Communication and Pathogenesis of Inflammation. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 694–703. Doi: 10.15690/vramn566)

с поддержкой воспалительной реакции, приводящей к хронизации процесса, как это наблюдается при сахарном диабете. Дисрегуляция экспрессии RAGE отмечалась при воспалительных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, воспалительные заболевания почек, атеросклероз или нейродегенерация [8, 9].

Особенности экспрессии мембранных и растворимых форм RAGE-белков в биологических тканях

Функция RAGE в контексте различных расстройств весьма разнообразна и вызывает непохожие клеточные ответы. Именно поэтому выяснение конкретной функции RAGE и его сигнальных путей в различных типах клеток представляет большой интерес.

В физиологических условиях низкий уровень экспрессии RAGE регистрируется во всех тканях, за исключением легких, в которых, напротив, он чрезвычайно высок [1]. RAGE экспрессируется в клетках эндотелия, гладкомышечных клетках, мононуклеарных фагоцитах, Т и В лимфоцитах, фибробластах, перидитах, нейронах, кардиомиоцитах, гепатоцитах [1, 10, 11], на более высоком уровне — в процессе развития тканей, особенно в центральной нервной системе. В патологических условиях, например при сахарном диабете, хроническом воспалении или нейродегенеративных заболеваниях, экспрессия RAGE значительно возрастает в сосудистых сетях, гемопоэтических компартментах или в ЦНС [12].

Экспрессия RAGE на мембранах клеток является объектом регуляции со стороны многочисленных факторов. Так, получены экспериментальные данные об увеличении экспрессии RAGE и эндогенного секреторного RAGE (esRAGE), а также о стимуляции отщепления sRAGE (растворимого фрагмента RAGE) от мембраносвязанного рецептора макрофагов под действием инсулина *in vitro* [13]. Кроме того, по последним данным, на экспрессию RAGE влияют некоторые микроРНК (miRNAs), регулирующие сигнальные пути с участием AGE/RAGE в условиях диабетических микро- и макрососудистых осложнений [14], а также природный фитохалесин ресвератрол, выделяемый некоторыми растениями и обладающий антидиабетическим (гипогликемическим) действием. Выявлено, что он участвует в снижении экспрессии RAGE и подавляет окислительный стресс [15].

Недавними исследованиями показано, что, как и многие другие рецепторы на мембранах клеток, RAGE обладают свойством кластеризации в составе липидных рафтов. Так, регистрация RAGE с помощью вестерн-блоттинга показала сложную олигомеризацию RAGE в клетках меланомы MelJuSo: были обнаружены олигомеры с молекулярной массой около 200 кДа, в то время как молекулярная масса мономерного RAGE составляет 55–60 кДа [16]. Методом электрофореза установлено, что олигомеры массой 200 кДа образуются с помощью дисульфидных связей, при этом другие взаимодействия также важны для мультимеризации RAGE в клетках меланомы. Ингибиторами AGE-индуцированного транспорта RAGE в липидные рафты являются докозагексаеновая кислота (Docosahexaenoic Acid, DHA), предотвращающая диабетическую ретинопатию [17], а также низкомолекулярные фракции сои — антагонисты RAGE-сигнальных путей [18].

Время жизни RAGE на клеточной поверхности контролируется протеолитическим расщеплением. Металлопротеиназы ADAM10 и MMP9 расщепляют RAGE

с образованием растворимого фрагмента, получившего название sRAGE [19]. Сывороточный sRAGE может действовать как внеклеточный рецептор-ловушка (Decoy Receptor) для связывания различных лигандов. В противоположность самому RAGE, sRAGE ингибирует миграцию лейкоцитов, инактивирует продукты гликозилирования, тормозит развитие окислительного стресса и воспаления [20]. Было показано, что связывание одного из лигандов — HMGB1 (High Mobility Group Box 1) — с RAGE и последующая активация клеток приводят к снижению концентрации RAGE на поверхности клеток и в то же время к увеличению уровня sRAGE, который является мощным ингибитором RAGE-сигнальных путей, конкурируя за лиганды и препятствуя чрезмерной активации системы RAGE [21]. Установлено, что протеолитическое расщепление RAGE регулируется и другими факторами, например повышенной концентрацией внутриклеточного Ca^{2+} [22]. Растворимые sRAGE могут являться и результатом альтернативного сплайсинга — esRAGE (эндогенная секреторная форма). esRAGE связывает RAGE-лиганды и подавляет активацию RAGE-сигнальных путей в клетках различной природы.

Образование растворимых форм RAGE при патологических состояниях

Наиболее часто sRAGE и esRAGE рассматриваются в качестве маркеров воспаления. Кроме того, sRAGE позиционируется как биомаркер при остром респираторном дистресс-синдроме [23], при болезни Крона и неспецифическом язвенном колите [24]. Выявлена связь между уровнем плазменного sRAGE в предоперационный период и восстановлением пациентов после операции на сердце [25]. Недавно установлено, что уровень esRAGE в сыворотке крови человека может служить новым маркером для диагностики заболеваний, связанных с нарушением экспрессии RAGE [26]. Показано, что уровень плазменного esRAGE может маркировать тяжесть патологического состояния при хронической обструктивной болезни легких [27], диабете 1-го типа [28], болезни Альцгеймера [29, 30]. Обратная зависимость между уровнем esRAGE и ранними изменениями в почках свидетельствует о потенциальной роли esRAGE в развитии диабетической нефропатии [28]. Пониженная экспрессия esRAGE во многих участках головного мозга у пациентов с болезнью Альцгеймера свидетельствует о тесной связи между esRAGE и нейродегенерацией [29]. Участие esRAGE в патогенезе болезни Альцгеймера проявляется либо через взаимодействие мембраносвязанного RAGE (mRAGE) с β -амилоидным пептидом (A β), либо через ингибирование mRAGE-активированного сигнального пути. В недавних исследованиях показано, что в альтернативный сплайсинг mRAGE и esRAGE вовлечены гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1) и трансформер 2 β -1 (Tra2 β -1). Предполагается, что нарушение метаболизма глюкозы в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера может увеличивать экспрессию белка сплайсинга hnRNP A1 и понижать экспрессию Tra2 β -1, что приводит к несбалансированной экспрессии mRAGE и esRAGE [30].

Существуют наблюдения, в которых показана взаимосвязь между уровнями экспрессии RAGE на клетках и циркулирующих растворимых форм трансмембранного гликопротеина. Например, у больных сахарным диабетом отмечается увеличение экспрессии RAGE, тогда как уровень сывороточных sRAGE и esRAGE понижается, что

свидетельствует об отсутствии связи между повышенным уровнем экспрессии RAGE и увеличением уровня sRAGE [31]. Кроме того, изменения уровней sRAGE и esRAGE отмечаются у людей, предрасположенных к диабету [32]. Имеются данные о значительном увеличении экспрессии RAGE и его лигандов в сердце крыс при ишемии. Предварительное введение крысам sRAGE — рецептора-ловушки для связывания с RAGE — уменьшает ишемические повреждения и усиливает функциональное восстановление миокарда. Уровень сывороточных sRAGE и esRAGE связан также с такими RAGE-ассоциированными заболеваниями, как атеросклероз [33], хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия и идиопатическая легочная артериальная гипертензия [34].

Лиганды RAGE-белков: основные виды, особенности лигандрецепторных взаимодействий

RAGE имеет большое количество лигандов [35], поэтому не удивительно, что RAGE-опосредованные сигнальные пути отличаются сложностью и не имеют общей схемы клеточного ответа при активации RAGE. На RAGE-сопряженные сигнальные каскады влияет множество различных факторов: клеточный ответ, индуцированный взаимодействием с лигандом, зависит не только от природы последнего, но также от типа клеток, концентрации частиц, присутствия других лигандов, поверхностной концентрации RAGE, наличия акцепторных молекул, опосредующих сигнал, и от активированных в клетке сигнальных путей.

Общепризнанными лигандами RAGE являются AGEs, β -амилоид (Amyloid Beta, A β), ядерные негистоновые белки HMGB1, кальцийсвязывающие белки S100A4, S100A8/A9, S100A12 и S100B. К компонентам внутриклеточных сигнальных каскадов, активируемых при взаимодействии RAGE с каким-либо из перечисленных лигандов, относятся киназы AKT (Protein Kinase B; протеинкиназа B), GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β ; киназа гликогенсинтазы 3 β), mDial1 (Mammalian Diaphanous 1 Protein; белок Diaphanous млекопитающих), p-c-Src (Phosphorylated Cellular Sarcoma Tyrosine Kinase; фосфорилированная форма Src-киназы), PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase; фосфатидилинозитид-3-киназа), PKC (Protein Kinase C; протеинкиназа C), Rac (Rac GTPase; Rac ГТФаза), Ras (Rat Sarcoma GTPase; Ras ГТФаза), АФК (активные формы кислорода), ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase; киназа, регулируемая внеклеточными сигналами), JNK (c-Jun N-terminal Kinase; c-Jun киназа), MEK (Mitogen-Activated Protein Kinase; митогенактивируемая протеинкиназа), p38 (p38 MAP Kinase; p38 MAP-киназа), Egr-1 (Early Growth Response Protein 1; белок раннего ростового ответа 1), NF-kB (Nuclear Factor kB Transcription Factor; ядерный фактор «каппа-би»), STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3; транскрипционный фактор STAT3), ROCK (Rho-ассоциированная протеинкиназа) [1].

Предварительная сборка является ключевым процессом в активации RAGE его лигандами. Результаты различных исследований показали, что связывание с такими лигандами, как S100 белки, A β -олигомеры или AGE, стабилизирует рецепторные молекулы. Образование комплекса между лигандом и рецептором, вероятно, приводит к конформационным изменениям цитоплазматического домена, что инициирует сигнальный каскад. Установлено, что сборка RAGE-рецептора происходит

в отсутствие лигандов. Действительно, RAGE образует мультимеры в цитоплазматической мембране [36]. Анализ RAGE показал, что такие мультимеры содержат по меньшей мере четыре молекулы RAGE и могут формировать более крупные скопления в плазматической мембране [36].

Связывание лигандов с RAGE активирует несколько сигнальных путей, и в зависимости от лиганда, микроокружения и типа клеток клеточный ответ может быть разным. Во многих типах лейкоцитов передача сигналов через RAGE активирует провоспалительный фактор транскрипции NF-kB. Интересно, что NF-kB вызывает устойчивую экспрессию RAGE, поддерживая, таким образом, обратную связь в RAGE-сигнальном пути, что в свою очередь усиливает исходный сигнал и активирует клетки. Этот транскрипционный фактор стимулирует выработку провоспалительных молекул и развитие воспалительной реакции. Повреждение тканей и активация клеток при воспалительной реакции опосредует высвобождение дополнительных лигандов RAGE (например, HMGB1), которые приводят к RAGE-опосредованному синтезу *de novo* NF-kB p65 мРНК и белка, обеспечивающих высокий уровень активности NF-kB [1]. Такие высокие уровни NF-kB наблюдались, например, на мышинной модели воспаления кишечника, при которой AGEs вызывали RAGE-опосредованные патологические реакции.

Интернализация RAGE после запуска каскада реакций сигнальной трансдукции является важным механизмом регуляции уровня экспрессии и чувствительности клеток к действию лигандов RAGE. Действительно, в то время как в клетках N2a, экспрессирующих на плазматической мембране RAGE, отмечалось усиление фосфорилирования ERK1/2 и связывание NF-kB ДНК под действием AGEs, предварительная инкубация клеток с дансилкадаверином или оксидом фениларсина, являющихся ингибиторами интернализации рецепторов, подавляла активацию ERKs и другие внутриклеточные реакции, опосредованные AGEs [37]. Эти результаты позволяют предполагать, что интернализация играет ключевую роль в передаче сигналов, опосредованных RAGE.

Источники и биологические эффекты основных лигандов RAGE в норме и при патологии

AGEs. Первыми идентифицированными лигандами RAGE были AGEs, которые образуются вследствие неспецифической, неферментативной реакции белков, пептидов или липидов с сахарами. Эти первичные продукты в дальнейшем окисляются и подвергаются поперечной сшивке с образованием различных молекул. AGEs накапливаются у пожилых лиц, больных сахарным диабетом, в очагах хронического воспаления, при тяжелых метаболических нарушениях.

Известно, что развитию хронического воспаления при диабете способствуют процессы клеточной гибели, провоцирующие высвобождение во внеклеточное пространство молекул, способствующих формированию инфламماسом в эффекторных клетках, продукции провоспалительных цитокинов, развитию инсулинорезистентности. Таким образом, накопление AGEs в очагах такого хронического воспаления способствует развитию окислительного стресса, активации лейкоцитов. В этом контексте не удивительно, что накопление AGEs напрямую связано с эндотелиальной дисфункцией при сахарном диабете, что лежит в основе развития микро- и макроангиопатий [38]. С возрастом в организме (прежде всего, в крови и стен-

ках сосудов) также происходит постепенное увеличение содержания AGEs, что позволяет рассматривать данные молекулы в качестве потенциальных биомаркеров старения [39]. Накопление AGEs в стенке кровеносного сосуда и миокарде вызывает образование поперечных сшивок между молекулами коллагена, что приводит к потере коллагеном эластичности и, как следствие, уменьшению упругости сосудов и сердца у больных диабетом и пожилых людей [40]. Поскольку AGEs являются триггерами воспаления (активируют клетки, стимулируя образование провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода [41]), они актуальны в патогенезе многих заболеваний, таких как сахарный диабет, болезнь Альцгеймера, катаракта, рак [41, 42], при которых развитие хронического воспалительного процесса и окислительного стресса является важным механизмом их прогрессии.

Накопление AGEs стимулирует экспрессию RAGE и приводит к увеличению циркулирующих в крови растворимой изоформы рецептора, не содержащей трансмембранный домен, и внеклеточного домена RAGE. Увеличение содержания этих молекул в крови связано с активацией воспалительных и деструктивных процессов в сосудах и миокарде, что способствует развитию сердечно-сосудистой патологии и ускоряет старение [43].

S100. Другая большая группа лигандов RAGE представлена семейством S100, которое принадлежит к классу DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern Molecules) — молекулярных структур, ассоциированных с повреждением [44]. DAMPs высвобождаются из поврежденных тканей или секретируются клетками в межклеточное пространство, где они выступают в роли модуляторов иммунного ответа, стимулируя образование в клетках инфламмаса — молекулярных машин, осуществляющих процессинг некоторых цитокинов.

Белки семейства S100 — небольшие димерные кальцийсвязывающие белки с молекулярной массой около 10,5 кДа. К настоящему времени идентифицировано по крайней мере 25 представителей этого семейства: S100A1–S100A18, trichohylin, filaggrin, peretin, S100B, S100G, S100P, S100Z. Первыми из этого семейства были описаны S100A1 ($\alpha\alpha$) и S100B ($\beta\beta$), которые были изолированы B.W. Moore из мозга быка как фракция глиальных белков. Белки S100 составляют самую большую подгруппу так называемых EF-hand кальцийсвязывающих белков, к которым относятся также кальмодулин и тропонин С. Название S100 было дано по растворимости (Solubility) в насыщенном сульфате аммония. Белки S100 могут формировать как гомо-, так и гетеродимеры; помимо Ca^{2+} , связывать также Zn^{2+} и Cu^{2+} . Захват ионов меняет пространственную организацию S100 и обеспечивает возможность связи с различными белками-мишенями их биологического действия (документировано более 90 потенциальных белков-мишеней) [45].

Белок S100 экспрессируется преимущественно в астроцитах (85–90% общего содержания в нервной ткани). В олигодендроцитах его содержание невелико, в нейронах обнаружено не более 10–15%. Установлена его преимущественно внутриклеточная локализация. Основная масса белка (до 85%) сосредоточена в цитоплазме клеток, до 15% — в мембранных структурах: в ядерной и цитоплазматической мембранах. Период полужизни S100, по различным данным, составляет от 1 до 6 ч.

Благодаря способности к регуляции активности целого ряда клеточных белков представители данного белкового семейства вовлечены в различные процессы: сокращение, подвижность, пролиферация и дифференцировка клеток, регуляция клеточного цикла, транскрипция, за-

щита от повреждения клетки кислородными радикалами, участие в построении клеточных мембран и цитоскелета, фосфорилирование белков, секреция, кальциевый гомеостаз, трансдукция сигналов [45, 46]. Биологические эффекты протеина S100 проявляются в стимулировании роста, пролиферации и миграции клеток, ингибировании в физиологических условиях апоптоза, активации астроцитов при повреждении головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях [46], что может играть важную роль при репаративных процессах. Таким образом, протеин способствует выживанию клеток в стрессовых условиях и противодействует эффектам нейротоксинов, что может быть важным в течение начальных стадий острых патологических процессов в головном мозге [47].

Помимо этого, для ряда членов белкового семейства описаны и иные эффекты. Многие исследования показали, что белки S100 оказывают воздействие на эффекторные клетки воспаления, иммунной системы, эндо- и эпителиальные клетки, действуя аналогично цитокинам и приводя к развитию локального воспалительного ответа [45]. Недавно найден новый механизм, посредством которого происходит активация NK-клеток через S100A8/A9-RAGE-сигнальный путь и который поможет по-новому взглянуть на взаимосвязь *in vivo* между воспалением и естественным иммунитетом [48].

Биологические эффекты S100 зависят от его концентрации, типа клеток-эффекторов и клеточного микроокружения. Оказывая трофическое воздействие на нейроны в наномолярных концентрациях, белок становится нейротоксичным при аккумуляции его в экстракцеллюлярном пространстве и достижении микромолярных концентраций, индуцируя как апоптоз, так и некроз клеток [49]. В основе последнего эффекта лежит способность S100B как самостоятельно индуцировать секрецию провоспалительных цитокинов, активность синтазы оксида азота iNOS [49], так и усиливать другие сигналы, направленные на нейроны и глиальные клетки. Так, S100B способен усиливать экспрессию интерлейкинов (Interleukin, IL) 1 и 6 [50] в микроглии и нейронах, что может приводить к патологическим изменениям свойств нейронов, в частности к гиперфосфорилированию τ -протеина, снижению уровня некоторых синаптических белков и увеличению синтеза и активности ацетилхолинэстеразы. Кроме того, в высоких концентрациях S100 способен стимулировать высвобождение NO микроглией, что способствует проявлению ее цитотоксического потенциала [51].

Клинический интерес к S100 связан с возможным применением его как маркера повреждения головного мозга при черепно-мозговой травме [47], субарахноидальных кровоизлияниях, инсультах и иных неврологических расстройствах, а также как маркера меланомы [46]. В целом, имеющиеся многочисленные данные позволяют использовать белок S100 в качестве маркера повреждения головного мозга при нарушениях мозгового кровообращения [45–47]. Так, при раннем определении концентрации белка S100 можно оценить степень повреждения головного мозга: исследования выявили прямую корреляционную связь между сывороточным уровнем S100 и тяжестью неврологических нарушений [47].

Повышение уровня белка S100 в сыворотке крови и спинномозговой жидкости при нарушениях мозгового кровообращения обусловлено активацией микроглии. В ранней фазе инсульта микроглиальные клетки в зоне, окружающей очаг повреждения, экспрессируют белки семейства S100 и активно пролиферируют, причем белки экспрессируются в течение не более 3 дней после острой ишемии. Это говорит о том, что активация постоянной

популяции микроглии является ранним ответом мозговой ткани на ишемию и может быть использована как ранний маркер ее повреждения.

Установлено, что S100-RAGE-взаимодействие играет важную роль в патогенезе опухолевой прогрессии. Различные формы рака характеризуются выраженным изменением продукции S100: так, повышенная секреция S100B коррелирует со злокачественной меланомой, S100 — с прогрессией опухоли, стадией заболевания и может использоваться в целях прогноза, выявления рецидивов и метастазов. Активация RAGE за счет взаимодействия с S100B повышает клеточную выживаемость посредством модуляции экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 [52].

Как значимый маркер воспаления у пациентов с ишемической болезнью сердца проявил себя и белок нейтрофилов s100A12, связывающий RAGE (EN-RAGE) [53].

Важно отметить, что значительное повышение синтеза S100B отмечается при болезни Альцгеймера, когда содержание белка в ткани достигает микромолярных концентраций [54]. Длительное увеличение уровня S100B в мозге ведет к усилению экспрессии предшественника β -амилоидного пептида (APP) [55]. S100B также может стимулировать активацию глии, что приводит к нейровоспалению и нейрональной дисфункции [56]. Полагают, что S100B индуцирует дистрофические изменения в аксонах и способствует росту дистрофичных аксонов, гиперэкспрессирующих APP при болезни Альцгеймера.

При болезни Альцгеймера отмечается параллельная гиперэкспрессия S100B и провоспалительного цитокина IL 1 [57], что играет важную роль в патогенезе заболевания. S100B индуцирует также экспрессию IL 6 в нейронах и смешанной нейрон-астроцитарной культуре [57]. IL 6, в свою очередь, может индуцировать каскад нейродегенеративных изменений при болезни Альцгеймера. Таким образом, индуцируемая S100B экспрессия IL 6 может быть важной патогенетической связью в нейрон-глиальных взаимодействиях, которые способствуют прогрессированию нейродегенерации. Кроме того, при болезни Альцгеймера S100B вызывает увеличение концентрации свободного кальция в нейронах, повышает тканевую уровень NO. Эти повреждения, в свою очередь, запускают механизм обратной связи для дальнейшей активации микроглии, гиперэкспрессии IL 1, чтобы поддержать иммунологический процесс и способствовать нарастанию альтерации [57].

Экспрессия S100B отличается на разных стадиях заболевания: на ранних этапах, при более активном образовании бляшек, обнаруживаются более высокие концентрации S100B в крови и ликворе, тогда как в терминальной стадии отмечается их нормализация и даже снижение. Кроме того, по мере увеличения тяжести деменции концентрация антител к S100B приближается к контролю, что свидетельствует об истощении механизмов иммунотолерантности [58].

HMGB1. Еще один лиганд RAGE — протеин HMGB1 (амфотерин) — негистоновый хромосомный высококонсервативный белок с молекулярной массой 30 кДа, присутствующий почти во всех типах клеток. Как ядерный белок HMGB1 стабилизирует нуклеосомы и взаимодействует с ДНК, изменяя ДНК-сегмент, с которым связывается, тем самым облегчая транскрипцию генов [59]. Во время апоптоза связывание HMGB1 с хроматином предотвращает выброс нуклеиновых кислот клеток в окружающую ткань. При некрозе комплексы HMGB1 и хроматина попадают во внеклеточное пространство и действуют как сигналы опасности, стимулируя репара-

цию ткани. Таким образом, HMGB1 является ядерной сигнальной молекулой тревоги (алармин), пассивный выход которой происходит в индуцирующих воспаление некротических клетках [60].

HMGB1 — поздний медиатор в процессе воспаления, так как он появляется во внеклеточном пространстве через 8–12 ч после инициации макрофагального ответа на провоспалительные стимулы. Во внеклеточном пространстве HMGB1 действует как цитокин через RAGE или Toll-подобные рецепторы 2 и 4 (Toll-Like Receptors, TLR—) и имеет аналогичный цитокинам TNF α и IL 6 провоспалительный эффект [60, 61]. После связывания с RAGE или TLR4 HMGB1 активирует клетки сосудистого эндотелия и макрофаги/моноциты, которые начинают экспрессировать провоспалительные цитокины, хемокины и молекулы адгезии. Находясь во внеклеточном пространстве, он является сильным провоспалительным медиатором при эндотоксемии, артритах и сепсисе [62]. Кроме того, HMGB1 может секретироваться стимулированными макрофагами и моноцитами. HMGB1 опосредует летальное действие эндотоксина, цитокинов, индуцирующих повреждение легких, вовлечен в индукцию артритов, активацию макрофагов, хемотаксис гладкомышечных клеток, поддерживает воспаление при диабете 2-го типа и аутоиммунных заболеваниях [61]. Как медиатор воспаления HMGB1 способствует прогрессии атеросклеротических поражений и развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Концентрация HMGB1 в крови увеличивается при многих заболеваниях, включая сепсис, ревматоидный артрит, острый респираторный дистресс-синдром, вызванный гиперсекрецией провоспалительных цитокинов, диссеминированное внутрисосудистое свертывание и ишемию сердца [63].

HMGB1 состоит из трех различных доменов: двух гомологичных ДНК-связывающих последовательностей, названных box A и box B, и отрицательно заряженного C-концевого участка [59, 64]. Домен box B ответственен за функцию молекулы как провоспалительного цитокина, тогда как box A обладает противовоспалительной активностью. Введение мышам высокоочищенного препарата домена box A или антител к HMGB1 спасало их от летального исхода при сепсисе. Это подтверждает важную роль HMGB1 в качестве медиатора летального системного воспаления.

До сих пор не ясно, какие факторы поддерживают регуляторную функцию HMGB1. Установлено, что иммунотропная активность HMGB1 регулируется сигнальными путями с участием инфламмосом [65].

Кроме того, HMGB1 чувствителен к обработке каспазой-1, что приводит к образованию фрагмента в его N-терминальном ДНК-связывающем домене (A-box), который передает сигналы через RAGE и изменяет апоптоз-индуцированную иммунологическую толерантность. На мышинной модели сепсиса показано, что толерантность к вторичной инфекции и связанная с ней смертность были блокированы активной иммунизацией путем обработки дендритных клеток HMGB1 или фрагментом A-box. Эти данные демонстрируют связь между каспазой-1 и HMGB1, что имеет возможное терапевтическое значение при инфекционных и воспалительных заболеваниях [66].

A β . В качестве лиганда RAGE выступает β -амилоид (A β). A β — пептид, содержащий от 36 до 43 аминокислот, который образуется в нейронах путем последовательного протеолиза белка APP (Amyloid Precursor Protein) с помощью ферментов β - и γ -секретаз [67]. Это главный компонент сенильных, или амилоидных, бляшек — одного

из ключевых нейроморфологических признаков болезни Альцгеймера.

Известно, что Аβ аккумулируется в тканях мозга, образуя три класса скоплений: фибриллярные, префибриллярные и кольцеобразные протофибриллы. Превращение Аβ в фибриллярную форму значительно увеличивает связывание со специфическими нейрональными мембранными белками, включая амилоидный белок-предшественник (APP). Фибриллярный Аβ в наномолярных концентрациях связывается с APP на мембране корковых нейронов. Снижение чувствительности к нейротоксическому действию Аβ культивируемых нейронов, не экспрессирующих APP, позволяет предположить, что нейротоксичность Аβ связана с APP.

На разных моделях *in vitro* и *in vivo* показано, что растворимые олигомеры Аβ обладают широким спектром действия на клетки. Механизмы токсического действия олигомеров различных форм Аβ схожи, однако наиболее тяжелые последствия у клеток наблюдаются при воздействии олигомеров Аβ с пептидной цепочкой длиной в 42 аминокислоты (Аβ42). Для многих типов клеток общей

реакцией на действие Аβ42 являются окислительный стресс, перестройка цитоскелета и нарушение гомеостаза кальция [68]. Все эти процессы зависимы от каскада сигналов, запускаемых Аβ42, и являются ключевыми механизмами развития апоптоза или некроза.

Интересно, что Аβ, наряду с токсическими свойствами, также обладает физиологической активностью, которая не ассоциирована с нейродегенерацией или развитием деменции. Так, например, в наномолярных концентрациях он участвует в регуляции транспорта холестерина, является транскрипционным фактором, может служить протектором при окислительном стрессе [69, 70]. Однако, как уже было отмечено выше, в литературе доминируют данные о токсических свойствах этого пептида: увеличение в клетках-мишенях концентрации внутриклеточного кальция, активация комплемента, индукция апоптоза и нарушение работы ионных каналов, генерация активных форм кислорода, стимулирование секреции цитокинов, индукция фосфорилирования τ-белка, модуляция путей сигнальной трансдукции, активация RAGE, нарушение функций синапсов, связывание с APP, митохондриальная

Таблица. Лиганды RAGE-рецепторов и их биологические эффекты

Наименование лиганда RAGE	Экспрессирующие клетки или механизм появления лиганда во внеклеточном пространстве	Биологические эффекты	Источник
AGEs	Неспецифическая, ферментативная реакция белков, пептидов или липидов с сахарами	Дисфункция сосудов (образование поперечных сшивок между молекулами коллагена, уменьшение упругости сосудов), триггеры воспаления (стимуляция образования провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода)	[38–43]
S100	Астроциты, олигодендроциты, нейроны	Стимулирование роста, пролиферации и миграции клеток, регуляция клеточного цикла, транскрипция, защита от повреждения клетки кислородными радикалами, участие в построении клеточных мембран и цитоскелета, фосфорилирование, трансдукция сигналов, ингибирование в физиологических условиях апоптоза, активация глии, развитие локального воспалительного ответа (индукция провоспалительных цитокинов, ферментов оксидативного стресса), активация NK-клеток, индукция дистрофических изменений в аксонах, нарушение кальциевого гомеостаза	[44–58]
HMGB1	Почти все типы клеток	Стабилизация нуклеосом, транскрипция генов, роль ядерной сигнальной молекулы повреждения клетки, провоспалительного медиатора (аналогичный цитокинам TNF α и IL 6 эффект), иммуногенная активность	[59–66]
Аβ	Образуется в нейронах путем последовательного протеолиза белка APP с помощью ферментов β- и γ-секретаз	Активация протеинкиназ, активация комплемента, перестройка цитоскелета, нарушение гомеостаза кальция, индукция апоптоза и формирование ионных каналов, генерация активных форм кислорода, стимулирование секреции цитокинов, индукция фосфорилирования τ-белка, модуляция путей сигнальной трансдукции, нарушение функций синапсов, связывание с APP, митохондриальная дисфункция, нарушение эндоцитоза, изменение потенциала мембраны, в нано- и пикомолярных концентрациях: регуляция транспорта холестерина, транскрипционный фактор, протектор при окислительном стрессе	[67–76]
ДНК	Высвобождается из всех типов клеток при их альтерации	Усиление связывания HMGB1 с RAGE, взаимодействие с димерами внеклеточных доменов RAGE и образование рецепторных комплексов более высокого порядка	[77–79]
Лизофосфатидная кислота	Высвобождается из клеток за счет действия фосфолипазы А	Регуляция клеточной пролиферации и миграции, влияние на развитие мозга	[80]

дисфункция, нарушение эндоцитоза, изменение потенциала мембраны и др. [71, 72].

Аβ-пептиды могут активировать различные пути сигнальной трансдукции. Основными сигнальными звеньями в цепи амилоидного каскада между внеклеточным RAGE-стимулом и терминальным внутриклеточным ответом являются митогенактивируемые протеинкиназы (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) [73, 74]. Конечным результатом активации протеинкиназ являются сборка НАДФН-оксидазы и генерация активных форм кислорода, перестройка цитоскелета, окислительный стресс, активация транскрипционных факторов (NF-κB, CREB, SP1), продукция провоспалительных факторов, что является предполагаемым механизмом, лежащим в основе нейродегенеративного процесса при болезни Альцгеймера [75]. Функционируя как участок связывания β-амилоидного пептида на клеточной поверхности и как транспортер данного пептида из внеклеточной среды в цитоплазму клетки, RAGE опосредует нарушения фосфорилирования MAPK [75]. Кроме того, недавние исследования показали, что при взаимодействии RAGE с Аβ запускается каскад необратимых событий, которые индуцируют альтерацию эндотелиоцитов, приводящую к дисфункции гематоэнцефалического барьера и многократно ухудшают процессы клиренса Аβ [73]. Образование комплекса β-амилоид–RAGE усиливает стресс нейронов и дальнейшее накопление β-амилоида, что приводит к ухудшению памяти и обучаемости [76].

Альтернативные лиганды. Помимо основных перечисленных выше, в качестве лиганда RAGE рассматривается также ДНК [77]. Так, неметилованная ДНК усиливает связывание HMGB1 с RAGE [78], что может играть определенную роль в распознавании патогенных факторов. Было показано, что RAGE стимулирует поглощение ДНК ядрышками и снижает порог иммунологического распознавания для активации TLR 9 — основного ДНК-распознающего трансмембранного сигнального рецептора. Структурный анализ комплексов RAGE–ДНК показал, что ДНК взаимодействует с димерами внеклеточных доменов RAGE и может вызывать образование рецепторных комплексов более высокого порядка. Кроме того, последние исследования показали, что у RAGE-нокаутных мышей отсутствовала

типичная воспалительная реакция на ДНК в легких, что свидетельствует о важности наличия RAGE для распознавания нуклеиновых кислот *in vivo* [79]. Совсем недавно было показано, что RAGE также действует как рецептор для лизофосфатидной кислоты, опосредующей клеточную пролиферацию и миграцию [80].

Основные данные о лигандах RAGE суммированы в табл.

Заключение

Влияние RAGE на биологическую активность клеток осуществляется через множество сигнальных каскадов с участием эндогенных лигандов. Высвобождение лигандов RAGE из активированных или поврежденных клеток играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза. Весомое значение эти эффекты приобретают в развитии воспаления, в частности в нервной системе, что ассоциировано с нарушением нейрон-астроглиальных взаимодействий, активацией клеток микроглии, развитием окислительного стресса. Ввиду заметной роли лигандов RAGE и самих RAGE в патогенезе различных хронических заболеваний и старении данные молекулы являются приоритетными мишенями для модулирующего действия различных терапевтических агентов. Знание сигнальных путей и способов регуляции открывает ряд возможностей для терапевтического вмешательства в RAGE-опосредованные заболевания.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-1172.2014.7).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol.* 2013;94(1):55–68. doi: 10.1189/jlb.1012519
- Borsi V, Cerofolini L, Fragai M, Luchinat C. NMR characterization of the C-terminal tail of full length RAGE in a membrane mimicking environment. *J Biomol NMR.* 2012;54(3):285–290. doi: 10.1007/s10858-012-9671-0
- Xie J, Mendez JD, Mendez-Valenzuela V, Aguilar-Hernandez MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal.* 2013;25(11):2185–2197. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.06.013
- Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schiefner A, Diez J, Chazin WJ, Fritz G. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure.* 2010;18(10):1342–1352. doi: 10.1016/j.str.2010.05.017
- Stogsdill JA, Stogsdill MP, Porter JL, Hancock JM, Robinson AB, Reynolds PR. Embryonic overexpression of receptors for advanced glycation end products by alveolar epithelium induces an imbalance between proliferation and apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(1):60–66. doi: 10.1165/rcmb.2011-0385OC
- Rojas A, Figueroa H, Morales E. Fueling inflammation at tumor microenvironment: the role of multiligand RAGE axis. *Carcinogenesis.* 2010;31:334–341. doi: 10.1093/carcin/bgp322
- Bierhaus A, Nawroth PP. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia.* 2009;52(11):2251–2263. doi: 10.1007/s00125-009-1458-9
- Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, Lu Y, Rosario RH, Oruganti S, Nikolla Z, Belov D, Lalla E, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest.* 2008;118(1):183–194. doi: 10.1172/JCI32703
- Fang F, Lue LF, Yan S, Xu H, Luddy JS, Chen D, Walker DG, Stern DM, Schmidt AM, Chen JX, Yan SS. RAGE dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Aβ accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2010; 24 (4): 1043-1055. doi: 10.1096/fj.09-139634

10. Akirav EM, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt AM, Herold KC. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS One*. 2012;7:e34698. doi: 10.1371/journal.pone.0034698
11. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med*. 2009;17:7–17. doi: 10.1186/1479-5876-7-17
12. Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH, Nordin N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int J Inflam*. 2013;2013:403460. doi: 10.1155/2013/403460
13. Lam JK, Wang Y, Shiu SW, Wong Y, Betteridge DJ, Tan KC. Effect of insulin on the soluble receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Diabet Med*. 2013;30(6):702–709. doi: 10.1111/dme.12166
14. Piperi C, Goumenos A, Adamopoulos C, Papavassiliou AG. AGE/RAGE signalling regulation by miRNAs: associations with diabetic complications and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;60:197–201. doi: 10.1016/j.biocel.2015.01.009
15. Moridi H, Karimi J, Sheikh N, Goodarzi MT, Saidijam M, Yadegarazari R, Khazaei M, Khodadadi I, Tavilani H, Piri H, Asadi S, Zarei S, Rezaei A. Resveratrol dependent down-regulation of receptor for advanced glycation end products and oxidative stress in kidney of rats with diabetes. *Int J Endocrinol Metab*. 2015;13(2):e23542. doi: 10.5812/ijem.23542
16. Popa I, Ganea E, Petrescu SM. Expression and subcellular localization of RAGE in melanoma cells. *Biochem Cell Biol*. 2014;92(2):127–136. doi: 10.1139/bcb-2013-0064
17. Wang L, Chen K, Liu K, Zhou Y, Zhang T, Wang B, Mi M. DHA inhibited AGEs-induced retinal microglia activation via suppression of the PPAR γ /NF κ B pathway and reduction of signal transducers in the AGEs/RAGE axis recruitment into lipid rafts. *Neurochem Res*. 2015;40(4):713–722. doi: 10.1007/s11064-015-1517-1
18. Munesue S, Yamamoto Y, Urushihara R, Inomata K, Saito H, Motoyoshi S, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H. Low molecular weight fractions of Japanese soy sauce act as a RAGE antagonist via inhibition of RAGE trafficking to lipid rafts. *Food Funct*. 2013;4(12):1835–1842. doi: 10.1039/c2fo30359k
19. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2008;283:35507–35516. doi: 10.1074/jbc.M806948200
20. Wang Y, Wang H, Piper MG, McMaken S, Mo X, Opalek J, Schmidt AM, Marsh CB. sRAGE induces human monocyte survival and differentiation. *J Immunol*. 2010;185(3):1822–1835. doi: 10.4049/jimmunol.0903398
21. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(10):1379–1386. doi: 10.1016/j.bcp.2010.01.013
22. Galichet A, Weibel M, Heizmann CW. Calcium regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370(1):1–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.163
23. Jabaudon M, Futier E, Roszyk L, Chalus E, Guerin R, Petit A, Mrozek S, Perbet S, Cavot-Constantin S, Chartier C, Sapin V, Bazin JE, Constantin JM. Soluble form of the receptor for advanced glycation end products is a marker of acute lung injury but not of severe sepsis in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2011;39(3):480–488. doi: 10.1097/CCM.0b013e318206b3ca
24. Ciccocioppo R, Imbesi V, Betti E, Boccaccio V, Kruzliak P, Cange-mi GC, Maffè GC, Vanoli A, Merante S, De Amici M, Falcone C, Klersy C, Corazza GR. The circulating level of soluble receptor for advanced glycation end products displays different patterns in ulcerative colitis and Crohn's disease: a cross sectional study. *Dig Dis Sci*. 2015;60(8):2327–2337. doi: 10.1007/s10620-015-3619-7. doi: 10.1007/s10620-015-3619-7
25. Creagh-Brown BC, Quinlan GJ, Hector LR, Evans TW, Burke-Gaffney A. Association between preoperative plasma sRAGE levels and recovery from cardiac surgery. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:496031. doi: 10.1155/2013/496031
26. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. Alternative splicing of RAGE: roles in biology and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:2756–2770. doi: 10.2741/3884
27. Gopal P, Reynaert NL, Scheijen JL, Schalkwijk CG, Franssen FM, Wouters EF, Rutten EP. Association of plasma sRAGE, but not esRAGE with lung function impairment in COPD. *Respir Res*. 2014;15:24. doi: 10.1186/1465-9921-15-24
28. Giannini C, D'Adamo E, de Georgis T, Chiavaroli V, Verrotti A, Chiarelli F, Mohn A. The possible role of esRAGE and sRAGE in the natural history of diabetic nephropathy in childhood. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(2):269–275. doi: 10.1007/s00467-011-1988-5
29. Zhu H, Ding Q. Lower expression level of two RAGE alternative splicing isoforms in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2015;597:66–70. doi: 10.1016/j.neulet.2015.04.032
30. Liu XY, Li HL, Su JB, Ding FH, Zhao JJ, Chai F, Li YX, Cui SC, Sun FY, Wu ZY, Xu P, Chen XH. Regulation of RAGE splicing by hnRNP A1 and Tra2 β -1 and its potential role in AD pathogenesis. *J Neurochem*. 2015;133(2):187–198. doi: 10.1111/jnc.13069
31. Tam XH, Shiu SW, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ, Tan KC. Enhanced expression of receptor for advanced glycation end-products is associated with low circulating soluble isoforms of the receptor in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120(2):81–89. doi: 10.1042/CS20100256
32. Huang M, Que Y, Shen X. Correlation of the plasma levels of soluble RAGE and endogenous secretory RAGE with oxidative stress in pre-diabetic patients. *J Diabetes Complications*. 2015;29(3):422–426. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.12.007
33. Moriya S, Yamazaki M, Murakami H, Maruyama K, Uchiyama S. Two soluble isoforms of receptors for advanced glycation end products (RAGE) in carotid atherosclerosis: the difference of soluble and endogenous secretory RAGE. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(10):2540–2546. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.05.037
34. Moser B, Megerle A, Bekos C, Janik S, Szerafin T, Birner P, Schiefer AI, Mildner M, Lang I, Skoro-Sajer N, Sadushi-Kolici R, Taghavi S, Klepetko W, Ankersmit HJ. Local and systemic RAGE axis changes in pulmonary hypertension: CTEPH and iPAH. *PLoS One*. 2014;9(9):e106440. doi: 10.1371/journal.pone.0106440
35. Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(12):625–632. doi: 10.1016/j.tibs.2011.08.008
36. Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem*. 2008;283:27255–27269. doi: 10.1074/jbc.M801622200
37. Sevillano N, Girón MD, Salido M, Vergas AM, Vilches J, Salto R. Internalization of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) is required to mediate intracellular responses. *J Biochem*. 2009;145(1):21–30. doi: 10.1093/jb/mvn137
38. Ahmed N. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;67(1):3–21. doi: 10.1016/j.diabres.2004.09.004
39. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:1–21. doi: 10.1210/rp.56.1.1
40. Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp Gerontol*. 2011;46(4):217–224. doi: 10.1016/j.exger.2010.11.007
41. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response – the evidence mounts. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):505–512. doi: 10.1189/jlb.0409230
42. Sharaf H, Matou-Nasri S, Wang Q, Rabhan Z, Al-Eidi H, Al-Abdulahman A, Ahmed N. Advanced glycation endproducts increase

- proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(3):429–441. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.12.009
43. Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM, Ramasamy R. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging. *Curr Mol Med*. 2007;7(8):699–710. doi: 10.2174/156652407783220732
44. Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(6):993–1007. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.016
45. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013;13(1):24–57. doi: 10.2174/156652413804486214
46. Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*. 2008;12(4):198–204.
47. Ohrt-Nissen S, Friis-Hansen L, Dahl B, Stensballe J, Romner B, Rasmussen LS. How does extracerebral trauma affect the clinical value of S100B measurements? *Emerg Med J*. 2011;28(11):941–944. doi: 10.1136/emj.2010.091363
48. Narumi K, Miyakawa R, Ueda R, Hashimoto H, Yamamoto Y, Yoshida T, Aoki K. Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 activate NK cells via interaction with RAGE. *J Immunol*. 2015;194(11):5539–5548. doi: 10.4049/jimmunol.1402301
49. Lam AGM, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, Schavocky JP, Watterson DM, Van Eldik LJ. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NF- κ B. *Neurobiol Aging*. 2001;22(5):765–772. doi: 10.1016/S0197-4580(01)00233-0
50. Pizza O, Leggiero E, De Benedictis G, Pastore L, Salvatore F, Tufano R, De Robertis E. S100B induces the release of pro-inflammatory cytokines in alveolar type I-like cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(2):383–391.
51. Turco F, Sarnelli G, Cirillo C, Palumbo I, De Giorgi F, D'Alessandro A, Cammarota M, Giuliano M, Cuomo R. Enteroglial derived S100B protein integrates bacteria induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut*. 2014;63(1):105–115. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302090
52. Chen H, Xu C, Jin Q, Liu Z. S100 protein family in human cancer. *Am J Cancer Res*. 2014;4(2):89–115.
53. Ligthart S, Sedaghat S, Ikram MA, Hofman A, Franco OH, Dehghan A. EN-RAGE: a novel inflammatory marker for incident coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(12):2695–2699. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304306
54. Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW. The S100B/RAGE axis in Alzheimer's disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010:539581. doi: 10.1155/2010/539581
55. Anderson PJ, Watts HR, Jen S, Gentleman SM, Moncaster JA, Walsh DT, Jen LS. Differential effects of interleukin-1 β and S100B on amyloid precursor protein in rat retinal neurons. *Clin Ophthalmol*. 2009;3:235–242. doi: 10.2147/OPHT.S2684
56. Sathe K, Maetzler W, Lang JD, Mounsey RB, Fleckenstein C, Martin HL, Schulte C, Mustafa S, Synofzik M, Vukovic Z, Itohara S, Berg D, Teismann P. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway. *Brain*. 2012;135:3336–3347. doi: 10.1093/brain/aws250
57. Cappellano G, Carecchio M, Fleetwood T, Magistrelli L, Cantello R, Dianzani U, Comi C. Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis*. 2013;2(2):89–107.
58. Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Autoimmune responses to amyloid structures of A β (25–35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;18(2):165–171. doi: 10.1159/000079197
59. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):168–179. doi: 10.1038/nri3151
60. Brencicova E, Diebold SS. Nucleic acids and endosomal pattern recognition: how to tell friend from foe? *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:37. doi: 10.3389/fcimb.2013.00037
61. Kannan K, Ortmann R. Inflammation promoting activity of HMGB-1 In type-II diabetes and as a marker of tissue injury. *J Immunol*. 2012;188:54.3.
62. Tadić JM, Bae HB, Banerjee S, Zmijewski JW, Abraham E. Differential activation of RAGE by HMGB1 modulates neutrophil associated NADPH oxidase activity and bacterial killing. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(1):C249–256. doi: 10.1152/ajpcell.00302.2011
63. Musumeci D, Roviello GN, Montesarchio D. An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1 related pathologies. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):347–357. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.11.001
64. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol*. 2013;93(6):865–873. doi: 10.1189/jlb.1212662
65. Salmina AB, Komleva YK, Lopatina OL, Kuvacheva NV, Gorina YV, Panina YA, Uspenskaya YA, Petrova MM, Demko IV, Zamay AS, Malinovskaya NA. Astroglial control of neuroinflammation: TLR3-mediated dsRNA-sensing pathways are in the focus. *Rev Neurosci*. 2015;26(2):143–159. doi: 10.1515/revneuro-2014-0052
66. LeBlanc PM, Doggett TA, Choi J, Hancock MA, Durocher Y, Frank F, Nagar B, Ferguson TA, Saleh M. An immunogenic peptide in the A-box of HMGB1 protein reverses apoptosis induced tolerance through RAGE receptor. *J Biol Chem*. 2014;289(11):7777–7786. doi: 10.1074/jbc.M113.541474
67. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):499–509. doi: 10.1038/nrn2168
68. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majidi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J. Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract*. 2015;24(1):1–10. doi: 10.1159/000369101
69. Igbaybova U, Sun GY, Weisman GA, He Y, Wood WG. Amyloid beta-protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes. *Neuroscience*. 2009;162(2):328–338. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.04.049
70. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. 2010;5(3):e9505. doi: 10.1371/journal.pone.0009505
71. Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Zhu X, Boehm J. Amyloid Beta and tau proteins as therapeutic targets for Alzheimer's disease treatment: rethinking the current strategy. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012:630182. doi: 10.1155/2012/630182
72. Kong W, Zhang J, Gao W, Liu Q, Zhou L, Chai X. β -amyloid protein up-regulates the expression of the receptor for advanced glycation end products by increasing ROS production. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2013;33(8):1132–1136.
73. Askarova S, Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC. Role of A β -receptor for advanced glycation endproducts interaction in oxidative stress and cytosolic phospholipase A $_2$ activation in astrocytes and cerebral endothelial cells. *Neuroscience*. 2011;199:375–385. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.09.038
74. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Tumova S, Rauvala H. RAGE mediated cell signaling. *Methods Mol Biol*. 2013;963:239–263. doi: 10.1007/978-1-62703-230-8_15
75. Gilbert BJ. The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Clin Pathol*. 2013;66(5):362–366. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201515

76. Schmidt AM, Sahagan B, Nelson RB, Selmer J, Rothlein R, Bell JM. The role of RAGE in amyloid beta peptide mediated pathology in Alzheimer's disease. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10(7):672–680.
77. Park H, Boyington JC. The 1.5 Å crystal structure of human receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) ectodomains reveals unique features determining ligand binding. *J Biol Chem*. 2010;285(52):40762–40770. doi: 10.1074/jbc.M110.169276
78. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle A.J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol*. 2007;8(5):487–496. doi: 10.1038/ni1457
79. Sirois CM, Jin T, Miller AL, Bertheloot D, Nakamura H, Horvath GL, Mian A, Jiang J, Schrum J, Bossaller L, Pelka K, Garbi N, Brewah Y, Tian J, Chang C, Chowdhury PS, Sims GP, Kolbeck R, Coyle AJ, Humbles AA, Xiao TS, Latz E. RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA. *J Exp Med*. 2013;210(11):2447–2463. doi: 10.1084/jem.20120201
80. Rai V, Touré F, Chitayat S, Pei R, Song F, Li Q, Zhang J, Rosario R, Ramasamy R, Chazin WJ, Schmidt AM. Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. *J Exp Med*. 2012;209(13):2339–2350. doi: 10.1084/jem.20120873

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Успенская Юлия Александровна, доктор биологических наук, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 228-07-69, **e-mail:** uspenskaya.yulia@gmail.com

Комлева Юлия Константиновна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 228-07-69, **e-mail:** yuliakomleva@mail.ru

Пожиленкова Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, исполнительный директор НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 228-07-69, **e-mail:** Elena.a.pozhilenkova@gmail.com

Салмин Владимир Валерьевич, доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой медицинской и биологической физики ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 221-74-72, **e-mail:** vsalmin@gmail.com

Лопатина Ольга Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 228-07-69, **e-mail:** ol.lopatina@gmail.com

Фурсов Александр Анатольевич, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры анестезиологии и реаниматологии Института последипломного образования ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 228-07-69, **e-mail:** fursov_alex@mail.ru

Лаврентьев Павел Вячеславович, преподаватель кафедры медицинской и биологической физики, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 221-74-72, **e-mail:** lavran@inbox.ru

Белова Ольга Анатольевна, ассистент кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии с курсом последипломного обучения им. проф. Л.Л. Роднянского ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 220-16-09, **e-mail:** ulyabelova@mail.ru

Салмина Алла Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России
Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, д. 1, **тел.:** +7 (391) 228-07-69, **e-mail:** allasalmina@mail.ru

DOI: 10.15690/vramn482

Д.А. Морозов^{1, 2}, О.Л. Морозова², А.А. Цыплаков³, Ю.А. Мельникова²

¹ Научный центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация

³ Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов, Российская Федерация

Повреждение почек у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии

Обзор посвящен проблемам повреждения жизненно важных органов у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии (СИАГ). Особое внимание уделено predisposing факторам и ключевым звеньям патогенеза повреждения почек у новорожденных с СИАГ. В статье представлены новейшие данные о роли гипоксии в инициации повреждения почечной паренхимы, а также перспективах использования различных молекулярных маркеров для ранней диагностики нефропатии. Создание молекулярно-клеточной тест-системы для диагностики и мониторинга повреждения почек у новорожденных с СИАГ — перспективное направление в лечении и профилактике нефропатий у новорожденных.

Ключевые слова: хемокины, цитокины, повреждение почек, интраабдоминальная гипертензия, новорожденные.

(Для цитирования: Морозов Д.А., Морозова О.Л., Цыплаков А.А., Мельникова Ю.А. Повреждение почек у новорожденных с синдромом интраабдоминальной гипертензии. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 704–709. Doi: 10.15690/vramn482)

704

Введение

Многие исследования последних лет подчеркивают негативное влияние интраабдоминальной гипертензии (ИАГ) на функцию жизненно важных органов пациентов различных возрастных групп и необходимость мониторинга интраабдоминального давления (ИАД) у больных с риском развития данной патологии [1]. Мультицентровые эпидемиологические исследования продемонстрировали, что ИАГ регистрируется с частотой до 54,4% среди пациентов терапевтического и до 65% среди больных хирургического профиля отделений реанимации и интенсивной терапии; летальность при синдроме интраабдоминальной гипертензии (СИАГ) достигает 60–68% [2]. Консолидация усилий ученых и практикующих врачей в решении этой проблемы в последнее десятилетие, создание Всемирного общества специалистов по лечению абдоминального компартмент-синдрома (World Society of the Abdominal Compartment Syndrome, WSACS), проведение согласительных конференций и разработка рекомендаций по ранней диагностике, мониторингу и

лечению ИАГ и СИАГ у взрослых позволили снизить летальность до 37% [3].

Тем не менее в педиатрической практике этому вопросу посвящено гораздо меньше исследований, а смертность в группе детей с СИАГ остается на стабильно высоком уровне — 40–60%. Опрос, проведенный сотрудниками Университета Лома Линда (Калифорния, США, 2010) показал, что только 47% педиатров могут правильно диагностировать СИАГ у пациентов, 24% никогда не измеряли уровень ИАД, и лишь чуть больше половины врачей (51%) предпринимали попытки по его лечению [2]. В России подобные исследования до настоящего времени не проводились, а в педиатрической практике отсутствуют единые взгляды и четкие рекомендации по диагностике и ведению пациентов различных возрастных групп с ИАГ, что приводит к развитию осложнений, прогрессированию полиорганной недостаточности и неблагоприятным исходам [4].

Особую группу составляют новорожденные, у которых развитие ИАГ накладывается на критический период постнатальной адаптации, зачастую сопровождающийся

Д.А. Morozov^{1, 2}, O.L. Morozova², A.A. Tsyplakov³, Yu.A. Melnikova²

¹ Scientific Centre of Children Health, Moscow, Russian Federation

² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

³ Saratov State Medical University n. a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation

Kidney Injury in Newborns with Abdominal Compartment Syndrome

The review represents the problems of a damage to the vital organs in newborns with the Abdominal Compartment Syndrome (ACS). Particular attention is paid to the key predisposing factors and key links of the renal damage's pathogenesis in newborns with ACS. This review presents the latest data about the role of the hypoxia at the initiation of damage of the renal parenchyma, the prospects for the use of various molecular markers for early diagnostics of nephropathy. Creation of molecular cell test system for the diagnostics and monitoring of renal damage in newborns with ACS is a promising trend in the treatment and prevention nephropathy in newborns.

Key words: Chemokines, Cytokines, Renal Insufficiency, Intra-abdominal Hypertension, Newborns.

(For citation: Morozov D.A., Morozova O.L., Tsyplakov A.A., Melnikova Yu.A. Kidney Injury in Newborns with Abdominal Compartment Syndrome. Vestnik Rossijskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 704–709. Doi: 10.15690/vramn482)

сердечно-сосудистой, дыхательной, почечной, печеночной и другими дисфункциями [5].

Многие исследователи отмечают, что ИАГ у новорожденных наиболее часто возникает после хирургической коррекции врожденных пороков развития передней брюшной стенки (гастрошизиса), эмбриональных грыж пупочного канатика (омфалоцеле), ложной диафрагмальной грыжи [6–8].

Наиболее чувствительным органом к интраабдоминальной гипертензии являются почки, в которых даже при сохраненной системной гемодинамике определяется снижение перфузионного и, соответственно, эффективного фильтрационного давления, что клинически проявляется симптомами почечной недостаточности [4]. Авторы отмечают, что даже после декомпрессии брюшной полости функция почек, как правило, восстанавливается не сразу [9]. Именно поэтому цель многих исследований последних лет состоит в создании молекулярно-клеточной тест-системы для ранней диагностики, мониторингирования и профилактики повреждения почек у новорожденных с СИАГ.

История вопроса, определение понятий, терминология

Влияние повышенного ИАД на функции внутренних органов были описаны еще в XIX в. [10–12]. Так, в 1876 г. E. Wendt в своей публикации сообщил о нежелательных изменениях, происходящих в организме в связи с увеличением давления в брюшной полости. В 1911 г. H. Emerson опубликовал данные нескольких экспериментов, демонстрирующих высокую клиническую значимость давления в брюшной полости на функционирование различных органов и систем [13]. E.-J. Marey в 1863 г. предположил взаимосвязь между внутригрудным и внутрибрюшным давлением, а в 1870 г. P. Bert разработал способ измерения ИАД у животных и сделал вывод о том, что высокое стояние диафрагмы обусловлено повышением внутрибрюшного давления, подтверждая, таким образом, гипотезу французского физиолога. S.E. Bradley и соавт. уже в 1947 г. измеряли скорость потока плазмы в почке и величину фильтрации в гломерулах, а также осуществляли мониторинг давления в нижней полой вене и почечных венах, изменяя в эксперименте величину ИАД. Авторы пришли к заключению, что уменьшение клубочковой фильтрации и скорости потока плазмы в почке наблюдается при повышении ИАД в результате увеличения давления в почечной вене. В последующем отдельные публикации ученых описывали нарушения гемодинамики, дыхания и почечной функции, связанные с повышением ИАД [14].

Развитие полиорганной недостаточности при отсутствии мониторингирования ИАД в клинических наблюдениях за пациентами с ИАГ [1, 15, 16] зачастую расценивалось клиницистами как последствие гиповолемии, а следующая за этим массивная инфузионная терапия усугубляла отек и ишемию внутренних органов. Нарушение органно-тканевого кровотока и патологическая гипергидратация органов брюшной полости способствовали дальнейшему росту ИАД и замыкали порочный круг. В 1984 г. I.L. Klon с соавт. описали метод непрямого измерения ИАД с помощью катетера, помещенного в мочевой пузырь, подчеркнув важность динамического наблюдения за этим показателем [17].

В настоящее время принято рассматривать брюшную полость как замкнутое несжимаемое пространство, под-

чиняющееся гидростатическим законам [18]. На формирование ИАД оказывают влияние состояние диафрагмы и мышц брюшного пресса, а также органы желудочно-кишечного тракта, которые могут быть либо пустыми, либо заполненными кишечным содержимым [19]. У новорожденных детей физиологические показатели ИАД, измеряемого косвенным способом в полости мочевого пузыря, находятся в пределах 5,1 мм рт.ст. (4,4–5,2), у мальчиков они несколько выше (5,1 мм рт.ст.; 4,8–5,2), чем у девочек (4,8 мм рт.ст.; 4,4–5,1). Показатели ИАД, полученные путем интравезикальной манометрии, не имеют значимой зависимости от массы тела ребенка [5]. Под ИАГ понимают стабильное или повторяющееся повышение ИАД свыше 12 мм рт.ст. при абдоминальном перфузионном давлении 60 мм рт.ст. и ниже [20]. Следует отметить, что до настоящего времени величина этого давления, особенно у детей, остается условной, и не является жесткой константой, поскольку ведущую роль в формировании данного осложнения в каждом отдельном случае играют индивидуальные физиологические особенности организма.

Международной согласительной конференцией WSACS было предложено ввести понятие синдрома интраабдоминальной гипертензии (СИАГ), известного в англоязычной литературе как Abdominal Compartment Syndrome (ACS). Под СИАГ понимают симптомокомплекс, формирующийся вследствие стойкого повышения давления в брюшной полости свыше 20 мм рт.ст. и характеризующийся последующим развитием полиорганной недостаточности. При этом ИАГ рекомендуют рассматривать отдельно, так как она приводит к формированию СИАГ при условии, что давление в закрытой брюшной полости повышается до уровня, прерывающего нормальное кровоснабжение органов [3].

Таким образом, проблема ИАГ и СИАГ в педиатрической практике требует дальнейшей разработки, необходимо уточнение вопросов, касающихся механизмов повреждения различных органов и систем.

Клинические особенности СИАГ у новорожденных

Основные причины и механизмы развития СИАГ у детей старшего возраста сходны с таковыми у взрослых, тогда как новорожденные представляют собой особую категорию больных с ИАГ. Многие исследователи подчеркивают, что именно новорожденные наиболее чувствительны к повышению ИАД, что сопряжено с адаптацией к постнатальным условиям, морфофункциональной незрелостью органов и систем, ограничением их компенсаторных возможностей, перинатальной гипоксией, возможным наличием сопутствующей патологии [21, 22]. Среди множества факторов, приводящих к повышению ИАД (объемные образования брюшной полости, карбоперитонеум при лапароскопических операциях, некротический энтероколит и др.), ИАГ у новорожденных наиболее часто возникает после хирургической коррекции врожденных пороков развития, сопровождающихся висцеро-абдоминальной диспропорцией на протяжении длительного временного промежутка [6–8].

Из-за несоответствия объема гипоплазированной брюшной полости и погружаемого в нее содержимого после первичной пластики при врожденных пороках развития передней брюшной стенки или диафрагмальной грыжи повышается ИАД, которое приводит к сдавлению нижней полой вены, уменьшению венозного возврата,

снижению сердечного выброса, тяжелым дыхательным расстройствам, острой почечной недостаточности, мезентериальной ишемии и тромбозам. Перечисленные осложнения в совокупности формируют полиорганную недостаточность с прогрессирующими метаболическими расстройствами, нарушением газового состава крови, удлиняют сроки лечения и являются наиболее частой причиной летальных исходов [4].

Данные различных исследователей о допустимой величине повышения ИАД у новорожденных противоречивы. Согласно одним, оно не должно превышать 20 мм рт.ст. [19, 23]. Результаты других исследований свидетельствуют о развитии ИАГ и СИАГ у новорожденных детей при меньших значениях давления в брюшной полости [24]. Известно, что у взрослых ИАД 20 мм рт.ст. может вызвать олигурию, а увеличение его до 35–40 условных единиц — анурию. У новорожденного суточный диурез снижается более чем в два раза при повышении ИАД уже до 10–15 мм рт.ст., а при 30 мм рт.ст. и более развивается анурия [25].

У пациентов данной возрастной категории почки являются наиболее чувствительным органом к ИАГ, что обусловлено морфофункциональными особенностями мочевыделительной системы [26]. Одно из первых визуальных проявлений повреждения почек при СИАГ — олигурия, что свидетельствует о развившихся глубоких, а, возможно, и необратимых патологических изменениях.

Патофизиологические основы повреждения почек

Морфофункциональные особенности почек новорожденных обуславливают быстрое вовлечение их в патологический процесс в критических состояниях. При неадекватном лечении (по времени начала и интенсивности) развитие почечной недостаточности идет в направлении несостоятельности этого органа [27]. Более того, после декомпрессии брюшной полости функция почек, как правило, восстанавливается лишь через определенный промежуток времени [9].

Патогенез повреждения почек у новорожденных с СИАГ сложен и многогранен, однако можно выделить несколько ключевых звеньев в развитии этого процесса. Важным механизмом, блокирующим органно-тканевую кровотоков в почках, является компрессия почечных вен под действием повышенного ИАД и возникающее в результате этого венозное полнокровие [25]. У детей раннего возраста к этому дополнительно предрасполагают преобладающий рассыпной тип ветвления почечной артерии и выраженная венозная сеть [28]. Венозное полнокровие приводит к замедлению тока крови в микроциркуляторном русле, снижению скорости отведения метаболитов и углекислого газа, в результате чего нарушается трофика тканей, развивается гипоксия, локальная гиперкапния, лактат-ацидоз, изменяется нормальная работа ферментных систем, прогрессируют тубулоинтерстициальные повреждения. Возрастающее гидростатическое давление в превенулярном (венозном) отделе капилляра приводит к снижению градиента давления и абсорбции воды из межклеточного пространства, что влечет за собой отек паренхимы почек. Одновременно возможно развитие обтурации большого числа канальцев в результате отека, набухания эпителия канальцев, закрытия их белковыми цилиндрами или клеточным детритом в связи с повреждением и гибелью эпителия [29].

Уменьшение венозного возврата и снижение вентиляции легких вследствие возрастания давления в грудной полости под действием ИАГ приводят к существенному уменьшению заполнения желудочков и ударного объема сердца [30, 31]. На фоне снижения артериального давления из-за гиповолемии и падения сердечного выброса, а также рефлекторного спазма приносящих артериол вследствие раздражения солнечного сплетения повышенным ИАД и повышения сосудистого сопротивления в результате активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы уменьшается артериальный кровоток в почках, развиваются ишемия и гипоксия почечной ткани [32]. Гипоксия потенцирует каскад таких нарушений, как ацидоз, интенсификация образования активных форм кислорода и липоксигенации, электролитные сдвиги, что вызывает дальнейшее прогрессирующее повреждение клеток [33].

Непосредственное давление на почечную ткань дополнительно снижает паренхиматозный кровоток, а также приводит к повышению давления в мочевыводящих путях, вызывая нарушение уродинамики [25]. Воспаление, развивающееся в результате обструктивной нефропатии, гипоксии и присоединения бактериальной инфекции, приводит к тубулоинтерстициальному ремоделированию с возможным исходом в нефросклероз и необратимому уменьшению числа функционирующих нефронов [29, 34].

Нарастание функциональной несостоятельности почек при СИАГ у новорожденных утяжеляет полиорганную недостаточность в целом, а повреждение почечной ткани может стать основой для развития хронической болезни почек во взрослом состоянии.

Перспективы молекулярной диагностики почечного повреждения при СИАГ

Использование традиционных критериев диагностики острого повреждения почек при СИАГ у новорожденных (температура диуреза, азотемия, клиренс креатинина, показатели системной гемодинамики) не позволяет оценивать развивающиеся задолго до явных клинических проявлений серьезные патологические и функциональные изменения мочевыделительной системы. Это предопределяет необходимость разработки и внедрения в практику новых диагностических критериев ранней диагностики и мониторинга нефропатии у новорожденных с СИАГ. В настоящее время наиболее перспективным направлением рассматривается создание диагностической молекулярной тест-системы, высокочувствительной к ранним проявлениям повреждения различных компонентов нефрона, развитию воспаления и ишемии. Проведенные на сегодняшний день многочисленные исследования позволяют выделить ряд белков в моче, относящихся к группе биомаркеров острого повреждения почек, которые позволили бы диагностировать минимальные структурные изменения, уровень повреждения и своевременно скорректировать лечение, превентивно провести нефропротективные мероприятия по предупреждению прогрессирования патологического процесса.

Маркеры повреждения нефрона

Воздействие повышенного ИАД на почечную паренхиму является одним из ключевых факторов повреждения структурных элементов нефрона. Информативным для диагностики уровня повреждения могло бы стать определение специфических маркеров проксимальных и

дистальных канальцев, в том числе базальной мембраны клубочков [35].

Одним из наиболее ранних и чувствительных признаков нарушения работы почек при СИАГ у новорожденных является маркер повреждения дистальных канальцев нефрона π -глутатион-S-трансфераза (π -GST). GST — многофункциональное семейство ферментов, которое играет существенную роль в катализе канцерогенов, липидов, продуктов оксидативного стресса, генотоксических метаболитов [36]. Для выявления повреждения почек наибольшее значение имеют классы α -GST и π -GST [37]. α -GST локализуется в проксимальных канальцах и в норме содержится в небольшом количестве в моче здоровых людей. π -GST является индикатором повреждения дистальных канальцев в ответ на действие различных факторов.

Согласно данным ряда исследователей, именно эти биомаркеры первыми вырабатываются в ответ на минимальную гипоксию. Публикации о диагностической ценности π -GST в моче при диабетической нефропатии и нефросклерозе в результате пузырно-мочеточникового рефлюкса позволяют рассматривать повышение π -GST и α -GST в моче у пациентов с острым повреждением почек, перенесших оперативное вмешательство на сердце, в качестве потенциальных ранних индикаторов почечного повреждения [38–40].

Липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой (Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin, NGAL), в небольшом количестве обнаруживается в большинстве тканей организма, однако наиболее изучен как ранний маркер повреждения почечной ткани. В норме концентрация NGAL в сыворотке крови поддерживается на уровне ~20 нг/мл [41], и повышение его в моче наблюдается при повреждении эпителия проксимальных канальцев вследствие нарушения эндоцитоза на апикальной мембране, а также при усилении синтеза NGAL непосредственно почечной тканью [42].

Результаты большого количества исследований указывают на то, что содержание NGAL в моче и сыворотке крови является более ранним и независимым маркером острого почечного повреждения, чем концентрация креатинина [41]. Отмечается его диагностическая ценность при гипертонической нефропатии, волчаночном нефрите, хроническом гломерулонефрите и прогрессирующей хронической болезни почек у взрослых [43]. Снижение концентрации NGAL через 3 мес после оперативного вмешательства выявлено у детей с врожденным гидронефрозом, вызванным обструкцией мочевых путей [44], что дополнительно указывает на перспективность применения данного биомаркера в мониторинге повреждения почек у новорожденных с СИАГ.

Ранним маркером повреждения клубочков признается подокаликсин — трансмембранный гликопротеин подоцитов. Содержание подокаликсина в моче соотносится с числом потерянных подоцитов, однако определение числа подоцитов признается более чувствительным методом диагностики [45]. Установлено, что содержание подокаликсина в моче хорошо коррелирует с активностью IgA-нефропатии [46], фокального сегментарного гломерулосклероза [47], волчаночного нефрита [48] и диабетической нефропатии [49]. Использование подокаликсина в качестве маркера почечного повреждения при СИАГ перспективно: требуются исследования динамических изменений его содержания в моче при развитии ИАГ у детей.

Ранние маркеры гипоксии

Из описанных механизмов повреждения почек у новорожденных при СИАГ ведущее значение имеют ишемия и циркуляторная гипоксия. Ключевым медиатором клеточной адаптации к гипоксии служит индуцируемый гипоксией фактор (Hypoxia-Inducible Factor 1, HIF-1), регулирующий множество сигнальных путей и инициирующий выработку фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Роль самого HIF1 в почечной патологии на данный момент широко обсуждается в связи с тем, что, выполняя функцию медиатора адаптации к гипоксии, при чрезмерной активации он усугубляет проявления патологии почек [50].

VEGF участвует в регуляции ангиогенеза и восстановлении кровотока в почечной паренхиме, где синтезируется подоцитами в ответ на усиление образования ангиотензина II [51, 52]. VEGF способствует поддержанию перитубулярного кровотока, осуществляя свой вазодилатирующий эффект путем активации эндотелиальной NO-синтазы [53]. В исследованиях на мышах были идентифицированы 3 изоформы данного фактора в проксимальных тубулярных клетках — VEGF-C62, 129, 184, которые могут экспрессироваться в различных тканях, при этом самый высокий уровень выявляется именно в почечной [54].

В группе пациентов с артериальной гипертензией и поражением почек VEGF может быть обнаружен в моче еще до появления альбумина, также сигнальный белок в моче служит информативным предиктором прогрессирования повреждения почек, что, по мнению ряда исследователей [43, 55], позволяет рассматривать его в качестве перспективного раннего маркера гипоксически-ишемического повреждения почечной паренхимы под действием повышенного ИАД у новорожденных.

В экспериментальных моделях почечной ишемии было выявлено повышение содержания молекул повреждения почек-1 (Kidney Injury Molecule-1, KIM-1), не всегда сопровождавшееся повышением креатинина и азота мочевины [45]. KIM-1 — трансмембранный протеин эпителия проксимальных канальцев. В норме он содержится в почечной ткани в небольшом количестве, а в ответ на ишемию его концентрация быстро повышается уже в первые 12 ч [56]. Содержание KIM-1 используют в качестве предиктора нарушения функции пересаженной почки, а Европейским агентством по лекарственным препаратам (European Medicines Agency, EMA) он включен в список маркеров для выявления медикаментозной нефротоксичности [43]. У детей с тяжелым врожденным гидронефрозом вследствие обструкции мочевых путей выявлено значительное повышение концентрации KIM-1 в моче по сравнению с группой контроля, а через 3 мес после оперативного вмешательства отмечено ее достоверное снижение [44].

Медиаторы воспаления

Ишемическое повреждение почечной паренхимы сопровождается развитием воспалительного процесса с возможным исходом в нефросклероз. Моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) обеспечивает миграцию мононуклеарных клеток в зону ишемии и воспаления, участвует в инициации и прогрессировании тубулоинтерстициального повреждения [5].

Являясь мощным хемокином и активатором клеток системы мононуклеарных фагоцитов, MCP-1 потенцирует секрецию провоспалительных цитокинов, способствует миграции лейкоцитов в инфильтрат, а также обеспечи-

вает пролиферацию гладкомышечных элементов сосудов [57]. Рост числа активированных макрофагов вблизи с канальцевыми эпителиальными клетками приводит к повреждению последних [58]. Активация тубулярных клеток посредством MCP-1 обеспечивает трансдифференцировку их в миофибробласты [59], стимулируя синтез провоспалительных и просклеротических компонентов.

В большинстве случаев при хроническом гломерулонефрите в мочу попадает в основном MCP-1, покинувший тубулярные клетки через апикальную мембрану. Согласно исследованиям, определение мочевой экскреции MCP-1 может быть использовано для мониторинга фиброгенеза в интерстиции почки как при хроническом гломерулонефрите [60], так и при травматическом поражении почек [61].

Заключение

В нашей стране в неонатальной практике отсутствуют единые стандарты диагностики ИАГ и мониторингирования ИАД, своевременного выявления органных дисфункций.

Диагностика СИАГ у новорожденных происходит субъективно, как правило, на основе результатов физикального обследования, что зачастую приводит к недооценке уровня ИАД и развитию тяжелых осложнений. Раннее выявление острого повреждения почечной паренхимы остается сложной задачей из-за морфофункциональных особенностей и высокой чувствительности почек новорожденных к повышению ИАД.

Применение методов молекулярной диагностики открывает большие перспективы в фундаментальной и практической медицине. Важным шагом на пути к повышению точности ранней диагностики, персонализированной терапии и профилактике повреждения почек у новорожденных с СИАГ является поиск оптимальных комбинаций биомаркеров, полно отображающих патологические процессы в почке при различных уровнях ИАД.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Cheatham ML, Malbrain ML, Kirkpatrick A, Sugrue M, Parr M, De Waele J, Balogh Z, Leppäniemi A, Olvera C, Ivatury R, D'Amours S, Wendon J, Hillman K, Wilmer A. Results from the International conference of experts on intra-abdominal hypertension and abdominal compartment syndrome. II. Recommendations. *Intensive Care Medicine*. 2007;33(6):951–962. doi: 10.1007/s00134-007-0592-4
- Kirkpatrick AW, Brenneisen FD, McLean RF, Rapanos T, Boulangier BR. Is clinical examination an accurate indicator of raised intra-abdominal pressure in critically injured patients? *Can J Surg*. 2000;43(3):207–211.
- Ivatury R, Cheatham M, Malbrain M, Sugrue M. Abdominal Compartment Syndrome. *Landes Bioscience, Georgetown*. 2006. P. 295–300.
- Арапова АВ, Карцева ЕВ, Кузнецова ЕВ, Бармотин АВ. Применение ксеноперикарда в абдоминальной хирургии у новорожденных. *Детская хирургия*. 1998;2:13–15. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22056>
- Плохих ДА. Результаты исследования физиологических показателей внутрибрюшного давления у новорожденных детей. *Мать и дитя в Кузбассе*. 2010;2:30–33. URL: <http://www.scienceeducation.ru/ru/article/view?id=22056>
- Грона ВН, Перунский ВП, Весёлый СВ, Споров ГА, Весёлая ВС. Оптимизация лечения врожденных расщелин передней брюшной стенки у детей. *Украинский журнал хирургии*. 2008;1:105–112.
- Меликов АЛ. Коррекция врожденных пороков передней брюшной стенки. Дис. ...канд. мед. наук. СПб. 2005. 134 с.
- Морозов ДА, Филиппов ЮВ, Городков СЮ, Ключев СА. Синдром интраабдоминальной гипертензии. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2011;170(1):97–101.
- Malbrain MLNG. Abdominal pressure in the critically ill. *Curr Opin Crit Care*. 2000;6:17–29. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22056>
- Туктамышев ВС, Кучумов АГ, Няшин ЮИ, Самарцев ВА, Касатова ЕЮ. *Российский журнал биомеханики*. 2013;17(1):22–31.
- Хрипун АИ, Кузнецов НА, Перевезенцев ИЮ, Сатторов ИА, Махуова ГБ. Синдром интраабдоминальной гипертензии. История и современное состояние вопроса. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. 2010;3:374–378.
- Norton JA, Barie PS, Bollinger RR, Chang AE, Lowry S, Mulvihill SJ, Pass HI, Thompson RW. Surgery: basic science and clinical evidence. *New York: Springer*. 2008. P. 2442.
- Emerson H. Intra-abdominal pressures. *Archives of Internal Medicine*. 1911;7(6):754–784. doi: 10.1001/archinte.1911.00060060036002. URL: <http://www.mif-ua.com/archive/article/7377>
- Эсперов БН. Некоторые вопросы внутрибрюшного давления. *Труды Куйбышевского медицинского института*. 1956;6:239–247. URL: <http://www.fesmu.ru/elib/Article.aspx?id=232019>
- Caldwell CB, Ricotta JJ. Changes in visceral blood flow with elevated intraabdominal pressure. *Journal of Surgery Research*. 1987;43:14–20. doi: 10.1016/0022-4804(87)90041-2
- Cullen DJ, Coyle JP, Teplick R, Long MC. Cardiovascular, pulmonary, and renal effects of massively increased intra-abdominal pressure in critically ill patients. *Critical Care Medicine*. 1989;17:118–121. doi: 10.1097/00003246-198902000-00002
- Kron IL, Harman PK, Nolan SP. The measurement of intra-abdominal pressure as a criterion for abdominal re-exploration. *Annals of Surgery*. 1984;199(1):28–30. doi: 10.1097/00000658-198401000-00005
- Cheatham ML, Safcsak K. Intraabdominal pressure: a revised method for measurement. *J Am Coll Surg*. 1998;186:594–595. doi: 10.1016/S1072-7515(98)00122-7
- Malbrain ML, Chiummello D, Pelosi P. Incidence and prognosis of intraabdominal hypertension in a mixed population of critically ill patients: A multiple center epidemiological study. *Crit Care Med*. 2005;33:315–322.
- Deeren D, Dits H, Malbrain MLNG. Correlation between intra-abdominal and intracranial pressure in nontraumatic brain injury. *Intensive Care Med*. 2005;31:1577–1581.
- Goldkrand J, Causey T, Hull E. The changing face of gastroschisis and omphalocele at southeast. *Geor J Matern Fetal Neonatal Med*. 2004;15:331–335.
- Yoshioka H, Aoyama K, Iwamura Y. et al. Two cases of Left-sided gastroschisis: review of the literature. *Pediatr Surg Int*. 2004;20(6):472–473.
- Olisevich M, Alexander F, Khan M, Cotman K. Gastroschisis revisited: role of intraoperative measurement of abdominal pressure. *J Pediatr Surg*. 2005;40(5):789–792.
- Diaz FJ, Fernandez SA, Gotay F. Identification and management of abdominal compartment syndrome in pediatric intensive care unit. *PR Health Sci J*. 2006;25:17–22.
- Doty JM, Saggi BH, Blocher CR, Fakhry I, Gehr T, Sica D, Sugerman HJ. Effects of increased renal parenchymal pressure on renal function. *J Trauma*. 2000;48(5):874–877.
- Ricci Z, Ronco C. Neonatal RIFLE. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(9):2211–2214. doi: 10.1093/ndt/gfn074
- Абакумов ММ, Смоляр АН. Значение синдрома высокого внутрибрюшного давления в хирургической практике. *Хирургия*. 2003;12:66–72.
- Журавлева ОВ, Золотухина ОА. Мочевыделительная система у детей (анатомо-физиологические особенности). Учебное пособие. *Благовещенск*. 2010. С. 28.
- Kooten C, Daha MR, Van Es LA. Tubular epithelial cells: A critical cell type in the regulation of renal inflammatory processes. *Exp Nephrol*. 1999;7(5):429–437. doi: 10.1159/000020622

30. Bloomfield GL, Ridings PC, Blocher CR. A proposed relationship between increased intra-abdominal, intra-thoracic and intracranial pressure. *Crit Care Med.* 1997;25(3):496–503.
31. Kitano Y, Takata M, Sasaki N, Zhang Q, Yamamoto S, Miyasaka K. Influence of increased abdominal pressure on steady-state cardiac performance. *J Appl Physiol.* 1999;86:1651–1656.
32. Зорин ИВ. Механизмы прогрессирования нефропатий. Международная школа по детской нефрологии под эгидой International paediatric nephrology association, european society for paediatric nephrology. *Оренбург.* 2010. С. 347–257.
33. Мальцева ЛД. Кислородный режим и функциональная активность тканей организма при патологии мозга и почек в условиях гипероксии. *Вестник новых медицинских технологий.* 2014;1:3.
34. Игнатова МС. Прогрессирование нефропатий и возможные пути ренопротекции. Сб. материалов III Российского конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». М. 2004. С. 213–218.
35. Глыбочко ПВ, Морозов ДА, Свистунов АА, Морозова ОЛ. Новые возможности диагностики и прогнозирования течения хронического обструктивного пиелонефрита у детей. *Цитокины и воспаление.* 2009;8(3):64–67.
36. Menon D, Board PG. A role for glutathione transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the glutathionylation cycle. *Journal of Biological Chemistry.* 2013;288(36):25769–25779.
37. Prowle JR. Combination of biomarkers for diagnosis of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Renal Failure.* 2015;37(3):408–416. doi: 10.3109/0886022X.2014.1001303
38. McMahon BA, Koyner JL, Murray PT. Urinary glutathione S-transferases in the pathogenesis and diagnostic evaluation of acute kidney injury following cardiac surgery: a critical review. *Curr Opin Crit Care.* 2010;16(6):550–555.
39. Scholten BJ. Urinary Alpha and Pi-Glutathione S-transferases in adult patients with type 1 diabetes. *Nephron Extra.* 2014;4(2):127. doi: 10.1159/000365481
40. Морозов ДА, Морозова ОЛ, Захарова НБ, Лакомова ДЮ. Ранняя диагностика и прогнозирование течения нефросклероза у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом. *Педиатрическая фармакология.* 2012;3(3):112–113.
41. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(7):1301–11.
42. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int.* 2009;75:285–294. doi: 10.1038/ki.2008.499
43. Уразаева ЛИ, Максудова АН. Биомаркеры раннего повреждения почек. *Практическая медицина.* 2014;4:125–130.
44. Wasilewska A, Taranta-Janusz K, Dębek W, Zoch-Zwierz W, Kuroczycka-Saniutycz E. KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2010;26(4):579–586.
45. Sun D, Zhao X, Meng L. Relationship between urinary podocytes and kidney diseases. *Ren Fail.* 2012;34(3):403–407.
46. Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A, Myers BD. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2002;61:1475–1485. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00269.x
47. Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V. The dysregulated podocyte phenotype: A novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:51–61.
48. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Koide H. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci.* 2000;320:112–116. doi: 10.1097/0000441-200008000-00009
49. Su J, Li SJ, Chen ZH, Zeng CH, Zhou H, Li LS, Liu ZH. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte marker. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:167–175. doi: 10.1016/j.diabres.2009.10.022
50. Song M, Songming H. The signaling pathway of hypoxia inducible factor and its role in renal diseases. *J Recept Signal Transduct Res.* 2013;33(6):344–348. doi: 10.3109/10799893.2013.830130
51. Бобкова ИН, Шестакова МВ, Щукина АА. Повреждение подочитов при сахарном диабете. *Сахарный диабет.* 2014;17(3):39–50. doi: 10.14341/DM2014339-50
52. Misra S, Misra KD, Glockner JF. Vascular endothelial growth factor-A, matrix metalloproteinase-1, and macrophage migration inhibition factor changes in the porcine remnant kidney model: Evaluation by MRI. *J Vasc Interv Radiol.* 2010;21(7):1071–1077. doi: 10.1016/j.jvir.2010.01.047
53. Gu JW, Manning RD, Young EJ, Shparago M, Sartin B, Bailey AP. Vascular endothelial growth factor receptor inhibitor enhances dietary salt-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(1):142–148.
54. Wang ZG, Puri TS, Quigg RJ. Characterization of novel VEGF (vascular endothelial growth factor) C splicing isoforms from mouse. *Biochem J.* 2010;428(3):347–354.
55. Нанчикеева МЛ. Ранняя стадия поражения почек у больных гипертоической болезнью: клиническое значение, принципы профилактики. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М. 2010. 44 с.
56. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62:237–244. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x
57. Nishihara K, Masuda S, Shinke H, Ozawa A, Ichimura T, Yonezawa A, et al. Urinary chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemoattractant protein-1) as a tubular injury marker for early detection of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(4):570–582. doi: 10.1016/j.bcp.2012.12.019
58. Böttinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(10):2600–2610.
59. Viedt C, Orth SR. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrol Dial Transplant.* 2002;12:2043–2047.
60. Бобкова ИН, Чеботарёва ИВ, Козловская ЛВ, Варшавский ВА, Голицына ЕП. Определение экскреции с мочой моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1) и трансформирующего фактора роста-β1 (TGF-β1) — неинвазивный метод оценки тубулоинтерстициального фиброза при хроническом гломерулонефрите. *Нефрология.* 2006;10(4):49–55.
61. Bihorac A, Baslanti TO, Cuenca AG, Hobson CE, Ang D, Efron PA, Maier RV, Moore FA, Moldawer LL. Acute kidney injury is associated with early cytokine changes after trauma. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery.* 2013;74(4):1005. doi: 10.1097/TA.0b013e31828586ec

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Морозов Дмитрий Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ детской хирургии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, зав. кафедрой детской хирургии и уроandroлогии ГБОУ «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России
Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 2, **e-mail:** damorozov@list.ru

Морозова Ольга Леонидовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры патофизиологии ГБОУ «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России
Адрес: 119992, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, **e-mail:** morozova_ol@list.ru

Цыпलाков Алексей Александрович, аспирант кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России
Адрес: 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112, **e-mail:** ambu83@mail.ru

Мельникова Юлия Александровна, студентка 6-го курса лечебного факультета ГБОУ «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России
Адрес: 119992, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, **e-mail:** yumka2007@yandex.ru

DOI: 10.15690/vramn568

Р.Ш. Закиров¹, Е.Г. Сорокина¹, О.В. Карасёва², Ж.Б. Семёнова^{1, 2},
С.В. Петричук¹, Л.М. Рошаль^{1, 2}, В.Г. Пинелис¹

¹ Научный центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии ДЗМ,
Москва, Российская Федерация

Функциональное состояние митохондрий лимфоцитов периферической крови при черепно-мозговой травме у детей

Обоснование. Известна важная роль митохондрий в механизмах повреждения и гибели клеток мозга при черепно-мозговой травме (ЧМТ). Однако вопросы взаимоотношений между тяжестью повреждения мозга при ЧМТ и митохондриальной дисфункцией окончательно не решены. **Цель исследования:** определить активность NADH- и сукцинатдегидрогеназ — ключевых ферментов окислительного фосфорилирования митохондрий; содержание аденозинтрифосфата в лимфоцитах при ЧМТ; уровень NO_x и 3-нитротирозина в периферической крови у детей, перенесших травмы различной степени тяжести и имеющих разные исходы ЧМТ. **Материалы и методы:** определение указанных показателей проводилось в динамике до одного месяца, а в отдельных случаях — вплоть до гибели больных. Тяжесть ЧМТ оценивали в баллах по шкале комы Глазго, исход ЧМТ — по шкале исходов Глазго. Детей с ЧМТ на основании клинической оценки разделили на 3 группы — с легкой, тяжелой и с тяжелой ЧМТ и летальным исходом. **Результаты:** исследования показали, что активность дегидрогеназ достоверно снижалась только у больных с тяжелой ЧМТ и неблагоприятным исходом. Наибольшее снижение этих показателей выявлено у больных с летальным исходом. Обнаружена прямая корреляционная зависимость между показателями активности дегидрогеназ и содержанием аденозинтрифосфата в лимфоцитах ($r = 0,97$, $p = 0,005$). Содержание метаболитов NO_x у детей с тяжелой ЧМТ на порядок превышало их уровень у здоровых детей и больных с легкой ЧМТ. Уровень 3-нитротирозина в плазме крови был тем выше, чем тяжелее была ЧМТ. **Заключение.** Обнаруженные при ЧМТ у детей митохондриальная дисфункция, нарушение мозгового энергетического обмена и окислительный стресс могут приводить к повреждению и гибели клеток мозга, а также быть мишенями для адекватной терапии ЧМТ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, дети, нейрон, лимфоцит, митохондрии, аденозинтрифосфат, митохондриальные дегидрогеназы, оксид азота, пероксинитрит, 3-нитротирозин.

(Для цитирования: Закиров Р.Ш., Сорокина Е.Г., Карасёва О.В., Семёнова Ж.Б., Петричук С.В., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г. Функциональное состояние митохондрий лимфоцитов периферической крови при черепно-мозговой травме у детей. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 710–717. Doi: 10.15690/vramn568)

R.S. Zakirov¹, E.G. Sorokina¹, O.V. Karaseva², Zh.B. Semenova^{1, 2}, S.V. Petrichuk¹,
L.M. Roshal^{1, 2}, V.G. Pinelis¹

¹ Scientific Centre of Children Health, Moscow, Russian Federation

² Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology, Moscow, Russian Federation

Peripheral Blood Lymphocytes Mitochondrial Function in Children with Traumatic Brain Injury

Background: It is known that mitochondria play an important role in the mechanisms of brain cells damage and death following traumatic brain injury (TBI). However, the relationship between the severity of brain damage following TBI and mitochondrial dysfunction are not well defined. **Aim:** to study activities of NADH- and succinate dehydrogenases, a key enzyme of mitochondrial oxidative phosphorylation in children with TBI of varying severity and different outcomes; to detect ATP content in lymphocytes; the level of NO_x and 3-nitrotyrosine in serum and plasma. **Methods:** all parameters were determined in the dynamics of one month following TBI, and in some cases up to the death of patients. The severity of TBI was scored by Glasgow Coma Scale (GCS), the outcome of TBI — Glasgow Outcome Scale (GOS). Based on the clinical examination children with TBI were divided into 3 groups: (1) mild TBI; (2) severe TBI and (3) severe TBI with fatal outcome. **Results:** we found that activity of dehydrogenases is significantly reduced only in patients with the poor neurologic outcome. The greatest decrease in these parameters was observed in patients with severe traumatic brain injury and fatal outcome. A direct correlation was found between the indices of dehydrogenases activity and ATP content in lymphocytes ($r = 0.97$, $p = 0.005$). The levels of NO_x metabolites and 3-nitrotyrosine were significantly increased in children with severe TBI. **Conclusion:** obtained results suggest that mitochondrial dysfunction, impaired cerebral energy metabolism and oxidative stress contribute to cell death in the brain and thus represent therapeutic targets for the treatment of TBI.

Keys words: traumatic brain injury, children, neuron, lymphocyte, mitochondria, ATP, mitochondrial dehydrogenase, nitric oxide, peroxynitrite, 3-nitrotyrosine.

(For citation: Zakirov R.S., Sorokina E.G., Karaseva O.V., Semenova Zh.B., Petrichuk S.V., Roshal L.M., Pinelis V.G. Peripheral Blood Lymphocytes Mitochondrial Function in Children with Traumatic Brain Injury. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 710–717. Doi: 10.15690/vramn568)

Обоснование

Черепно-мозговая травма у детей (ЧМТ) — важная проблема здравоохранения, ежегодно затрагивающая жизнь многих тысяч пострадавших, для которых характерны как высокие цифры летальности, так и высокий процент инвалидности, что требует длительного лечения и реабилитации [1–3]. Для ЧМТ характерно первичное повреждение, развивающееся непосредственно в ответ на воздействие механических факторов, которое в течение ближайших минут и часов запускает вторичные множественные деструктивные процессы в нейронах и глияльных клетках, в значительной степени обусловленные развитием гипоксии и усугубляющие тяжесть первичного повреждения мозга [4]. В результате формируется порочный круг, который может стать определяющим в исходе ЧМТ. Механизмы, по которым развивается гипоксическое повреждение мозга, реализуются в результате сложного каскада патофизиологических процессов, включающих, в частности, глутаматную эксайтотоксичность, кальциевую перегрузку нейронов, митохондриальную дисфункцию, избыточную генерацию активных форм кислорода (АФК) и оксида азота (NO_x), конечным исходом которых является гибель клеток путем апоптоза или некроза [5, 6]. Имеются данные, что как при экспериментальных, так и при клинических формах ЧМТ, в том числе у детей, митохондрии повреждаются очень быстро — в течение минут или часов от получения травмы [7–9]. При электронной микроскопии биоптатов мозга больных с тяжелой ЧМТ были обнаружены отек и расширение крист митохондрий, а также потеря целостности их мембран [10]. Последствиями митохондриальной дисфункции при ЧМТ являются оксидативный стресс, нарушение кальциевого гомеостаза, гибель нейронов, метаболические нарушения, выражающиеся, прежде всего, снижением содержания аденозинтрифосфата (АТФ). Имеются данные, что при характерной для ЧМТ гипоксии мозга в митохондриях происходят нарушение процессов сопряжения окисления и синтеза АТФ, повышенное образование в результате этого АФК. Важную роль в процессах окислительного фосфорилирования играют ферменты дыхательной цепи митохондрий, NADH-дегидрогеназа (NADH-Д) и сукцинатдегидрогеназа (СДГ) [11].

Однако связь между тяжестью повреждений мозга при ЧМТ и митохондриальной дисфункцией полностью не установлена.

Цель настоящего исследования состояла в определении активности NADH- и сукцинатдегидрогеназ — ключевых ферментов окислительного фосфорилирования митохондрий; содержания АТФ в лимфоцитах при ЧМТ, а также

изменения уровня NO_x и 3-нитротирозина в периферической крови больных с ЧМТ.

Методы

Дизайн исследования

Проведено неконтролируемое исследование с прерванным временным рядом.

Критерии соответствия

В исследование включены дети с ЧМТ в возрасте от 8 мес до 17 лет. Для объективной оценки тяжести повреждения в работе использовались шкала тяжести травмы (Injury Severity Score, ISS), шкала комы Глазго (ШКГ), а также шкала исходов Глазго (ШИГ). На основании клинической характеристики тяжести больных и в соответствии со шкалами ШКГ и ШИГ больных детей разделили на 3 группы:

- в 1-ю вошел 71 ребенок с легким течением ЧМТ (по шкале ШКГ 14–10, а по шкале ШИГ 5–4);
- во 2-ю — 54 пациента с тяжелым течением (по шкале ШКГ 9–3, а по шкале ШИГ 3–2);
- в 3-ю — 5 больных с летальным исходом (ШИГ 1).

Условия и сроки проведения

Анализировали результаты обследования детей с ЧМТ, госпитализированных в НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы в период с 2012 по 2014 г.

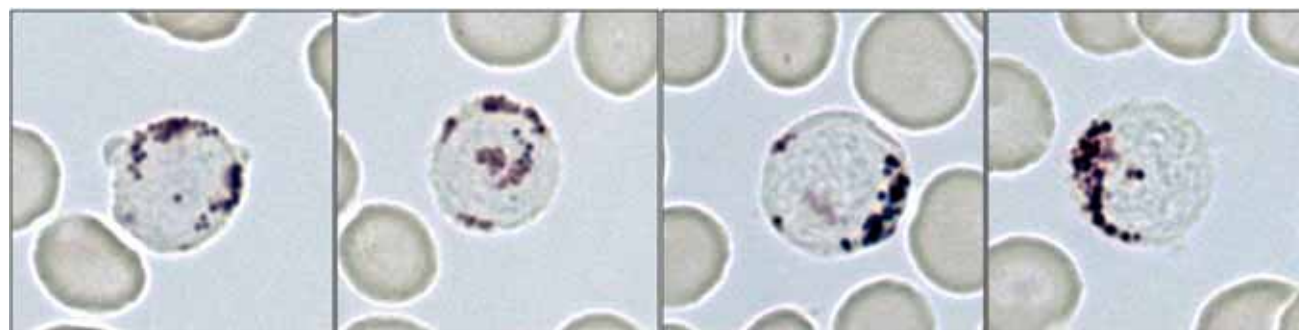
Лабораторное обследование проводилось в динамике ЧМТ от 2 до 7 раз в зависимости от длительности пребывания ребенка в отделении интенсивной терапии. В качестве декретированных сроков лабораторного обследования были выбраны 1–3-и, 4–7-е сут; 1, 2, 3-я нед и 1 мес с момента получения травмы.

Исходы исследования

У 67 пациентов определялась активность митохондриальных дегидрогеназ (NADH-Д, СДГ) в лимфоцитах периферической крови методом количественного цитохимического анализа, основанного на восстановлении р-нитротетразолия фиолетового, выступающего в качестве акцептора протонных пар и электронов от окисляемых субстратов, что обуславливало образование нерастворимых в воде гранул диформазана (рис. 1) [12].

Методы регистрации исходов

Анализ проводился с помощью комплекса аппаратно-программной визуализации морфологических



NADH-дегидрогеназа (EC 1.6.5.1)

Сукцинатдегидрогеназа (EC 1.3.5.1)

Рис. 1. Активность митохондриальных дегидрогеназ, определяемая по интенсивности образования гранул диформазана (окрашенные гранулы) в цитохимической реакции, в лимфоцитах периферической крови на слайдах (оптическое увеличение: $\times 75,6$, $\times 2$; водная иммерсия)

препаратов на основании регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТест Морфология 5.2» (ООО «ВидеоТест», Россия) методом компьютерной цитоморфоденситометрии, что позволяло оценить геометрические (площадь очагов) и оптические характеристики (интегральная оптическая плотность) гранул продукта ферментативной реакции. Полученные в результате анализа изображений показатели ферментативной реакции как среднее по всем обработанным клеткам в полученном образце использовали в качестве параметров, характеризующих уровень активности NADH-Д и СДГ.

Содержание АТФ определялось в лимфоцитах детей с ЧМТ (n =15) различной степени тяжести. Выделение лимфоцитов осуществлялось в градиенте фиколл-гипак плотностью 1,077 по стандартной методике. Экстракцию АТФ проводили в течение 10 мин на льду с помощью 2% трихлоруксусной кислоты с 2 мМ этилендиаминетрауксусной кислоты с последующей нейтрализацией Tris-KOH. Определение уровня АТФ проводили в трис-ацетатном буфере на люминометре Lucy-1 (Anthos-Labtec GmbH, Австрия) с помощью люциферин-люциферазного теста (Promega, США). Концентрацию АТФ выражали в нмоль/мг белка для лимфоцитов. Концентрацию белка в лимфоцитах определяли модифицированным методом Бредфорда с помощью наборов фирмы Fluka (Швейцария).

Содержание NO_x оценивали по изменению содержания его метаболитов — нитритов и нитратов в освобожденной от белка сыворотке крови с помощью набора реактивов компании Calbiochem (США). Метод основан на переводе нитратов в нитриты с помощью нитратредуктазы и определении нитритов по Гриссу (по протоколу фирмы-разработчика). Количественно суммарное содержание нитритов и нитратов оценивали, измеряя оптическую плотность при λ= 530 нм. Полученные значения выражены в мкМ/л сыворотки крови.

Уровень 3-нитротирозина в плазме крови детей с ЧМТ (n=89) определяли иммуоферментным методом с помощью наборов фирмы Nuncult Biotech (США).

Этическая экспертиза

Исследование было одобрено независимым Локальным этическим комитетом Научного центра здоровья детей. От всех родителей детей было получено информированное письменное согласие на участие в исследовании.

Таблица. Клиническая характеристика больных, включенных в исследование

Параметры	Группа с легким течением ЧМТ (1) n =71	Группа с тяжелым течением ЧМТ (2) n =54	Группа с тяжелым течением и летальным исходом (3) n =5	Группа сравнения (4) n =27
Возраст, лет	6 (3–11)	9,5 (7–13)	7 (3–14)	7 (4–14)
Шкала комы Глазго на момент травмы, Ме (25–75%)	11 (10–14)	6,5 (3–9)	3,5 (3–5)	-
Шкала ISS (AIS-ЧМТ: 1–5 баллов), %	(1) — 6,25; (2–3) — 12,5; (4–5) — 81,25	(4–5) — 100	(4–5) — 100	-
Шкала исходов Глазго	4–5	3–2	1	-
Изолированная ЧМТ, %	32	34	0	-
Сочетанная травма с ЧМТ в качестве доминирующего повреждения, %	68	66	100	-
Открытая ЧМТ, %	45	66	60	-

Примечание. ЧМТ — черепно-мозговая травма.

Статистический анализ

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с оценкой их достоверности и результатов корреляционного анализа с помощью компьютерных программ MS Excel 2007 (Microsoft corp., США), Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). Результаты статистического анализа представлены в виде медианы (Me), интерквартильного размаха (IQR: 25–75%, Min-Max: минимум-максимум) или величины средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для проверки статистической гипотезы различий для независимых выборок использовали непараметрические методы: критерий Манна–Уитни — для двух выборок, ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса и медианный тест — для нескольких выборок. Также в работе использовался корреляционный анализ методом множественной пошаговой регрессии.

Результаты

Участники исследования

В ходе работы было обследовано 130 детей с ЧМТ разной степени тяжести и исходов. Клиническая характеристика детей с ЧМТ представлена в табл. Полученные данные сравнивали с показателями 27 условно здоровых детей аналогичного возраста (группа сравнения).

Основные результаты исследования

У детей с легким течением ЧМТ и восстановлением когнитивных функций активность NADH-Д в 1–3-и сут незначительно отличалась от нормативных значений (рис. 2 А). Начиная с 3–7-х сут отмечается статистически значимое снижение активности фермента ($p = 0,016$). В дальнейшем, начиная со 2-й нед посттравматического периода, наблюдалось постепенное увеличение активности фермента. Последнее можно рассматривать как результат постепенного восстановления клеточных функций у этой категории больных, которое направлено на обеспечение субстратами цикла трикарбоновых кислот в митохондриях и сопряжения окислительного фосфорилирования с синтезом АТФ. Высокая активность фермента сохраняется в течение первого месяца ЧМТ у детей с благоприятным исходом. В клинической симптоматике у них отмечалась стойкая положительная динамика с эффективным восстановлением функций мозга. Напротив, у детей с неблагоприятным исходом (тяжелая ЧМТ) начиная с

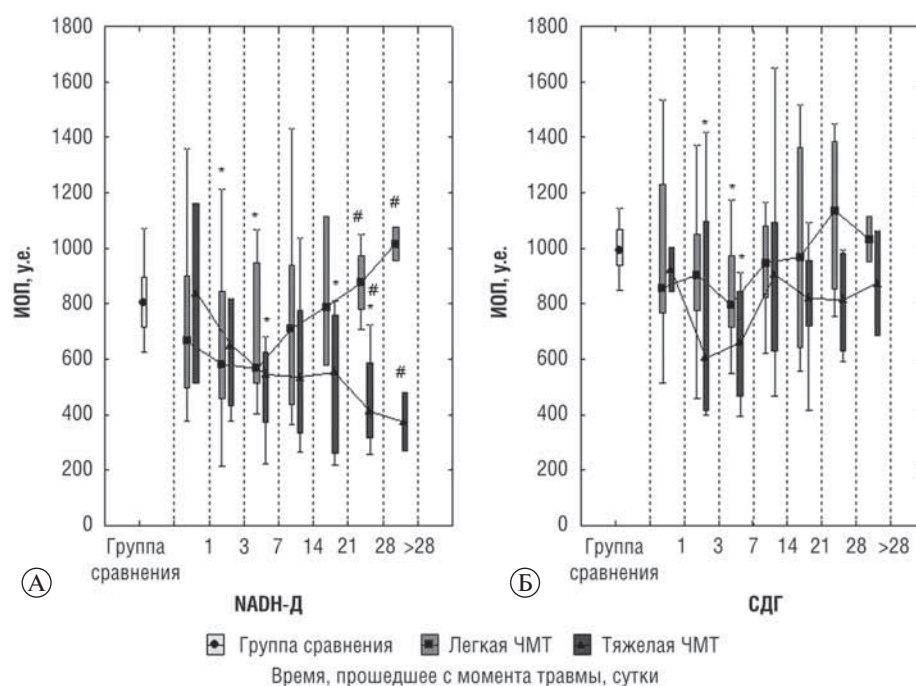


Рис. 2. Динамика интегральной оптической плотности очагов ферментативной реакции NADH-D (А) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (Б) лимфоцитов периферической крови у детей с легкой (ЛЧМТ; $n=51$, ШИГ 4–5) и тяжелой черепно-мозговой травмой (ТЧМТ; $n=11$, ШИГ 2–3)

Примечание. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха (25–75%); * — $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой детей; # — $p < 0,05$ между группами пациентов; ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса/медианный тест. ИОП — интегральная оптическая плотность, ШИГ — шкала исходов Глазго.

7-х сут наблюдалось уменьшение активности NADH-D, которое сохранялось в дальнейшем на протяжении всего посттравматического периода (см. рис. 2 А).

Несколько иная динамика наблюдалась в отношении изменений активности СДГ (рис. 2 Б). У детей с благоприятным течением ЧМТ обнаружено достоверное

снижение активности к 7-м сут после травмы ($p=0,011$). В дальнейшем, по мере выздоровления, активность СДГ повышалась и находилась в пределах величин, полученных у условно здоровых детей. У детей с неблагоприятным течением ЧМТ на 3–7-е сут после травмы выявлено статистически значимое снижение активности СДГ,

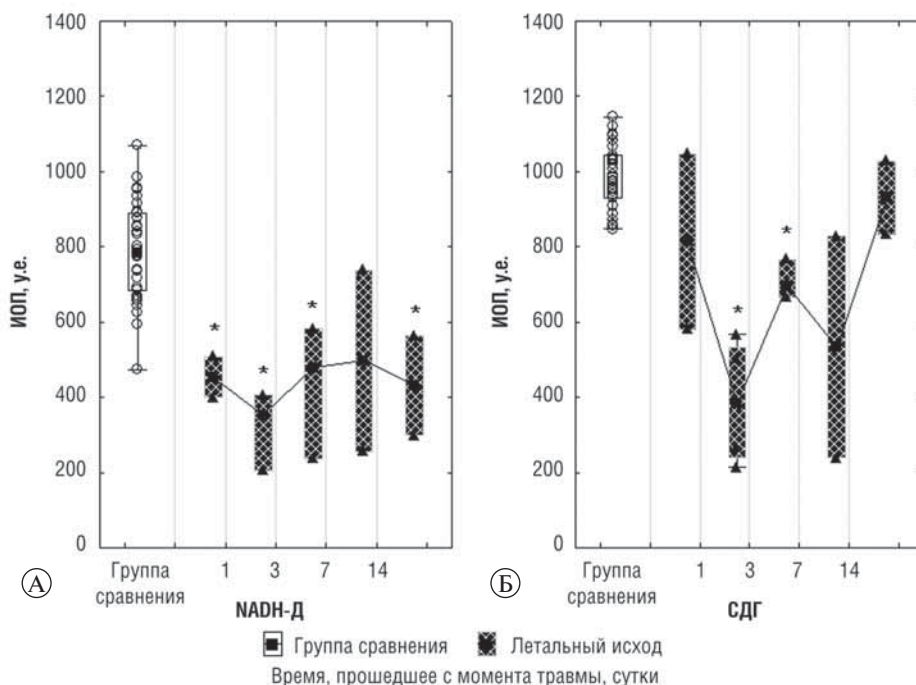
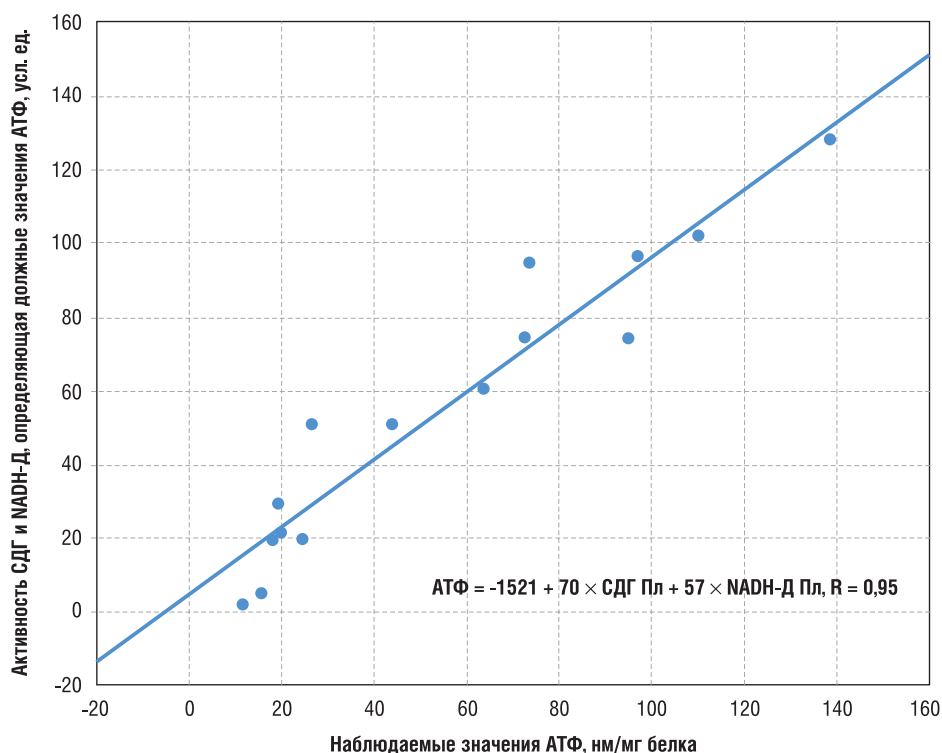


Рис. 3. Динамика интегральной оптической плотности очагов ферментативной реакции NADH-D (А) и СДГ (Б) лимфоцитов периферической крови при ЧМТ у детей с летальным исходом ($n=5$, ШИГ 0)

Примечание. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха (25–75%). * — $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой детей; критерий Манна–Уитни. ИОП — интегральная оптическая плотность, ЧМТ — черепно-мозговая травма, СДГ — сукцинатдегидрогеназа, ШИГ — шкала исходов Глазго.



714

Рис. 4. Корреляционная зависимость между уровнем АТФ и активностью дегидрогеназ (NADH-Д и сукцинатдегидрогеназы, СДГ, определяемая по суммарной площади очагов ферментативной реакции) лимфоцитов у детей с ЧМТ. Использовался метод множественной пошаговой регрессии (коэффициент корреляции $R = 0,95$, коэффициент определения 90%)

что совпадает с клиническим ухудшением (нарастание гемодинамических нарушений, появление синдрома системного воспалительного ответа). В дальнейшем значения активности СДГ повышались и достоверно не отличались от уровня группы сравнения, что, вероятно, связано с включением в схему лечения метаболических препаратов, таргетно воздействующих на СДГ.

Несомненный интерес представляют полученные данные об изменении активности митохондриальных ферментов у больных с тяжелой ЧМТ и летальным исходом. Как видно на рис. 3 А, у этих больных ($n = 5$) актив-

ность NADH-Д была достоверно снижена в течение всего периода наблюдения (2 и более недель), несмотря на проведенную интенсивную метаболическую терапию с момента поступления больных в отделение реанимации. Изменения активности СДГ были менее выражены, а у некоторых пациентов накануне гибели превышали исходный уровень, что обусловлено постоянной инфузией препаратов солей янтарной кислоты (рис. 3 Б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что NADH-Д и СДГ дыхательной цепи митохондрий включаются в патологический процесс, начиная с

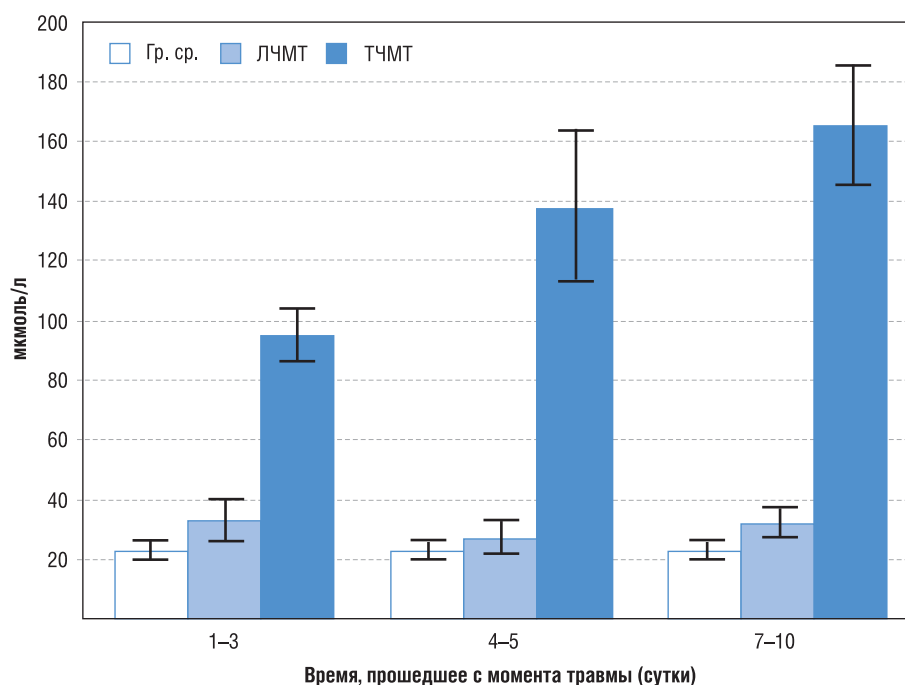


Рис. 5. Уровень оксида азота (NO_x) в сыворотке крови у детей с легкой и тяжелой черепно-мозговой травмой (ЛЧМТ, ТЧМТ). Данные представлены в виде $M \pm m$

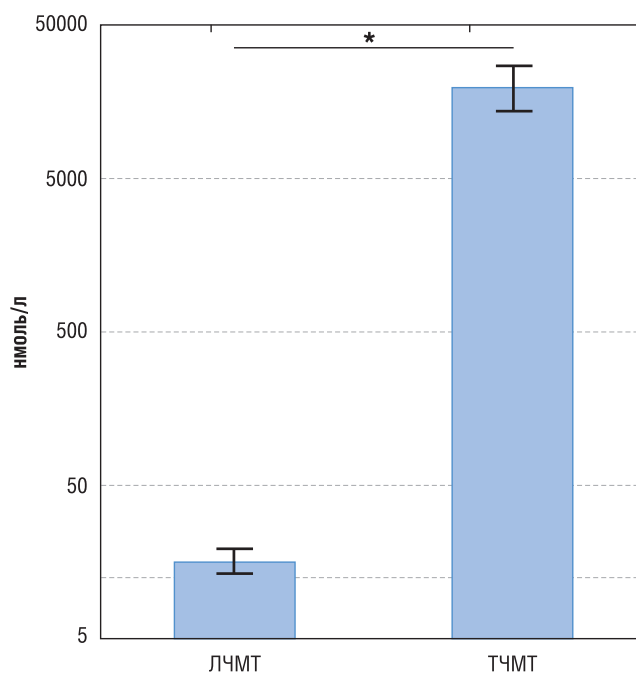


Рис. 6. Концентрация 3-нитротирозина в плазме крови у пациентов с легкой и тяжелой черепно-мозговой травмой (ЛЧМТ и ТЧМТ) в 1–3-и сут

Примечание. По оси ординат данные ($M \pm m$) представлены в логарифмической шкале (основание 5). * — $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

первых суток ЧМТ. Их изменения в определенной мере отражают тяжесть и исход ЧМТ.

Наиболее важным последствием сниженной активности ключевых ферментов I и II комплексов дыхательной цепи митохондрий должны являться изменения в синтезе АТФ, поэтому в настоящей работе мы определили его содержание в лимфоцитах больных с ЧМТ ($n = 15$). Проведенный корреляционный анализ изменений активности митохондриальных ферментов и уровня АТФ в лимфоцитах выявил прямую взаимосвязь этих показателей у больных: чем ниже активность митохондриальных ферментов, тем меньше уровень АТФ (рис. 4).

На рис. 5 представлены данные о содержании оксида азота у детей с ЧМТ. Как видно, у детей с легким течением ЧМТ уровень NO_x в сыворотке крови был несколько выше, чем в контрольной группе, но значительно меньше, чем у детей с тяжелой ЧМТ, у которых уровень метаболитов NO_x в сыворотке крови в десятки раз превышал как их контрольный уровень, так и их содержание при благоприятном исходе ЧМТ. На рис. 6. представлены данные об изменении содержания 3-нитротирозина в плазме крови детей с ЧМТ в 1–3-и сут: содержание продукта было повышено и зависело от тяжести повреждения (чем тяжелее ЧМТ, тем выше уровень 3-нитротирозина).

Обсуждение

Полученные данные представляют несомненный интерес в нескольких направлениях. Прежде всего, наши исследования были проведены на лимфоцитах. Лимфоцит входит в состав так называемой нейроваскулярной единицы (НВЕ) — структурно-функционального комплекса, обеспечивающего работу гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и скоординированную активность нейронов, глии и эндотелия церебральных сосудов. Основные изменения при травматическом повреждении мозга про-

исходят именно на уровне НВЕ [13]. Именно поэтому лимфоцит может служить удобной клеточной моделью для исследования процессов в нейронах головного мозга [14]. Кроме того, установлено, что на плазматической мембране лимфоцитов также имеются глутаматные рецепторы [14, 15], роль которых при ЧМТ чрезвычайно важна, учитывая гипотезу эксайтотоксичности как основного патофизиологического механизма повреждения нейронов при ЧМТ [4].

Во-вторых, нами впервые получены данные о функциональном состоянии митохондрий у детей с ЧМТ, о котором мы судили на основании изменений активности двух важных ферментов электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий лимфоцитов, NADH-Д и СДГ. Мы обнаружили, что у детей с тяжелой ЧМТ активность NADH-Д и СДГ достоверно уменьшена, причем у детей с летальным исходом сниженная активность этих ферментов была наиболее выраженной. Эти данные позволили предположить, что при ЧМТ происходит нарушение работы I и II комплексов ЭТЦ митохондрий лимфоцитов. Действительно, исследования на животных с ЧМТ выявили значимые изменения митохондриальной биоэнергетики, ключевым результатом которой являются нарушения в функционировании I и II комплексов ЭТЦ митохондрий [16]. Показано, что активность митохондриальных дегидрогеназ, в частности NADH-Д и СДГ, регулируется ионами кальция [17], нарушения гомеостаза которого в нейронах при ЧМТ являются определяющими.

Установлено, что глутаматная эксайтотоксичность является основным механизмом повреждения и гибели нейронов при ЧМТ [4]. Проведенные ранее исследования на первичных культурах нейронов показали, что при глутаматной эксайтотоксичности происходит развитие кальциевой дисрегуляции и митохондриальной деполяризации, уменьшается активность I и II комплексов дыхательной цепи, нарушается сопряжение окисления NADH с синтезом АТФ [18], и уровень АТФ в результате этого значительно уменьшается [19]. В настоящей работе у детей с ЧМТ наряду со снижением активности NADH-Д и СДГ мы также обнаружили снижение содержания АТФ в лимфоцитах, причем выявлена прямая корреляционная зависимость между активностью митохондриальных дегидрогеназ и уровнем АТФ.

Многочисленные клинические и экспериментальные исследования показали, что повреждение нейронов при гипоксии/ишемии мозга вследствие ЧМТ связано с развитием патологических реакций, среди которых центральное место занимают избыточное образование АФК и NO_x наряду с нарушениями функционального состояния митохондрий [20].

В настоящей работе у больных с различным течением ЧМТ определялось содержание NO_x и 3-нитротирозина — продукта, образованного в результате модификации белков, вызванного пероксинитритом [21, 22]. Мы показали, что в зависимости от тяжести ЧМТ содержание NO_x в крови этих больных значительно повышается, и, как следствие, быстро образуется высокотоксичный метаболит пероксинитрит, который нитрозилирует тирозиновые остатки различных белков, в результате уровень 3-нитротирозина повышается. Действительно, в настоящей работе мы выявили значительное увеличение содержания 3-нитротирозина, при этом чем более благоприятен был исход ЧМТ, тем более выражено было его увеличение, что совпадает с результатами других наблюдений у взрослых больных с ЧМТ [22, 23]. Необходимо отметить, что, по данным литературы, у здоровых людей 3-нитротирозин в плазме крови не выявляется, что связано с

достаточной активностью антиоксидантных систем [22]. Однако при ишемии мозга, в том числе и при ЧМТ, в плазме крови обнаруживается 3-нитротирозин, что связано с увеличением уровня NO_x , образованием пероксинитрита и снижением активности антиоксидантных систем. Имеются также данные, что пероксинитрит вызывает нитрозилирование таких митохондриальных белков, как NADH- и сукцинатдегидрогеназ, тем самым снижая их активность, что может быть одним из патогенетических факторов повреждения мозга при ЧМТ [22, 23].

Выявленные нарушения функции митохондрий у детей с ЧМТ ведут к открытию во внутренней мембране митохондрий неспецифической поры высокой проводимости (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) [8]. На экспериментальных моделях ЧМТ показано, что ингибитор mPTP циклоспорин А или его аналоги улучшают когнитивные функции у животных, перенесших ЧМТ [24]. Учитывая важную роль глутаматной эксайтотоксичности в механизмах повреждения и гибели нейронов, можно предположить, что при ЧМТ происходит гиперстимуляция глутаматных рецепторов, которая приводит к накоплению в митохондриях нейронов Ca^{2+} , возникновению выраженной митохондриальной деполяризации, нарушениям в I и II комплексах ЭТЦ митохондрий, образованию mPTP и снижению содержания АТФ, в результате чего происходят выброс кальция из митохондрий и развитие высокого Ca^{2+} -плато, усиленное образование АФК и NO_x , появление в цитозоле нейронов цитохрома С и апоптоз-индуцирующего фактора [8, 24]. Все это в конечном счете приводит к гибели нейронов.

Заключение

Обнаруженная при ЧМТ у детей митохондриальная дисфункция в лимфоцитах, выражающаяся снижением активности NADH-Д и СДГ в посттравматический период и, как следствие, уменьшением образования АТФ, может рассматриваться в качестве системного фактора, отражающего нарушения в центральной нервной системе. Полученные данные указывают на то, что обнаруженные изменения активности NADH-Д в 1-е сут свидетельствуют о раннем включении митохондрий в механизмы повреждения нейронов мозга при ЧМТ и определяют тяжесть повреждений и их прогноз. У обследованных больных также было обнаружено увеличенное образование NO_x и 3-нитротирозина, которые также могут приводить к повреждению и гибели клеток мозга, обуславливая неблагоприятный исход ЧМТ. Выявленные нарушения могут быть мишенями для адекватной терапии ЧМТ.

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда: гранты № 12-06-00943 и № 15-06-10952.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие иных явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- Mendes AA, de Souza LF, Walz R, Dafre A. Perspectives on Molecular Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in Traumatic Brain Injury. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–18. doi: 10.1155/2014/723060
- Потапов АА, Рошаль ЛМ, Лихтерман ЛБ, Кравчук АД. Черепно-мозговая травма: проблемы и перспективы. *Вопросы нейрохирургии в институте имени Н.Н. Бурденко*. 2009;2:3–8.
- Валиуллина СА, Семенова ЖБ, Шарова ЕА. Организационно-экономические и управленческие аспекты оказания медицинской помощи детям с черепно-мозговой травмой. *Российский педиатрический журнал*. 2010;26:37–48.
- Algattas H, Huanq JH. Traumatic brain injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post injury. *Int J Mol. Sci*. 2014;15(1):309–341. doi: 10.3390/ijms15010309
- Пинелис ВГ, Сорокина ЕГ. Аутоиммунные механизмы модуляции активности глутаматных рецепторов у детей с эпилепсией и черепно-мозговой травмой. *Вестник РАМН*. 2008;12:44–51.
- Stoica BA, Faden AI. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):3–12. doi: 10.1016/j.nurt.2009.10.023
- Xiong Y, Gu Q, Peterson PL, Muizelaar JP, Lee CP. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 1997;14:23–34. doi: 10.1089/neu.1997.14.23
- Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*. 2005;79(1–2):231–239. doi: 10.1002/jnr.20292
- Robertson CL, Scafidi S, McKenna MC, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of cell death and neuroprotection in pediatric ischemic and traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2009;218(2):371–380. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.04.030
- Balan IS, Saladino AJ, Aarabi B, Castellani RJ, Wade C, Stein DM, Eisenberg HM, Chen HH, Fiskum G. Cellular alterations in human traumatic brain injury: changes in mitochondrial morphology reflect regional levels of injury severity. *J Neurotrauma*. 2013;30(5):367–381. doi: 10.1089/neu.2012.2339
- Vinogradov AD. NADH/NAD⁺ interaction with NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777(7–8):729–734. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.04.014
- Нарциссов РП. Анализ изображения клетки — следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии. *Педиатрия*. 1998;4:101–105.
- Vangilder RL, Rosen CL, Barr TL, Huber JD. Targeting the neurovascular unit for treatment of neurological disorders. *Pharmacol Ther*. 2011;130(3):239–247. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.12.004
- Boldyrev AA, Kazey VI, Leinsoo TA, Mashkina AP, Tyulina OV, Johnson P, Tuneva JO, Chittur S, Carpenter DO. Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(1):133–139. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.019
- Болдырев АА, Брюшкова ЕА, Владыченская ЕА. NMDA-рецепторы в клетках иммунной системы. *Биохимия*. 2012;77(2):160–168.
- Lifshitz J, Friberg H, Neumar RW, Raghupathi R, Welsh FA, Janmey P, Saatman KE, Wieloch T, Grady MS, McIntosh TK. Structural and functional damage sustained by mitochondria after traumatic brain injury in the rat: evidence for differentially sensitive populations in the cortex and hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(2):219–231. doi: 10.1097/00004647-200302000-00009
- Denton RM, Rutter GA, Midgley PJ, McCormack JG. Effects of Ca^{2+} on reactivities of the calcium-sensitive dehydrogenases within the mitochondria of mammalian tissues. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;12(Suppl.5):69–72. doi: 10.1097/00005344-198806125-00012

18. Сурин АМ, Зобова СН, Тухбатова ГР, Сенилова ЯЕ, Пинелис ВГ, Ходоров БИ. Изменения митохондриального NAD(P)H и нарушения кальциевого гомеостаза в культивируемых нейронах мозжечка крысы при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. В сб. материалов международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». М. 2009. С. 157–162.
19. Surin AM, Gorbacheva LR, Savinkova IG, Sharipov RR, Khodrov BI, Pinelis VG. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. *Biochem (Mosc.)*. 2014;79(2):146–152. doi: 10.1134/S0006297914020084
20. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei EZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related compounds. *Nature*. 1993;364:626–632. doi: 10.1038/364626a0
21. Nag S, Picard P, Stewart DJ. Expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine during blood-brain barrier breakdown and repair after cold injury. *Lab Invest*. 2001;81(1):41–49. doi: 10.1038/labinvest.3780210
22. Bayir H, Kagan VE, Clark RS, Janesko-Feldman K, Rafikov R, Huang Z, Zhang X, Vagni V, Billiar TR, Kochanek PM. Neuronal NOS mediated nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in brain after experimental and human brain injury. *J Neurochem*. 2007;101(1):168–181. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04353.x
23. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1658(1–2):44–49. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.03.016
24. Readnower RD, Pandya JD, McEwen ML, Pauly JR, Springer JE, Sullivan PG. Post injury administration of the mitochondrial permeability transition pore inhibitor, NIM811, is neuroprotective and improves cognition after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2011;28(9):1845–1853. doi: 10.1089/neu.2011.1755

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Закиров Рустам Шакирович, врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20,

e-mail: cytochemistry@gmail.com

Сорокина Елена Геннадьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: sorokelena@mail.ru

Карасёва Ольга Витальевна, доктор медицинских наук, заместитель директора по науке, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии-реанимации ГУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ

Адрес: 119180, Москва, ул. Б. Полянка, д. 20, тел.: +7 (495) 959-19-72, e-mail: karaseva.o@list.ru

Семёнова Жанна Борисовна, доктор медицинских наук, руководитель отдела нейрохирургии и нейротравмы ГУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ

Адрес: 119180, Москва, ул. Б. Полянка, д. 20, тел.: +7 (495) 959-19-72, e-mail: jseman@mail.ru

Петричук Светлана Валентиновна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии и экспериментальной вирусологии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: cito@list.ru

Рошаль Леонид Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, президент ГУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» ДЗМ

Адрес: 119180, Москва, ул. Б. Полянка, д. 20, тел.: +7 (495) 959-19-72, e-mail: lmroshal@mail.ru

Пинелис Всеволод Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: pinelis@mail.ru

DOI: 10.15690/vramn570

В.М. Смирнов¹, Д.С. Свешников², И.Л. Мясников², Т.Е. Кузнецова¹, Ю.Н. Самко¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Доказательства наличия серотонинергических нервных волокон, усиливающих сокращения двенадцатиперстной кишки

Обзор посвящен анализу механизма усиления сокращений двенадцатиперстной кишки (ДПК) симпатическим нервом. Авторы обзора установили, что раздражение симпатического ствола в грудной полости у собак в большинстве случаев вызывает не ослабление, а усиление сокращений ДПК. Блокада 5HT-рецепторов промедолом и лизерголом предотвращает развитие стимуляторного эффекта. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что в составе симпатического ствола имеются серотонинергические нервные волокна, которых, согласно гистохимическим и физиологическим исследованиям, в несколько раз больше, чем адренергических, а их раздражение ведет к усилению сокращений ДПК. Серотонинергический нерв, как и симпатический, — понятие собирательное: это симпатические стволы, их разветвления и веточки, иннервирующие внутренние органы. Промедол блокирует серотонинергические нервы, это, очевидно, является причиной развития запоров у пациентов после хирургического лечения и с применением данного препарата.

Ключевые слова: серотонинергический нерв, двенадцатиперстная кишка, моторика, регуляция.

(Для цитирования: Смирнов В.М., Свешников Д.С., Мясников И.Л., Кузнецова Т.Е., Самко Ю.Н. Доказательства наличия серотонинергических нервных волокон, усиливающих сокращения двенадцатиперстной кишки. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 718–726. Doi: 10.15690/vramn570)

718

Введение

Известно, что симпатический нерв оказывает тормозное влияние на моторику желудочно-кишечного тракта, что подробно описано в учебной литературе [1–3], однако раздражение симпатического нерва может вызывать и усиление сокращений желудка и кишечника [4].

Результаты наших ранних исследований [4] показали, что раздражение периферического отрезка симпатического ствола (СС; большой чревный нерв) средней интенсивности в грудной полости у собак (10 В, 20–30 Гц, 2 мс) вызывает двойкий эффект: у 10 из 19 животных возникали тормозные, а у 9/19 — стимуляторные реакции двенадцатиперстной кишки (ДПК). Слабые раздражения (0,5–3 В, 10 Гц, 0,1–0,5 мс), которые применяли

у 10 других животных, как правило (8 опытов), вызывали угнетение и значительно реже (2 опыта) — усиление сокращений кишки.

В 83 случаях при раздражении СС средней интенсивности тормозные реакции наблюдались в 28, стимуляторные — в 30 наблюдениях; в 25 пробах реакции кишки отсутствовали, что, с нашей точки зрения, свидетельствует о равной степени активности возбуждающих и тормозящих механизмов. При слабых раздражениях (37 случаев) зарегистрировано 25 тормозных, 4 стимуляторных реакций; в 8 случаях реакция отсутствовала.

Хорошая перистальтика кишки способствовала развитию тормозных, слабая — стимуляторных реакций исследуемого органа. Мы полагаем, что в составе СС имеются не только тормозящие симпатические волокна

V.M. Smirnov¹, D.S. Sveshnikov², I.L. Myasnikov², T.E. Kuznetsova¹, Yu.N. Samko¹

¹ The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Evidences of Existence of Serotonergic Nerves, Enhancing Duodenal Motility

The review is devoted to the mechanism of duodenal motility activation caused by sympathetic nerves. The authors have found that stimulation of the sympathetic trunk in the thoracic cavity in dogs in most cases provide not inhibitory but excitatory motor responses of the duodenum. Excitatory effects were eliminated during 5HT-receptors blockade by promedol and lysergol. Analysis of publications showed that sympathetic trunk contains serotonergic fibers, providing excitatory motor responses of the duodenum to electrical nerve stimulation. According to histochemical and physiological studies, amount of serotonergic fibers in the sympathetic trunk is several times more than the adrenergic. This means that the body has serotonergic nerves. Serotonergic nerve as well as the sympathetic is a collective notion. There are: sympathetic trunks, their ramifications and branches that innervate the internal organs. Since promedol blocks serotonergic nerves, this is plausible cause of constipation in patients after surgical treatment along with the application of this drug.

Key words: serotonergic nerve, duodenum, motility, regulation.

(For citation: Smirnov V.M., Sveshnikov D.S., Myasnikov I.L., Kuznetsova T.E., Samko Y.N. Evidences of Existence of Serotonergic Nerves, Enhancing Duodenal Motility. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 718–726. Doi: 10.15690/vramn570)

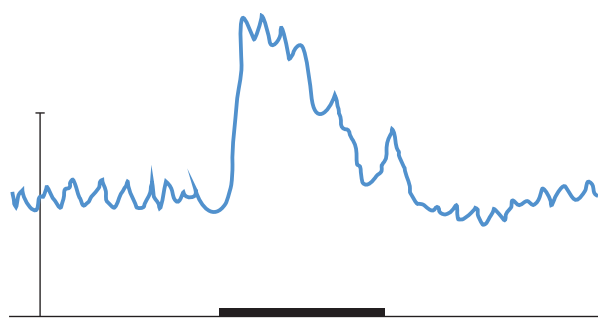


Рис. 1. Реакция двенадцатиперстной кишки на раздражение симпатического ствола 10 В, 20 Гц, 1,5 мс

Примечание. На фрагменте — запись давления в полости кишки и нулевая линия с отметкой раздражения (жирная ее часть, 30 с). Шкала давления — 20 мм рт.ст.

(их возбудимость, по-видимому, выше), но и волокна, стимулирующие сокращения кишки (их возбудимость, очевидно, ниже) [4].

Различная степень выраженности возбудимости тормозящих и стимулирующих нервных элементов доказывается тем, что при более слабых раздражениях нерва сокращения кишки угнетаются, а при более интенсивных — усиливаются. Далее мы выяснили, что блокада симпатической нервной системы орнидом (Ornidum), препятствующим высвобождению катехоламинов, напротив, способствует развитию стимуляторного эффекта, который выявлялся при раздражении СС средней интенсивности у 15 из 19 собак.

Результаты опытов свидетельствуют и о том, что постганглионарные симпатические волокна не участвуют в реализации усиления сокращений кишки, возникающих при раздражении СС [4].

Кроме того, показано, что раздражение СС в условиях выключения N-холинорецепторов вегетативных ганглиев бензогексонием, диколином, димеколином или арфонадом (вводимыми совместно или порознь) также вызывало стимуляторные эффекты (рис. 1). Надежность блокады N-холинорецепторов проверяли по исчезновению стимулирующего влияния блуждающего нерва на деятельность кишки, возникающего обычно до инъекции ганглиоблокаторов.

Опыты на 13 собаках с применением блокаторов никотинового ацетилхолинового рецептора свидетельствуют о том, что N-холинорецепторы нейронов вегетативных ганглиев не участвуют в реализации стимуляторного эффекта. Однако природа стимулирующих сокращения кишки нейронов не ясна. Мы предположили, что в этих опытах раздражение СС стимулирует деятельность кишки с помощью серотонина. В экспериментах было обнаружено, что раздражения СС в условиях двусторонней ваготомии на фоне совместного действия бензогексония/его аналогов и орнида вызывали усиление сокращений кишки, а такие же раздражения после дополнительного введения блока-

тора М-холинорецепторов и М-серотонинорецепторов вегетативных ганглиев (атропин, 10 собак) или блокатора Д-серотонинорецепторов гладких мышц (дипразин) изменением деятельности кишки не сопровождалось. В большом чревном нерве (в грудном его отделе) нами обнаружен серотонин, содержание которого, определяемое по методике Г.Ф. Оксенкруга [5], составило $3,19 \pm 0,006$ мкг на 1 г ткани, что так же косвенно подтверждает нашу гипотезу.

Таким образом, установлен следующий феномен: раздражение симпатического ствола в грудной полости у собак в большинстве случаев вызывает не торможение, а усиление сокращений ДПК. Полученные данные свидетельствуют о наличии в грудном отделе СС нехолинергических и неадренергических нервных волокон, оказывающих стимулирующее влияние на сокращения гладких мышц ДПК. На основании этих результатов авторы полагают, что медиатором таких волокон служит серотонин. Волокна являются преганглионарными, они синаптически связаны с серотонинергическими нейронами вегетативных ганглиев.

Следует, однако, заметить, что используемые на ранних этапах наших исследований препараты являлись недостаточно селективными. Это было учтено в дальнейших экспериментах.

Реакции двенадцатиперстной кишки на раздражение симпатического ствола различной силы

Выше отмечалось [4], что от силы раздражения нерва зависит не только степень выраженности ответной реакции органа, но и ее направленность (угнетение или усиление). Для выяснения причины подобных ответов изучено 155 реакций ДПК (опыты выполнены на 31 собаке) на раздражение СС в грудной полости (20 Гц, 1–15 В) без применения каких-либо фармакологических препаратов, кроме наркоза. Эффекты раздражения, которые действительно зависели от силы стимула, были распределены в 3 группы (табл. 1) [6].

Из табл. 1 видно, что с увеличением силы раздражения СС возрастает процент животных, у которых возникают стимуляторные (до 55%) и тормозные (до 39%) реакции, но уменьшается число животных (до 6%), у которых реакции отсутствуют.

Исследования [6] показали, что усиление сокращений ДПК, возникающее при раздражении СС в грудной полости носит не случайный, как считалось ранее, а закономерный характер, причем стимуляторные реакции доминируют над тормозными. Направленность ответных реакций, зарегистрированных у 8 животных, имела свои особенности (рис. 2): они начинались со слабоявленного торможения, которое быстро сменялось мощным усилением сокращений, о чем свидетельствовало быстрое

Таблица 1. Частота встречаемости различных реакций двенадцатиперстной кишки на раздражение симпатического ствола в грудной полости импульсами различной интенсивности частотой 20 Гц (без применения фармакологических препаратов)

Характер ответа	Число животных с однотипной реакцией (%)				
	Амплитуда раздражающих импульсов				
	1 В	3 В	5 В	10 В	15 В
Стимуляторные реакции	1 (3)	2 (7)	9 (29)	15 (48)	17 (55)
Тормозные реакции	4 (13)	9 (29)	9 (29)	12 (39)	12 (39)
Отсутствие реакций	26 (84)	20 (64)	13 (42)	4 (13)	2 (7)
Всего изучено 155 реакций (31 животное)					

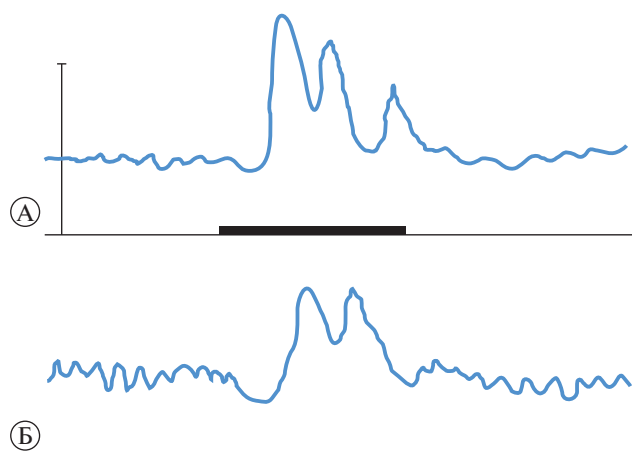


Рис. 2. Стимуляторные реакции двенадцатиперстной кишки (ДПК) собаки на многократные повторные раздражения симпатического ствола (10 В, 20 Гц): А — в начале опыта, Б — через 6 ч от начала опыта

Примечание. На каждом фрагменте показаны давление в полости ДПК и нулевая линия с отметкой раздражения (жирная ее часть, 30 с). Шкала давления — 20 мм рт.ст.

нарастание внутриполостного давления. В целом, по результатам 155 реакций, полученных у 31 животного, латентный период тормозных и стимуляторных реакций составлял $2 \pm 1,5$ с. Реакции сопровождались последствием (постепенное исчезновение стимуляторного эффекта) продолжительностью $12 \pm 4,3$ с.

Необходимо особо подчеркнуть, что стимуляторные эффекты отличаются стойкостью: об этом свидетельствуют не только результаты всех серий экспериментов (средняя продолжительность которых с периодическим раздражением нерва составляла 3–3,5 ч), но и результаты специальных опытов, устойчивость эффекта в которых наблюдалась на протяжении 6–8 ч (рис. 2Б).

Кроме того, мы [6, 7] подтвердили, что частота встречаемости стимуляторных реакций и степень их выраженности подчиняются закону силы. Так, при раздражении 1 В и 3 В (20 Гц) существенных изменений двигательной активности кишки не отмечалось.

Однако при стимуле 5 В, 20 Гц гидростатическое давление в полости кишки возрастало с $11,2 \pm 2,3$ до $14,3 \pm 0,8$ ($+27\%$; $p < 0,05$).

При раздражении 10 В с частотой 20 Гц давление возрастало с $11,5 \pm 2,7$ до $17,4 \pm 2,5$ мм рт.ст., прирост $5,9 \pm 1,0$ мм рт.ст. ($+51\%$; $p < 0,05$). Раздражение 15 В, 20 Гц вызывало примерно такие же эффекты, как и применение стимула 10 В.

Результаты этих исследований свидетельствуют также и о том, что возбудимость нервных волокон, усиливающих сокращения ДПК, действительно, ниже возбудимости тормозящих симпатических (адренергических) волокон. Это доказывается тем, что с увеличением силы

раздражения нерва процент стимуляторных реакций кишки возрастает значительно больше, чем тормозных (см. табл. 1). Вследствие того, что при применении в экспериментах раздражающего стимула амплитудой 10 В процент тормозных и стимуляторных реакций различался незначительно, была предпринята попытка исследования реакций ДПК импульсами 10 В с изменяющимися параметрами частоты (от 1 до 10 Гц).

Реакции двенадцатиперстной кишки на раздражение симпатического ствола различной частоты

Исследования выполнены на 12 животных в отдельной серии (табл. 2).

Как видно из табл. 2, с увеличением частоты раздражения от 1 до 10 Гц при одной и той же интенсивности (10 В) в прямоугольных электрических импульсах частота встречаемости стимуляторных реакций возрастает и достигает максимума (84%) уже при частоте раздражения 3 Гц. Число тормозных реакций при различных частотах раздражения было одинаковым и составляло $\sim 16\%$, а при частоте 20 Гц — еще меньше (рис. 3). Следует отметить, что в общей группе животных ($n = 31$) при частоте раздражения 20 Гц максимальная частота встречаемости стимуляторных реакций составляла 55%, что значительно ниже, чем при частоте раздражения в пределах 3–10 Гц. Данная частота импульсации ближе к естественной. Результаты этой серии опытов [6, 7] свидетельствуют о том, что возникновение стимуляторного эффекта мало зависит от частоты раздражения нерва и подчиняется закону силы, поскольку увеличение частоты раздражения при одной и той же силе раздражающих стимулов равноценно также и увеличению интенсивности раздражения.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о более низкой возбудимости нервных волокон СС, усиливающих сокращения кишки (по сравнению с тормозными адренергическими волокнами): с увеличением частоты раздражающих стимулов (при неизменной их силе) интенсивность раздражения возрастает, возрастает также и процент стимуляторных реакций, в то время как процент тормозных реакций остается неизменным. Что касается степени выраженности ответных реакций на раздражение 10 В с частотой импульсов 1 и 3 Гц, то различия в изменении давления не были достоверны из-за большого разброса данных, а на частотах 7 и 10 Гц различия выявлены с высокой степенью достоверности. Гидростатическое давление в полости кишки при раздражении 10 В частотой 10 Гц возрастало с $13 \pm 1,5$ до $17,3 \pm 2,8$ мм рт.ст. ($+33\%$; $p < 0,01$), при раздражении 10 В частотой 7 Гц — с $11,9 \pm 1,6$ до $17,8 \pm 2,6$ мм рт.ст. ($+49\%$; $p < 0,01$), при раздражении 10 В с частотой 20 Гц — с $11,5 \pm 1,9$ до $18,4 \pm 2,5$ мм рт.ст. ($+60\%$; $p < 0,01$). Этот показатель также свидетельствует о

Таблица 2. Частота встречаемости различных реакций двенадцатиперстной кишки на раздражения симпатического ствола в грудной полости у собак импульсами 10 В, частотой 1–10 Гц (без применения фармакологических препаратов)

Характер ответа	Число животных с однотипной реакцией (%)			
	Частота раздражения нерва и реакции кишки			
	1 Гц	3 Гц	7 Гц	10 Гц
Стимуляторные реакции	5 (42)	10 (84)	9 (76)	10 (84)
Тормозные реакции	2 (16)	2 (16)	2 (16)	2 (16)
Отсутствие реакций	5 (42)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
Всего изучено 80 реакций (12 животных)				

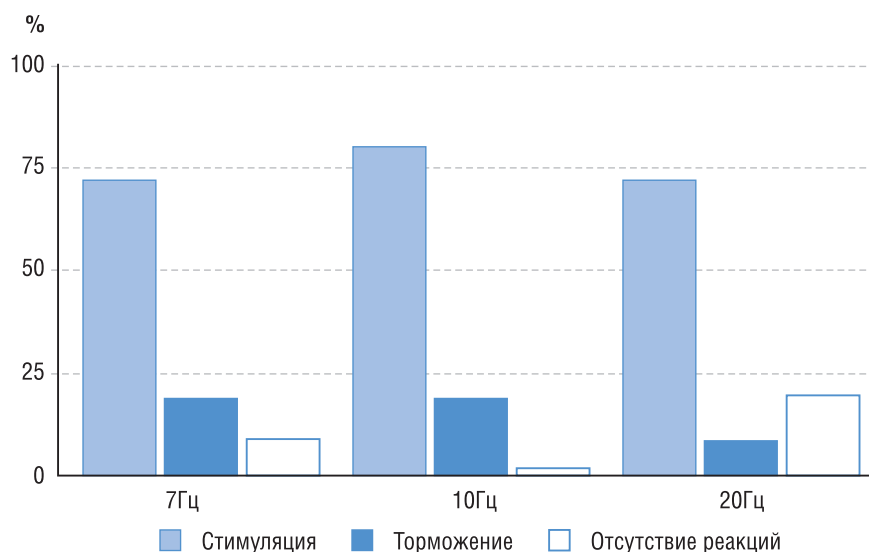


Рис. 3. Частота встречаемости различных реакций двенадцатиперстной кишки у интактных животных на раздражение симпатического ствола импульсами 10 В различной частоты

более низкой возбудимости нервных волокон симпатического нерва, стимулирующих сокращения ДПК.

Описанный ранее в литературе как нестабильный стимуляторный феномен, возникающий при раздражении симпатического нерва [8], в действительности — закономерное, легко воспроизводимое явление, причем стимуляторные реакции значительно преобладают по частоте встречаемости над тормозными [4, 6, 7]. Различная частота встречаемости стимуляторного эффекта и степень его выраженности в разных сериях опытов может зависеть от многих факторов: глубины наркоза, возможной гипотермии, состояния раздражаемого нерва, параметров его раздражения, различного числа животных в серии [9].

Следует отметить, что мы, в отличие от других экспериментаторов, раздражали симпатический нерв не в брюшной полости, где он содержит примесь парасимпатических волокон блуждающего нерва, а в грудной полости, где, согласно данным литературы [10] и собственным наблюдениям, не содержатся парасимпатические волокна блуждающего нерва, которые могли бы вызвать усиление сокращения кишки (именно поэтому мы раздражали нерв в грудной полости). В наших опытах при раздражении СС исключалось рефлекторное усиление сокращений кишки с помощью блуждающих нервов, т.к. они были перерезаны. Выявленность стимуляторных реакций как до, так и после перерезки блуждающих нервов была одинаковой, что соответствует полученным ранее данным [4]. А блокада N-холинорецепторов вегетативных ганглиев не только не препятствовала, а, напротив, способствовала выявлению стимуляторного эффекта ДПК при раздражении СС в грудной полости [4].

Таблица 3. Частота встречаемости стимуляторных реакций двенадцатиперстной кишки у собак при раздражении симпатического ствола импульсами различной интенсивности частотой 10 Гц в условиях блокады адренергических механизмов

Условия эксперимента (число животных)	Число животных (%), у которых наблюдался стимуляторный эффект при данной силе раздражения				
	Амплитуда раздражающих импульсов				
	1 В	3 В	5 В	10 В	15 В
Интактные (n =12)	-	-	-	10 (84)	-
На фоне действия орнида (n =13)	2 (15)	1 (8)	7 (54)	11 (84)	13 (100)
На фоне действия фентоламина и пропранолола (n =7)	-	3 (43)	5 (71)	7 (100)	7 (100)

Симпатические нервы препятствуют развитию стимуляторного эффекта двенадцатиперстной кишки

721

В этом мы убедились при постановке опытов с блокадой α - и β -адренорецепторов [6, 7, 11].

Эксперименты с блокаторами α - и β -адренорецепторов фентоламином и пропранололом выполнили на 7 собаках (35 реакций ДПК). Полученные результаты распределены в три группы (стимуляторные, тормозные, отсутствие реакций).

В опытах при усилении раздражения СС наблюдался прирост числа стимуляторных ответов, причем их частота сильно возрастала и при слабых раздражениях нерва на фоне совместного действия фентоламина и пропранолола. А при раздражении 10 В в условиях блокады α - и β -адренорецепторов стимуляторный эффект регистрировался у 100% животных! При импульсах 10 В частотой 20 Гц на фоне действия адреноблокаторов давление в полости кишки возрастало с $10,2 \pm 3,8$ до $23,4 \pm 3$ мм рт.ст. (+123% (!); $p < 0,01$).

Раздражение 15 В, 20 Гц вызывало возрастание гидростатического давления с $10,19 \pm 3,9$ до $24,5 \pm 8,36$ мм рт.ст. (+140% (!); $p < 0,05$). Результаты реакций ДПК на раздражение СС с разными эффектами представлены на рис. 4.

Подробнее результаты этой серии представлены в табл. 3.

Таким образом, блокада α - и β -адренорецепторов не только не препятствует, а, напротив, способствует возникновению стимуляторных реакций ДПК на раздражение СС.

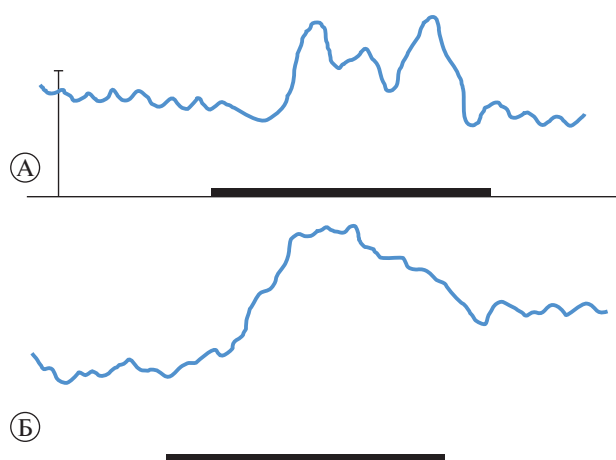


Рис. 4. Реакции двенадцатиперстной кишки на раздражение симпатического ствола (10 В, 20 Гц) в различных условиях

Примечание. А — до введения фармакологических препаратов, Б — на фоне совместного действия α - и β -адреноблокаторов фентоламина и пропранолола. На каждом фрагменте показаны давление в полости кишки и нулевая линия с отметкой раздражения (жирная ее часть, 30 с). Шкала давления — 20 мм рт.ст. для всех фрагментов.

722

Катехоламины не участвуют в реализации стимуляторных эффектов двенадцатиперстной кишки

К подобному заключению мы пришли на основании результатов экспериментов с симпатолитиком орнидом (рис. 5). Механизм действия орнида, как известно, заключается в ингибировании высвобождения катехоламинов симпатическими терминалями. Установлено [12], что применение орнида в дозе 20–30 мг/кг устраняет симпатические эффекты на сердце, возникающие при раздражении звездчатого ганглия [12]. Основываясь на этом факте, мы [6, 11, 12] поставили серию экспериментов на 13 животных, в которых изучили 65 реакций ДПК на раздражение СС на фоне действия орнида в дозе 20 мг/кг.

Параметры раздражения использовали те же, что и в предыдущей серии (10 В, 7–20 Гц), на том основании, что при данных значениях амплитуды и частоты раздражающего стимула были выявлены реакции с максимальным приростом гидростатического давления. Все реакции ДПК распределились следующим образом: стимуляторные отмечены при 34 раздражениях, ответ отсутствовал в 31 пробе, реакции торможения моторной активности вообще не отмечались, что стало следствием фармакологической блокады тормозных симпатических (адренергических) нервных волокон.

В опытах с орнидом, ингибирующим выброс катехоламинов симпатическими нервными окончаниями, отмечается увеличение частоты встречаемости стимуляторного феномена у животных до 100% случаев при раздражении импульсами тока 15 В. Более подробно результаты этих исследований см. в табл. 3. Частота встречаемости стимуляторного эффекта при раздражении СС 5–10 В в условиях действия орнида была ниже, чем при действии α - и β -блокаторов, потому, что орнид, по-видимому, не полностью блокировал высвобождение норадреналина симпатическими окончаниями (частично сохранялось тормозное влияние норадреналина на кишку).

Степень выраженности стимуляторных эффектов кишки на раздражение СС в условиях блокады адренергических механизмов представлена в табл. 4.

Таблица 4. Прирост гидростатического давления в полости двенадцатиперстной кишки (в мм рт.ст.) в ответ на раздражение симпатического ствола в условиях блокады адренергических механизмов

Условия опыта (число животных)	Параметры раздражения и ответные реакции (%)	
	10 В, 20 Гц	15 В, 20 Гц
Интakтные животные (n=20)	5,9±1,0 (+51)	6±3,1 (+52)
На фоне действия орнида (n=13)	5,9±1,4 (+70)	6,7±2,9 (+82)
На фоне совместного действия фентоламина и пропранолола (n=7)	13,2±2,8 (+123)	14,3±2,5 (+140)

Полученные нами результаты [6, 7, 11] исключают предположение об участии катехоламинов и, соответственно, α - и β -адренорецепторов в реализации стимуляторных влияний СС на ДПК. Эти данные исключают также гипотезу некоторых авторов [8] о возможном переходе возбуждения с преганглионарных симпатических нервных волокон на нейроны иной природы, в частности на холинергические, стимулирующие моторику кишки. Это доказывается тем, что ганглиоблокаторы (антагонисты N-холинорецепторов) вегетативных ганглиев не только не устраняют стимуляторного эффекта СС, а, напротив, способствуют его возникновению, что позже было подтверждено и нами [4]. Результаты собственных исследований и данные литературы позволяют также исключить и парасимпатический путь в реализации изучаемого феномена, поскольку в опытах раздражали СС, не содержащий примеси парасимпатических волокон блуждающего нерва. Кроме того, исключалось и рефлекторное усиление сокращений кишки посредством блуждающих нервов, поскольку в опыте они перерезались.

Перечисленные выше результаты, с нашей точки зрения, убедительно свидетельствуют о том, что в составе СС имеются нехолинергические и неадренергические нервные волокна, усиливающие сокращения ДПК, при этом влияние на кишку гораздо более выражено в сравнении с тормозным влиянием адренергических нервных волокон.

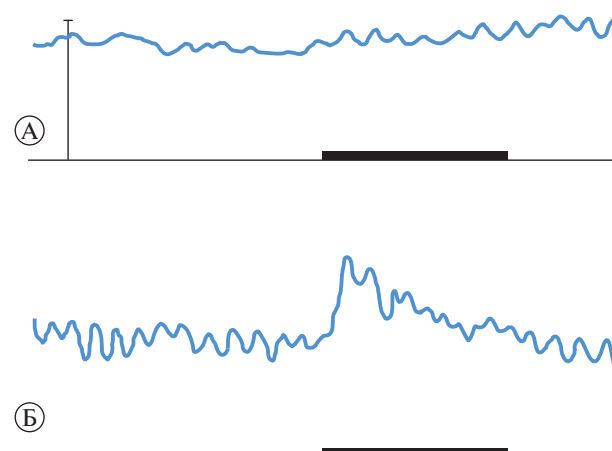


Рис. 5. Реакции двенадцатиперстной кишки собаки на раздражение симпатического ствола (10 В, 20 Гц) в различных условиях

Примечание. А — до введения фармакологических препаратов, Б — на фоне действия симпатолитика орнида. На каждом фрагменте показаны давление в полости кишки и нулевая линия с отметкой раздражения (жирная ее часть, 30 с). Шкала давления — 10 мм рт.ст.

Исследование природы нервных волокон, с помощью которых реализуется стимуляторный эффект, проводили в сериях экспериментов [6, 7] с промедолом и лизерголом, основываясь на серотонинергической гипотезе о механизме осуществления данного феномена [4].

Стимуляторный эффект двенадцатиперстной кишки осуществляется с помощью серотонинергических нервных волокон

Это установлено в исследованиях с лизерголом — блокаторм 5НТ-рецепторов, локализующихся преимущественно на гладких мышцах [7, 13, 14]. В экспериментах обнаружили, что усиление сокращений ДПК на раздражения СС устраняется лизерголом (1 мг/кг) практически полностью. На фоне лизергола число стимуляторных ответов ДПК на раздражения нерва уменьшилось более чем в 3 раза, а степень выраженности оставшихся стимуляторных реакций была незначительной. Так, при раздражении 5 В, 10 Гц только у одного животного (14%) зарегистрирован стимуляторный ответ. Однако при более сильных импульсах — 10 и 15 В — эффект сохранился у 3 животных (43%), у 4 (59%) стимуляторный феномен был полностью выключен. Кроме того, сохранившиеся реакции были выражены слабо: гидростатическое давление в ответ на раздражение нерва 10 В, 10 Гц в 3 пробах повысилось всего лишь с $11,6 \pm 4,2$ до $12,9 \pm 3,92$ мм рт.ст. ($+11\%$; $p > 0,05$); при стимуле 15 В, 10 Гц внутриполостное давление повысилось с $12,0 \pm 5,3$ до $16 \pm 6,0$ мм рт.ст., что также недостоверно (рис. 6).

Следует отметить, что введение в организм лизергола не оказывало существенного влияния на фоновую моторную активность ДПК, поэтому результаты фармакологического анализа являются убедительными. Лизергол не влиял и на функцию блуждающего нерва: его раздражения сопровождались, как обычно, усилением сокращений кишки, что доказывает нехолинергическое происхождение стимуляторного эффекта и является до-

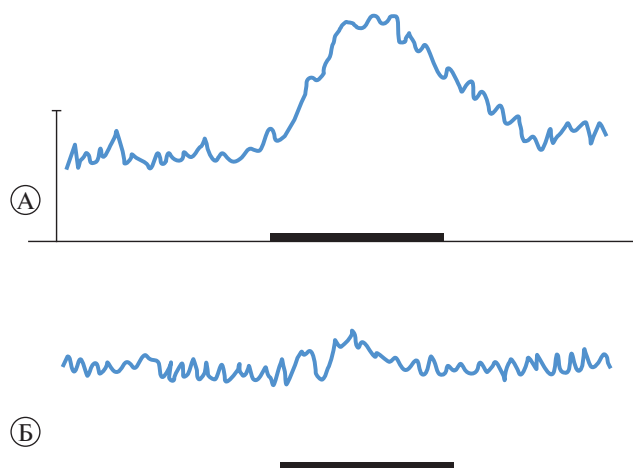


Рис. 6. Реакции двенадцатиперстной кишки собаки на раздражение симпатического ствола в грудной полости (10 В, 20 Гц) в различных условиях

Примечание. А — на фоне действия α - и β -блокаторов фентоламина и пропранолола, Б — на фоне совместного действия адреноблокаторов и лизергола — блокатора 5НТ-рецепторов гладких мышц. На каждом фрагменте показаны давление в полости кишки и нулевая линия с отметкой раздражения (жирная ее часть, 30 с). Шкала давления — 10 мм рт.ст. (для обоих фрагментов).

полнительным подтверждением серотонинергической природы изучаемого феномена.

Результаты экспериментов с лизерголом [7, 14] свидетельствуют о том, что эффекторный нейрон, с помощью которого реализуется стимуляторный феномен, является серотонинергическим, его влияния осуществляются с помощью 5НТ-рецепторов, локализующихся преимущественно на гладких мышцах. Серотонинергический нерв — понятие собирательное, как и симпатический нерв, представляет собой симпатические стволы, их разветвления и веточки.

Серотонинергические нервные волокна симпатического ствола, усиливающие сокращения двенадцатиперстной кишки, являются преганглионарными

Это установлено в экспериментах с промедолом, блокирующим преимущественно 5НТ-рецепторы вегетативных ганглиев. Опыты выполнены в двух сериях. В одной из них вводился только промедол, в другой — орнид и промедол [13, 15].

Эксперименты с промедолом без других препаратов выполнили на 5 собаках, у которых стимуляторный эффект выявлялся без введения орнида. Контрольные раздражения у интактных животных импульсами 10 В, 20 Гц вызывали повышение гидростатического давления в полости кишки с $11,79 \pm 2,86$ до $18,40 \pm 3,31$ мм рт.ст. ($+56\%$; $p < 0,05$). Раздражение нерва импульсами 15 В вызывало еще большее усиление сокращений кишки. Раздражение СС импульсами 10 В на фоне действия промедола (10 мг/кг) изменением деятельности кишки не сопровождалось (стимуляторный эффект включен полностью). При раздражении импульсом 15 В в 2 опытах стимуляторный эффект устранен промедолом неполностью, в 3 — полностью.

Эксперименты с орнидом и промедолом выполнили на 13 животных. Промедол (блокирует преимущественно 5НТ-рецепторы нейронов вегетативных ганглиев) вводили в дозе 10 мг/кг на фоне действия орнида (20 мг/кг).

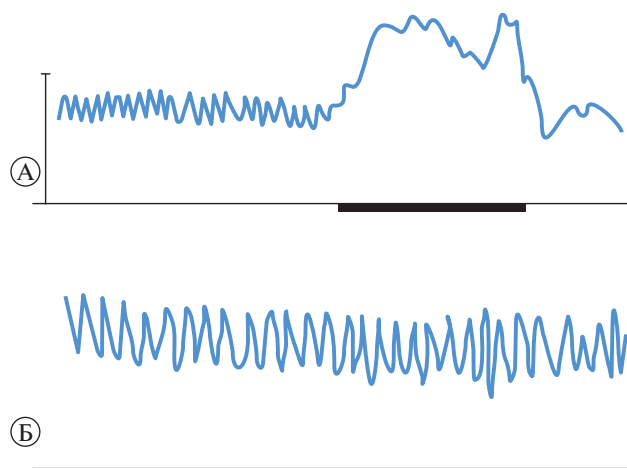


Рис. 7. Реакции двенадцатиперстной кишки собаки на раздражение симпатического ствола (15 В, 20 Гц) в различных условиях

Примечание. А — на фоне действия симпатолитика орнида, Б — на фоне совместного действия орнида и промедола — блокатора 5НТ-рецепторов нейронов вегетативных ганглиев. На каждом фрагменте показаны давление в полости кишки и нулевая линия с отметкой раздражения (жирная ее часть, 30 с). Шкала давления — 10 мм рт.ст. для обоих фрагментов.

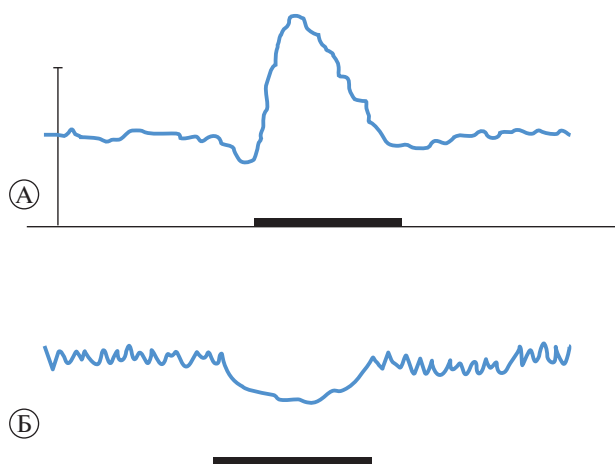


Рис. 8. Реакции двенадцатиперстной кишки на раздражения симпатического ствола (10 В, 20 Гц) в различных условиях

Примечание. А — у intactной собаки, Б — на фоне действия промедола — блокатора 5НТ-рецепторов нейронов вегетативных ганглиев. На каждом фрагменте показаны давление в полости кишки и нулевая линия с отметкой раздражения (жирная ее часть, 30 с). Шкала давления — 20 мм рт.ст. для обоих фрагментов.

724

Вначале убедились в том, что раздражение СС на фоне действия орнида и в этих опытах, как и в предыдущих, сопровождается ярко выраженным усилением сокращений кишки (рис. 7). Далее в условиях совместного действия орнида и промедола изучили 39 реакций ДПК на раздражение СС импульсами 5, 10 и 15 В, частотой 20 Гц. При раздражении нерва импульсами 5 и 15 В исследуемый феномен был устранен во всех 39 пробах (см. рис. 7), а в случае действия стимула амплитудой 10 В незначительный эффект сохранился лишь в 2 случаях (+5,1%), причем прирост гидростатического давления в этих опытах составил всего $2,1 \pm 0,9$ мм рт.ст. Хотя промедол не является специфичным блокатором только серотонинорецепторов, его побочные воздействия не искажали результаты проведенного фармакологического анализа.

Необходимо отметить, что блокада 5НТ-рецепторов вегетативных ганглиев промедолом не только устраняла ярко выраженный стимуляторный эффект кишки на раздражение СС, но вела также к появлению тормозной реакции на раздражение нерва (рис. 8). Данный факт является важнейшим доказательством наличия в составе СС в грудной полости стимулирующих волокон (наличие тормозных адренергических нервных волокон хорошо известно). Поскольку при блокаде стимулирующих серотонинергических нервных волокон лучше выявляется действие тормозных адренергических волокон, это доказывает, что свои влияния они реализуют независимо друг от друга. При этом функция блуждающего нерва, стимулирующего сокращение кишки, как показали результаты наших специальных экспериментов [4, 6, 16], также не нарушается при полной блокаде функции серотонинергических нервных волокон.

Таким образом, блокада 5НТ-рецепторов, локализующихся преимущественно на нейронах вегетативных ганглиев, устраняет стимуляторный эффект раздражения СС. Это означает, что стимуляторный феномен реализуется с помощью преганглионарных серотонинергических нервных волокон, синаптически связанных с нейронами, возбуждение которых ведет к усилению сокращений кишки.

Выводы

Наше заключение о серотонинергическом механизме стимуляторного эффекта подтверждается также косвенно результатами биохимических (методика Оксенкруза [5]) и гистохимических исследований, с помощью которых в СС был обнаружен серотонин (методика Фалька–Хилларпа в модификации Крохиной).

- Результаты наших экспериментов [13, 14, 16] согласуются с многочисленными данными ряда других исследователей и свидетельствуют о том, что преганглионарные серотонинергические нервные волокна выходят из спинного мозга вместе с преганглионарными симпатическими волокнами и образуют синаптические контакты с помощью 5НТ-рецепторов с серотонинергическими нейронами вегетативных ганглиев. От ганглионарных серотонинергических нейронов отходят постганглионарные серотонинергические волокна, образующие синаптические контакты с гладкомышечными клетками ДПК с помощью 5НТ-рецепторов, активация которых ведет к усилению сокращений кишки. Доказательством такого представления являются следующие экспериментальные факты, приведенные не только в настоящем, но также в обзоре, посвященном изучению регуляции моторики желудка, в котором показано наличие серотонинергических нервов, оказывающих сильное стимулирующее влияние на сокращения желудка и ДПК.
- Стимуляторные эффекты желудка и ДПК впервые получены с помощью раздражения СС в грудной полости у собак, где он не содержит парасимпатических волокон.
- Раздражение СС в грудной полости у собак без применения фармакологических препаратов, кроме наркотика, чаще вызывает не угнетение, а усиление сокращений ДПК.
- Усиление сокращений желудка и ДПК становится более выраженным при усилении раздражения нерва (закон силовых отношений).
- Независимость появления стимуляторного эффекта при раздражении симпатического нерва от фоновой активности органа.
- Блокада фармакологическими препаратами адренергических окончаний, α - и β -адренорецепторов или N-холинорецепторов вегетативных ганглиев не только не устраняет, а, напротив, усиливает стимуляторный эффект, возникающий при раздражении симпатического нерва.
- Исключение возбуждения парасимпатических нервных волокон блуждающего нерва при раздражении симпатического нерва не влияет на степень выраженности и частоту встречаемости стимуляторного эффекта.
- Раздельная блокада 5-НТ_{3,4}-рецепторов вегетативных ганглиев и 5-НТ_{1,2}-рецепторов гладких мышц устраняет стимуляторный эффект желудка и кишки, возникающий при раздражении симпатического нерва, что доказывает последовательное расположение 5-НТ_{3,4}- и 5-НТ_{1,2}-рецепторов по ходу изученного нервного пути.
- Блокада серотонинорецепторов вегетативных ганглиев и гладких мышц не влияет на функции симпатического и парасимпатического нерва (точнее, адренергического и холинергического отделов вегетативной нервной системы, ВНС).
- Согласно данным других авторов, экзогенный серотонин также усиливает сокращения желудка и кишки.

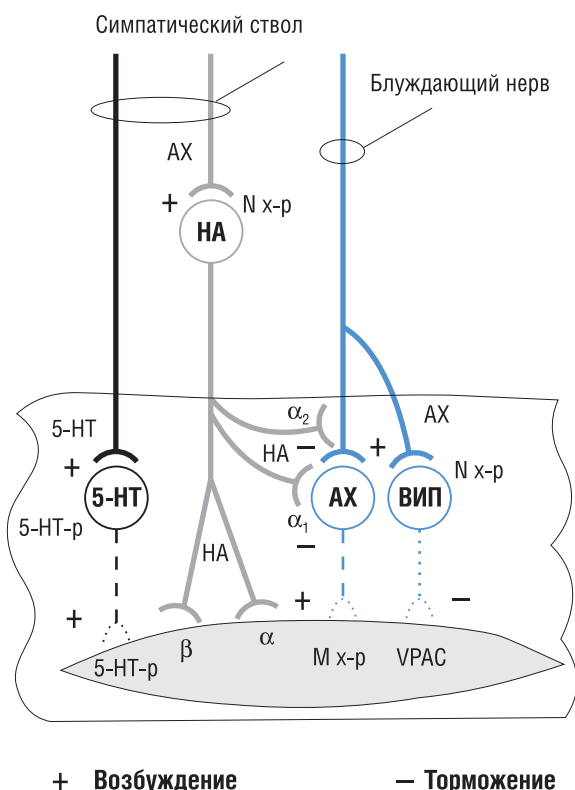


Рис 9. Функциональная организация периферической части вегетативной нервной системы (на примере желудка и тонкой кишки)

Примечание. Нейроны: НА — адренергические, 5НТ — серотонинергические, АХ — холинергические, ВИП — ВИПергические и соответствующие их медиаторам рецепторы: α-, β-, 5НТ-р, N x-p, M x-p и VPAC-рецепторы (ВИП-рецепторы). Сплошными линиями обозначены преганглионарные волокна, прерывистыми — постганглионарные.

- С помощью биохимической и гистохимической методики в составе грудного отдела СС обнаружен серотонин, концентрация которого в 10–15 раз превосходит концентрацию катехоламинов.
- Серотонинергические волокна распространяются от ядер шва (продолговатый мозг), проходя в латеральном и дорсолатеральном пучках спинного мозга вниз, по направлению к симпатическим центрам спинного мозга, где обнаружены серотониновые рецепторы. Это доказано и другими исследователями [17–19].
- Нами впервые тщательно был изучен механизм усиления сокращений ДПК, возникающий при раздражении симпатического нерва. При этом обнаружили, что при раздражении симпатического нерва в грудной полости в подавляющем большинстве случаев возникает не торможение, как следовало ожидать, согласно классическим представлениям, а усиление сокращений ДПК.

- Материалы о серотонинергической регуляции моторики ДПК свидетельствуют о том, что в организме, кроме адренергического и холинергического отделов ВНС, имеется и серотонинергический отдел ВНС, схема периферической части которого в упрощенном виде представлена на рис. 9.
- Аfferентные пути серотонинергического отдела, как мы полагаем, являются общими с симпатическим и парасимпатическим отделами ВНС.
- Наше заключение о наличии серотонинергических нервов подтверждается результатами многолетних исследований [20–22], в которых доказано, что интраорганная нервная система содержит серотонинергические нейроны.

Заключение

При изучении механизмов регуляции моторики ДПК авторы обзора обнаружили новое явление в физиологии: раздражение СС в грудной полости у собак вызывает в основном не торможение, а усиление сокращений ДПК. Авторы также установили, что предварительная блокада α- и β-адренорецепторов и N-холинорецепторов ведет к усилению стимуляторного эффекта. Блокада же 5НТ-рецепторов промедолом и лизерголом предотвращает возникновение стимуляторного эффекта ДПК при раздражении СС. С помощью физиологических, биохимических и гистохимических методик показано, что в симпатических нервах имеются серотонинергические нервные волокна: их там в несколько раз больше, чем адренергических, они оказывают сильные стимуляторные влияния на моторику ДПК.

Блокирующее действие промедола на серотонинергические нервы, очевидно, является одной из причин развития запоров в послеоперационном периоде. Нельзя также исключить, что используемые в клинике для лечения диареи агонисты опиатных рецепторов действуют и на серотонинергические нейроны. Дальнейшее изучение этого вопроса имеет важное значение как для фундаментальной науки, так и практической медицины.

Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты: 93-04-0740-а (1993-95) и 97-04-48715-а (1997-99).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования/конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Судаков КВ. Нормальная физиология. Учебник. М.: МИА. 2006. 920 с.
2. Гайтон АК. Медицинская физиология. М.: Логосфера. 2008. 1296 с.
3. Агаджанян НА. Нормальная физиология. Учебник. 3-е изд. Под ред. НА Агаджаняна, ВМ Смирнова. М.: МИА. 2012. 576 с.
4. Смирнов ВМ, Клевцов ВА, Смирнова НА, Лычкова АЭ. Механизм стимуляции двигательной активности двенадцатиперстной кишки большим чревным нервом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1987;9:270–273.
5. Оксенкруг ГФ. Применение нингидриновой реакции для флуориметрического определения тканевого серотонина, экстрагированного из кислой среды. *Вопросы медицинской химии*. 1969;15(3):317–326.
6. Смирнов ВМ, Свешников ДС, Мясников ИЛ. Природа нервных волокон, усиливающих сокращения желудка и

- кишечника. *Успехи физиологических наук*. 1994;25(3):118–119.
7. Смирнов ВМ, Мясников ИЛ, Свешников ДС. Тезисы докладов XVII съезда физиологов России. *Ростов-на-Дону*. 1998. 60 с.
 8. Bathon E, Ormsbee H. *Gastroenterology*. Cholinergic response of the gastroduodenal junction to splanchnic nerve stimulation. 1980;78(5 Pt.2):1528–1600.
 9. Смирнов ВМ. Проблема двоякого влияния вегетативного нерва на орган и серотонинергический нерв. Под ред. ВМ Смирнова, ИЛ Мясникова, ДС Свешникова. *Элиста: Джангар*. 2008. 192 с.
 10. Абашидзе ВС. К сравнительной анатомии спинномозговых нервных сплетений и симпатических стволов позвоночных. *М*. 1962. 176 с.
 11. Свешников ДС, Смирнов ВМ, Мясников ИЛ, Монгуш МИ, Юрасова ИА. Возможная роль катехоламинов, альфа- и бета-адренорецепторов в усилении сокращений двенадцатиперстной кишки при раздражении симпатического нерва. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011;152(7):8–12.
 12. Свешников ДС. Нехолинергическое усиление сокращений двенадцатиперстной кишки. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 1998;VIII(5):258.
 13. Свешников ДС, Киричук ВФ, Смирнов ВМ, Мясников ИЛ, Трофимова ЮЕ, Трубецкая МА. Исследование природы нервных волокон, вызывающих усиление сокращений двенадцатиперстной кишки при раздражении симпатического нерва. *Саратовский медицинский журнал*. 2011;7(3):580–583.
 14. Свешников ДС. Исследование роли серотонинергических структур в регуляции моторной функции органов желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис... докт. мед. наук. *М*. 2011. 36 с.
 15. Смирнов ВМ, Свешников ДС, Мясников ИЛ. Исследование механизма усиления сокращений двенадцатиперстной кишки при раздражении симпатического ствола. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1997;1:11–14.
 16. Смирнов ВМ, Мясников ИЛ, Свешников ДС, Степанюк НН. Материалы XVIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. *Казань*. 2001. 227 с.
 17. Bancila M, Giuliano F, Rampin O, Mailly P, Brisorgueil MJ, Calas A, Verge D. Evidence for a direct projection from the paraventricular nucleus of the hypothalamus to putative serotonergic neurons of the nucleus paragigantocellularis involved in the control of erection in rats. *Eur J Neurosci*. 2002;16(7):1240–1248.
 18. Araneda S, Magoul R, Calas A. [3H]-serotonin retrograde labelling in serotonergic fibers. *Brit Res Bull*. 1989;22(6):951–958.
 19. Araneda S, Magoul R, Calas A. Gaba innervation of serotonergic neurones innervating the thoracic marrow of the rat. Immunocytochemical and autoradiographic combination after retrograde axonal transport with tritiated serotonin. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy)*. 1991;75(229):81–84.
 20. Gershon M. Properties and development of peripheral serotonergic neurons. *J Physiol*. 1981;77(2–3):257–265.
 21. Gershon M. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(Suppl.5):184–193.
 22. Gershon M. Enteric serotonergic neurones ... finally! *J Physiol*. 2009;587(Pt.3):507.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Смирнов Виктор Михайлович, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.:** +7 (495) 434-62-29, **e-mail:** vmsmirnov1@gmail.com

Свешников Дмитрий Сергеевич, доктор медицинских наук, доцент, доцент кафедры нормальной физиологии медицинского института Российского университета дружбы народов
Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, **e-mail:** dmsveshnikov@gmail.com

Мясников Игорь Леонидович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной физиологии медицинского института Российского университета дружбы народов
Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, **e-mail:** asktomil@yandex.ru

Кузнецова Татьяна Евгеньевна, кандидат медицинских наук, доцент, профессор кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.:** +7 (495) 434-62-29, **e-mail:** tek@rsmu.ru

Самко Юрий Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.:** +7 (495) 434-62-29, **e-mail:** vmsmirnov1@gmail.com

DOI: 10.15690/vramn573

Т.И. Торховская^{1, 2}, О.В. Белова¹, И.В. Зими́на¹, А.В. Крючкова¹, С.Н. Москвина¹,
О.В. Быстрова³, В.Я. Арион¹, В.И. Сергиенко¹

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА России,
Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН,
Москва, Российская Федерация

³ Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Нейропептиды, цитокины и тимические пептиды как эффекторы взаимодействия тимуса и нейроэндокринной системы

В обзоре приведены данные о взаимодействии нейроэндокринной системы и тимуса, осуществляемом через нейроэндокринно-иммунные адаптивные системы организма. Присутствие адренергических и пептидергических нервов в тимусе создает условия для воздействия продуцируемых ими нейропептидов. Последние активируют рецепторы на тимических клетках, влияя на основные процессы в тимусе, включая созревание Т-лимфоцитов, продукцию цитокинов, гормонов и пептидов. В свою очередь, продуцируемые тимусом пептиды и/или контролируемые ими цитокины проникают в мозг, влияя на функции нейронов, что создает основу для поведенческих изменений и поддержания гомеостаза в ответ на инфекцию. При старении организма, а также ряде заболеваний — инфекционных, аутоиммунных, нейродегенеративных, онкологических — показаны нарушения взаимодействий процессов в тимусе и центральной нервной системе. Механизмы сигнальных реакций, определяющих эти взаимодействия, еще не ясны, и их понимание будет способствовать развитию комплексных эффективных терапевтических стратегий.

Ключевые слова: тимус, тимические пептиды, норадренергические нервные волокна, пептидергические нервные волокна, когнитивные функции.
(Для цитирования: Торховская Т.И., Белова О.В., Зими́на И.В., Крючкова А.В., Москвина С.Н., Быстрова О.В., Арион В.Я., Сергиенко В.И. Нейропептиды, цитокины и тимические пептиды как эффекторы взаимодействия тимуса и нейроэндокринной системы. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 727–733. Doi: 10.15690/vramn573)

727

Введение

Роли нервной системы в подверженности организма заболеваниям и способности к восстановлению всегда придавалось большое значение. С развитием медико-биологических наук были накоплены данные о том, что центральная нервная система (ЦНС) в значительной степени ответственна за работу иммунной системы. Все больше внимания в иммунном статусе придается роли

психологических и эмоциональных факторов, создающих в целом комплексный, интегрированный показатель поддержания здоровья [1, 2]. Установлено, что и ЦНС также подвержена активному воздействию иммунных факторов. Тесное взаимодействие иммунной и нейроэндокринной систем составляет интегральную гомеостатическую сеть, или нейроэндокринно-иммунный блок, формирующийся уже в период эмбрионального и неонатального развития [2–4]. Внутри него нейроэндокринная система

T.I. Torkhovskaya^{1, 2}, O.V. Belova¹, I.V. Zimina¹, A.V. Kryuchkova¹, S.N. Moskvina¹,
O.V. Bystrova³, V.Ya. Arion¹, V.I. Sergienko¹

¹ Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

² V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

³ Russian University of Peoples' Friendship, Moscow, Russian Federation

Neuropeptides, Cytokines and Thymus Peptides as Effectors of Interactions Between Thymus and Neuroendocrine System

The review presents data on mutual influence of nervous system and thymus, realized through the neuroendocrine-immune interactions. The presence of adrenergic and peptidergic nerves in thymus creates conditions for implementation of the effect of neuropeptides secreted by them. These neuropeptides induce activation of thymus cells receptors and influence on the main processes in thymus, including T-lymphocyte maturation, cytokine and hormones production. In turn, thymus peptides and/or cytokines, controlled by them, enter the brain and exert influence on neuronal function, which creates the basis for changes of behavior and homeostasis maintenance in response to infection. Ageing and some infectious, autoimmune, neurodegenerative and cancer diseases are accompanied by distortion of interactions between thymus and central nervous system. Mechanisms of signaling pathways, which determine these interactions, are not revealed yet, and their understanding will promote the development of effective therapeutic strategies.

Key words: thymus; thymus peptides; noradrenergic nerve fibers; peptidergic nerve fibers; cognitive functions.

(For citation: Torkhovskaya T.I., Belova O.V., Zimina I.V., Kryuchkova A.V., Moskvina S.N., Bystrova O.V., Arion V.Ya., Sergienko V.I. Neuropeptides, Cytokines and Thymus Peptides as Effectors of Interactions Between Thymus and Neuroendocrine System. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 727–733. Doi: 10.15690/vramn573)

мониторирует и контролирует физические и химические параметры внутренней среды, а иммунная — с помощью антигенного распознавания воспринимает макромолекулярные и клеточные компоненты организма и реагирует на их изменения [5]. Такое взаимодействие, называемое «двусторонней коммуникацией» [1], является неотъемлемой частью нормального гомеостатического баланса, лежащего в основе поддержания здоровья организма [1–3]. Новая область биомедицинских исследований — нейроиммунология — не только способствует детальному пониманию взаимосвязи процессов в нервной и иммунной системе в норме и при патологии [6, 7], но и направлена на разработку более эффективной комплексной терапевтической стратегии [2–4].

Внимание ученых направлено на сложные сигнальные каскады, при этом существенное внимание уделяется тимусу — органу, в котором проходят дифференцировку костномозговые предшественники Т-клеток [8]. Именно в вилочковой железе осуществляются соприкосновение, контроль и взаимная регуляция основных систем межклеточного сигнала — нервной, эндокринной и иммунной [4], что обуславливает формирование нормального гомеостаза [5] в перинатальном периоде жизни млекопитающих, а также объясняет механизм некоторых изменений в работе этих систем при старении организма и соответствующей возрастной инволюции тимуса [9].

Влияние нейроэндокринной системы на процессы в тимусе

Нервные волокна в тимусе

В тимусе, костном мозге, селезенке, лимфатических узлах и других лимфоидных тканях показана выраженная иннервация, существенно влияющая на клетки иммунной системы [1]. Тимус пронизан постганглионарными симпатическими норадренергическими (NA) нервными волокнами [10–12], которые локализируются близко к крупным кровеносным сосудам, входя в кортикальную область, соприкасающуюся с тимоидами [13–15]. Помимо этого, лимфоидные органы, включая тимус, снабжены пептидергическими нервными волокнами, которые продуцируют ряд специфических биологически активных пептидов — нейропептид Y, субстанцию P, вазоактивный интестинальный пептид, опиоидные пептиды, кортикотропин-рилизинг гормон (Corticotropin-Releasing Hormone, CRH), пептид, генетически родственный кальцитонину, называемый также кальцитонин ген-родственный, или ген-кальцитониновый пептид, или ко-кальцитонин (Calcitonin Gene Related Peptide, CGRP) [1, 16]. Эти нейрорхимические вещества, высвобождаемые из нервных волокон, диффундируют в отдаленные области вилочковой железы и связываются с соответствующими рецепторами на лимфоидных клетках, модулируя иммунный ответ [1]. Плотная иннервация пептидергическими нервными волокнами, продуцирующими, в частности, нейропептид Y, обнаружена в тимусе в зоне кортикомедуллярного соединения, связанной с макрофагами и тучными клетками [14]. В тимусе имеется также холинергическая иннервация, однако она минимальна по сравнению с большим количеством NA-нервных волокон [1], влияние которых достаточно изучено, равно как и эффект их нейротрансмисмитера — норэпинефрина (норадреналина) — на клетки иммунной системы [1]. Первоначально считали, что иннервация лимфоидных органов влияет только на сосудистые функции, в первую очередь на регуляцию кровотока. Благодаря данным о контролируемых

ими возрастных нарушений в иммунной системе, а также изменениях при ряде заболеваний были сформулированы представления о специфических регуляторных воздействиях нервных волокон на иммунные процессы [13–15].

Экспрессия рецепторов на тимических клетках

Влияние нейроэндокринной системы на физиологию тимуса осуществляется путем воздействия гормонов гипоталамуса, гипофиза или периферических желез на тимические эпителиальные клетки, тимоциты и другие клетки внутри тимуса через соответствующие рецепторы [8]. Существуют доказательства внутритимической экспрессии рецепторов к гормонам и нейропептидам у млекопитающих (человек, грызуны) и других животных (птицы, амфибии и костистые рыбы). Так, показана экспрессия на клетках тимуса рецепторов к нейропептиду Y, субстанции P, CGRP, CRH. На тимических эпителиальных клетках (ТЭК) выявлены специфические рецепторы к гормону роста — соматотропину (Growth Hormone, GH) [17] и пролактину [18] — белкам, продуцируемыми, соответственно, в гипоталамусе и гипофизе, и способным оказывать влияние на синтез и секрецию основного специфического гормона тимуса — тимулина [19]. Показана также экспрессия на этих клетках близко расположенных или соприкасающихся с NA-нервными волокнами $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренергических рецепторов (β -Adrenergic Receptors, β -AR), активация которых сопряжена со многими клеточными процессами [1, 10]. Ретикулоэпителиальные клетки тимического стромального микроокружения также экспрессируют рецепторы для ряда гормонов, секретируемых гипофизом (например, для гормона роста, пролактина, адренокортикотропного гормона) [20].

В физиологических условиях присоединение лигандов, продуцируемых в нервных волокнах, к рецепторам клеток тимуса запускает цепь сигнальных внутриклеточных реакций, что в конечном счете, модулируя в определенную сторону изменения тех или иных процессов, через цепь последовательных сопряженных реакций влияет на иммунный ответ. Разнообразие этих процессов и характер ответа определяются широким спектром функционирования тимуса как ключевого иммунного органа [8].

Тимические процессы, контролируемые гормонами и нейропептидами

Фактически все основные процессы в тимусе находятся под нейроэндокринным контролем. Показано, что гормоны и нейропептиды играют существенную роль в развитии тимоцитов позвоночных животных [15], что проявляется на всех стадиях жизнедеятельности клеток. Так, показана способность гормонов и нейропептидов оказывать влияние на процессы пролиферации тимических клеток, на реакции, связанные с клеточным апоптозом [21]. Гормоны и нейропептиды модулируют также внутритимическую дифференцировку и миграцию Т-клеток, влияя на их соотношения. Показано существование сложного нейроэндокринного контроля внутритимической миграции Т-клеток. Так, в работе W. Savino с соавт. было показано, что продуцируемый нервными клетками пептид семафорин-3А, выполняющий хемоаттрактантную роль при контроле роста аксона, способен также оказывать специфическое хемоаттрактантное действие в контроле миграции тимоцитов человека [22]. Наряду с этим гормоны и нейропептиды влияют на адгезию тимоцитов на эпителиальных клетках тимуса [8, 23].

Показано, что гормон роста, секретируемый передней долей гипофиза, увеличивает выход тимоцитов из тимических клеток-«нянек» (Thymic Nurse Cells, TNCs)

[24]. Взаимоотношения этих процессов в клетках тимуса и в гипофизе играют важную роль в нейроэндокринной регуляции хоминга и развитии лимфоидных клеток [24]. В процессах созревания тимоцитов участвуют также $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренергические рецепторы. При их активации *in vitro* с высвобождением циклического аденозинмонофосфата наблюдали повышение дифференциации и ингибирование пролиферации клеток, на основании чего предположили участие в этом процессе *in vivo* норадреналина, высвобождаемого из NA-нервных волокон [1, 10].

Существенным фактором влияния на тимус пептидов, секретлируемых нервными волокнами, является осуществляемый ими контроль тимической эндокринной функции и продукции тимического гормона тимулина [8]. Показано, что его продукция и секреция строго регулируются нейроэндокринной системой с участием соматотропина и пролактина [19].

В функциональном взаимодействии нейроэндокринной системы и тимуса, как и других органов иммунной системы, показано также участие глюкокортикоидов и катехоламинов как медиаторов гомеостаза иммунной системы. Обнаружено, что они способны модулировать созревание лимфоцитов и активность определенных типов иммунных клеток [25].

Таким образом, продуцируемые и/или контролируемые ЦНС гормоны и нейропептиды оказывают влияние на следующие процессы в тимусе:

- выход тимоцитов из тимических клеток-«нянек»;
- созревание тимоцитов, их дифференцировку, пролиферацию, апоптоз;
- внутритимическую миграцию;
- адгезию тимоцитов;
- продукцию тимических пептидов, в том числе гормона тимулина.

В целом, физиологические процессы в тимусе на протяжении всей жизни организма находятся под плеiotропным влиянием гормонов и нейропептидов, и все события, происходящие между клетками микроокружения и дифференцирующимися тимоцитами, контролируются нейроэндокринной системой [8]. Следует также упомянуть, что экспрессия соответствующих рецепторов на тимических клетках, определяющая эффекты гормонов и нейропептидов, в свою очередь также во многом определяется нейроэндокринными факторами. На сегодняшний день нейроэндокринный контроль тимуса рассматривается как очень сложный, не до конца еще понятый процесс, зависимый от многих биологических факторов, включающих внутритимическую продукцию ряда гормонов и нейропептидов [8].

Влияние тимуса на функционирование ЦНС

Тимус как основной иммунный орган не только отвечает на процессы, инициированные ЦНС, но и, как показано, сам оказывает существенное влияние на ее функционирование, что было обнаружено в экспериментах по изучению когнитивных функций мозга (поведения, обучения, памяти) у животных после тимэктомии [26–28]. Так, на моделях пассивного и активного избегания и пространственного запоминания продемонстрировано, что удаление тимуса у мышей и крыс снижает уровень их обучаемости [27–29].

Полагают, что нейроэндокринные изменения и нарушения памяти могут быть сопряжены с нарушениями сбалансированных взаимодействий цитокинов с макро-

фагами и лимфоцитами, контролируемых, в частности, тимусом [27].

Сложная природа нейроэндокринно-иммунных взаимодействий, определяющая иммунный сигналинг в ЦНС, связана с продукцией тимусом специфических белков и пептидов, которые или непосредственно воздействуют на ЦНС, или индуцируют высвобождение цитокинов, в первую очередь интерлейкинов (Interleukin, IL), периферическими иммунными клетками. Цитокины могут поступать в мозг путем активного транспорта или через нарушенный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [30]. Присутствие ряда цитокинов, IL 1, 2, 3, 6, 8 и 12, интерферона (Interferon, IFN) γ и фактора некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor, TNF) α было показано в мозге экспериментальных животных [30]. Цитокины регулируют важные функции нейронов, такие как апоптоз и выживание, а также стимуляцию нервных клеток и высвобождение ими нейропептидов и нейротрансмиттеров [31].

Влияние пептидов тимуса

Источниками цитокинов, гормонов и тимических пептидов в тимусе могут быть различные ТЭК и другие клетки. Выделяют секреторные и ретикулярные (поддерживающие) эпителиальные клетки тимуса, однако это деление условно, поскольку практически все клетки тимического эпителия способны выполнять обе функции, и преобладание той или другой из них зависит от локализации и функционального состояния клетки [32]. По данным разных авторов, ТЭК продуцируют тимулин, соматостатин, вазопрессин, а макрофаги тимуса — соматостатин. Иммуноцитохимический анализ показал, что тимозин $\alpha 1$ и тимопоэтин, а также ряд цитокинов, в том числе IL 1 и 6, синтезируются в ретикулоэпителиальных клетках [20]. Специфическими тимическими клетками-«няньками» продуцируются также тимозины $\beta 3$ и $\beta 4$ [24].

Показано, что некоторые пептиды тимуса, в частности гормон тимулин, оказывают влияние на ЦНС [19, 31, 33]. Тимулин — единственный гормон, продуцируемый исключительно клетками тимуса — обладает широким спектром действия. Так, показана его гипофизотропная активность — влияние на секрецию гипофизом лютеинизирующего гормона (Luteinizing Hormone, LH), что связывают с модуляцией активности гонадотропин-рилизинг гормона (Gonadotropin-Releasing Hormone, GRH) [34]. Обнаружено также нейропротекторное влияние тимулина на мозг, способность к повышению нарушенных после тимэктомии когнитивных функций [29, 35]. Выявлены его противовоспалительные и анальгезирующие свойства, при этом ряд его эффектов сопряжен с контролем секреции провоспалительных медиаторов IL 1 и TNF α [35].

Другие пептиды, продуцируемые тимусом, также связаны с процессами в ЦНС. Так, показана экспрессия тимозина $\beta 4$ на клетках мозга на границе с зоной некроза и участие его в стимуляции ангиогенеза после ишемического повреждения [36]. В нейронах гиппокампа и ряде других клеток мозга обнаружено присутствие тимозина $\alpha 1$, и доказана его способность повышать уровень фактора роста нервов (Nerve Growth Factor, NGF) [37]. Еще один тимический пептид — тимопоэтин — способен активировать гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось; введение его в лекарственной форме (тимопентин) больным с депрессией и дисфункцией фагоцитов временно ослабляло агорафобию (боязнь открытого пространства) [38]. Препарат пептидов тимуса Тактивин, широко применяемый в клинической практике для устранения иммунологических нарушений, так же как и отдельные

тимические пептиды, обладает выраженным действием на высшие интегративные функции мозга [39], анальгезирующим действием [40], способствует восстановлению обучаемости у тимэктомизированных мышей [29].

Контролируемые тимусом воздействия цитокинов. Участие IL 1

Существенным фактором, опосредующим воздействие тимуса на функции ЦНС, является продукция провоспалительного цитокина IL 1, который рассматривается как нейротрансмиттер, осуществляющий коммуникацию с ЦНС. Его синтез в значительной мере находится под лимитирующим контролем тимуса: показано повышение уровня IL 1 после тимэктомии [27]. О действии IL 1 в мозге свидетельствует присутствие рецептора к нему в гипоталамусе и других областях мозга, таких как гиппокамп [41]. IL 1 может стимулировать высвобождение кортикотропин-рилизинг-гормона (CRH) из гипоталамуса, действуя или непосредственно на нейроны, или косвенно, путем высвобождения дофамина [42, 43]. При этом нейрональная функция IL 1 контролируется путем модуляций высвобождений других цитокинов, IL 6 и TNF α [1, 44]. В экспериментах на животных показано влияние IL 1 на социальное поведение [43], исследовательские и пищевые реакции, а также на ритм сна и бодрствования [45, 46].

IL 1 синтезируется многими клетками организма, в первую очередь активированными макрофагами, включая макрофаги тимуса, а также стимулированными В лимфоцитами и другими клетками, что не позволяет специфично связать его эффекты с влиянием конкретного иммунного органа, в частности тимуса. Однако снижение когнитивных функций после тимэктомии [27–29] указывает на существенную роль именно тимуса — через его влияние на синтез IL 1 [27]. Процессы влияния других пептидов, продуцируемых различными клетками, также сопряжены друг с другом, и для большинства из них трудно выделить влияние пептидов только тимического происхождения. Единственный гормон, воздействия которого на процессы в ЦНС являются специфичными для тимуса, — это тимулин: его уровень резко снижается или исчезает после тимэктомии [47].

Молекулярный механизм воздействия на ЦНС продуцируемых клетками пептидов, включая цитокины, пока не ясен [1], и эффекты цитокинов на ЦНС фиксируются в основном по их конечным, поведенческим проявлениям у животных. Полагают, что эффекты периферических цитокинов, в том числе контролируемых тимусом, могут осуществляться частично путем связывания с сосудистым эндотелием в мозге [48]. Во взаимодействии цитокинов и тимических пептидов в мозге могут участвовать ганглиозиды, подобные гликоконъюгату GQ, идентифицированному в ТЭК. Различные виды ганглиозидов являются компонентами мембран ряда клеток, особенно в мозге, причем показана их связь с функциональными свойствами ЦНС, такими как память и пространственное восприятие [49]. В целом, интеграция и координация поведенческих и иммунных реакций представляются необходимым условием сохранения гомеостаза [6].

Особенности нейроэндокринно-иммунных взаимодействий при старении и патологических состояниях

В ряде работ показаны некоторые особенности комплексного участия нейроэндокринной и иммунной систем, включая функционирование тимуса, в процессах,

связанных со старением, а также с инфекционными, аутоиммунными, нейродегенеративными и онкологическими заболеваниями [11, 50]. Показано, что изменения иммунной системы, связанные с возрастом или заболеваниями, сопряжены с изменениями функционирования нервных волокон в лимфоидных органах [1]. В работе Н.С. Линьковой и соавт. [51] продемонстрированы выраженные иммуноэндокринные связи тимуса и эпифиза. При этом эпифизарные пептиды (эпиталамин и эпиталон) оказывали выраженное геропротективное влияние на инволюцию тимуса [49]. В свою очередь, пептидные препараты тимуса, например Тималин и Тимоген, хоть и в меньшей степени, но замедляли инволюцию эпифиза [51]. Показано снижение уровня тимулина в сыворотке старых животных, свидетельствующее об ослаблении его продукции тимусом, а также частичное восстановление его уровня при введении бычьего соматотропина, продуцируемого в гипоталамусе, или гормона гипофиза пролактина [52]. При старении организма происходит также десенсибилизация гипофиза в отношении тимических сигналов, т.е. снижается его ответ на пептиды, продуцируемые или контролируемые тимусом, включая цитокины [5].

Ослабление с обеих сторон двунаправленной коммуникации нервной и иммунной систем, включая связь ЦНС с процессами в тимусе, наблюдается и при ряде заболеваний. Как отмечено S. Thyagarajan и соавт. [1], прогрессирование болезни из-за неспособности иммунной системы дать соответствующий ответ на патогенное воздействие частично обусловлено недостаточностью нейронального сигналинга, в том числе реализуемого через тимус, в месте процессирования антигена, что обуславливает нарушение гомеостаза [1]. Изменения нейроэндокринно-иммунного сигналинга могут определять течение инфекционной болезни и индивидуальную реакцию пациента на терапию [50]. Например, показаны существенные изменения функции ЦНС при вирусе иммунодефицита человека, приводящие к таким нарушениям, как нейродегенерация и деменция, против которых терапии пока не существует [53].

Предполагается роль факторов ЦНС в патогенезе воспалительных аутоиммунных заболеваний. M. Dimitrijevic с соавт. [25] показали влияние катехоламинов (Catecholamines, CAs) и глюкокортикоидов (Glucocorticoids, GCs) на селекцию тимоцитов. Было продемонстрировано также участие катехоламинов в регуляции развития в тимусе Т-регуляторных клеток (Tregs). Авторы отмечают влияние сложных взаимодействий между GCs, CAs и нейропептидом Y в регуляции функций макрофагов и их значение в патогенезе аутоиммунных воспалительных заболеваний [25].

При нейродегенеративных заболеваниях защита против распространения инфекции внутри мозга и прекращение воспалительных процессов осуществляются с участием цитокинов и хемокинов [54]. Источником цитокинов могут быть глиальные клетки, астроциты и олигодендроциты, а их синтез и секреция могут модулироваться пептидами, которые секретируются иммунными клетками, включая клетки тимуса. Они влияют на функцию ЦНС в том числе путем транспорта и мобилизации лейкоцитов в мозг через ГЭБ [55]. Такие защитные механизмы включают индукцию селектинов — адгезивных молекул, существенных для воспалительного процесса, и хемокинов, которые могут привлекать лейкоциты к месту воспаления.

При острых (инсульт или травмы головы) и хронических (рассеянный склероз и болезнь Альцгеймера) забо-

леваниях мозга цитокины, продуцируемые проникшими макрофагами, приводят к воспалительному процессу в мозге [54, 56]. Тонкий баланс между про- и противовоспалительными цитокинами определяет направление динамики дальнейшего ответа. В случае сдвига в сторону продукции провоспалительных цитокинов, IL 1 и TNF α инициируется процесс нейродегенерации [57]. Под действием же противовоспалительных цитокинов, продукция которых контролируется, в частности, тимусом и его гормоном тимулином, проявляются нейропротективные эффекты. Преобладание нейротоксичных или нейропротективных процессов в организме зависит от функционирования тимуса, а также от активности регуляторных реакций, которые определяют синтез, секрецию и доставку в ткани и клетки мозга биологически активных пептидов, в том числе цитокинов [42, 56, 57]. Конкретные реакции и процессы этих взаимодействий являются в настоящее время предметом интенсивных исследований [1–3].

Следует также подчеркнуть, что если при нормальных физиологических условиях миграция иммунных клеток в ЦНС очень низка, то при патологиях ЦНС (вирусные или бактериальные инфекции) или воспалительных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, иммунокомпетентные клетки могут легко проникать через ГЭБ [55]. Предполагают возможность такой миграции также при менингите и инсульте с соответствующим повышенным воздействием секретируемых этими клетками пептидов и цитокинов [58]. Проникновение иммунных клеток через ГЭБ было показано и для опухолей мозга, в частности глиобластомы: у мышей в ткани этой опухоли было обнаружено присутствие регуляторных Т клеток, Tregs, причем их уровень был значительно снижен в случае предварительной (до трансплантации опухоли) тимэктомии. Это указывало на преимущественное проникновение в опухоль мозга клеток Tregs тимического происхождения, что авторы рассматривают как существенный факт в пользу иммунотерапии этого заболевания [59]. Кроме роли в воспалении, повреждении и ответе на бактери-

альные инфекции, влияние на мозг процессов, протекающих в тимусе, может также проявляться в болезнях поведения и, как отмечалось выше, в ответе на боль [35, 60, 61]. Тимические пептиды и цитокины могут также определять течение болезни — от защитного действия в острых случаях до предотвращения ее прогрессирования. Полагают, что улучшенное понимание участия нейроиммунных «переговоров» (cross-talk) в ответе организма на воспалительные процессы приведет к более эффективной терапии [1, 16, 19].

Заключение

Таким образом, взаимодействия нейроэндокринной системы и тимуса как основного иммунного органа являются двунаправленными и включают, с одной стороны, контроль функций тимуса за счет гормонов и нейропептидов, и с другой — воздействие на мозг пептидов, контролируемых тимусом. Более глубокое понимание механизмов этих воздействий и определяющих их факторов важно для оптимизации терапии ряда инфекционных, аутоиммунных или нейродегенеративных заболеваний.

Источник финансирования

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-32087 мол_а.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие иных явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- Thyagarajan S., Priyanka H.P. Bidirectional communication between the neuroendocrine system and the immune system: relevance to health and diseases. *Annals of Neurosciences*. 2012; 19(1):40–46. doi: 10.5214/ans.0972.7531.180410
- Захарова ЛА. Пластичность нейроэндокринной и иммунной систем в раннем развитии. *Известия РАН*. 2014;5:437–447.
- Demas GE, Carlton ED. Ecoimmunology for psychoneuroimmunologists: Considering context in neuroendocrine-immune-behavior interactions. *Brain Behav Immun*. 2015;44:9–16. doi: 10.1016/j.bbi.2014.09.002
- Geenen V. The appearance of the thymus and the integrated evolution of adaptive immune and neuroendocrine systems. *Acta Clin. Belg.* 2012;7(3):209–213. doi: 10.2143/ACB.67.3.2062657
- Csaba G. The pineal regulation of the immune system: 40 years since the discovery. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013;60(2):77–91. doi: 10.1556/AMicr.60.2013.2.1
- Магаева СВ, Морозов СГ, Грибова ИЕ. Психонейроиммунология как область психосоматики. *Нейроиммунология*. 2006;IV(3–4):4–15.
- Lassmann H. CNS neuroimmunology seen by a neuropathologist. *Rev Neurol (Paris)*. 2014;170(10):561–563. doi: 10.1016/j.neurol.2014.07.001
- Geenen V, Bodart G, Henry S, Michaux H, Dardenne O, Charlet-Renard C, Martens H, Hober D. Programming of neuroendocrine self in the thymus and its defect in the development of neuroendocrine autoimmunity. *Front Neurosci*. 2013;7:187. doi: 10.3389/fnins.2013.00187
- Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol*. 2007;211(2):144–156. doi: 10.1002/path.2104
- Pilipović I, Radojević K, Kosec D, Nanut MP, Stojić-Vukanić Z, Arsenović-Ranin N, Leposavić G. Gonadal hormone dependent developmental plasticity of catecholamine: β 2-adrenoceptor signaling complex in male rat thymus: putative implications for thymopoiesis. *J Neuroimmunol*. 2013;265(1–2):20–35. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.09.021
- Mignini F, Sabbatini M, Mattioli L, Cosenza M, Artico M, Cavallotti C. Neuroimmune modulation of the thymus microenvironment. *Int J Mol Med*. 2014;33(6):1392–1400. doi: 10.3892/ijmm.2014.1709
- Гусельникова ВВ, Сухорукова ЕГ, Федорова ЕА, Полевщиков АВ, Коржевский ДЭ. Метод одновременного выявления тучных клеток и нервных терминалей в тимусе у лабораторных млекопитающих. *Морфология*. 2014;145(2):70–73.
- Madden KS. Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. *Brain Behav Immun*. 2003;17(Suppl.1):S5–S10. doi: 10.1016/S0889-1591(02)00059-4
- Bilbo SD, Frank A. Beach award: programming of neuroendocrine function by early-life experience: a critical role for the immune system. *Horm Behav*. 2013;63(5):684–691. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.02.017

15. Silva AB, Palmer DB. Evidence of conserved neuroendocrine interactions in the thymus: intrathymic expression of neuropeptides in mammalian and non-mammalian vertebrates. *Neuroimmunomodulation*. 2011;18(5):264–270. doi: 10.1159/000329493
16. Диагностика и лечение нейроэндокринных заболеваний. Под ред. ИИ Дедова. М.: Адамант. 2003. 56 с.
17. Ban E, Gagnerault MC, Jammes H, Postel-Vinay MC, Haour F, Dardenne M. Specific binding sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. *Life Sci*. 1991;48:2141–2148. doi: 10.1016/0024-3205(91)90147-4
18. Triggianese P, Perricone C, Perricone R, De Carolis C. Prolactin and natural killer cells: evaluating the neuroendocrine-immune axis in women with primary infertility and recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2015;73(1):56–65. doi: 10.1111/aji.12335
19. Reggiani PC, Schwerdt JI, Console GM, Roggero EA, Dardenne M, Goya RG. Physiology and Therapeutic Potential of the Thymic Peptide Thymulin. *Curr Pharm Des*. 2014;20(29):4690–4696. doi: 10.2174/138161282066614013021157
20. Bodey B. Thymic reticulo-epithelial cells key cells of neuroendocrine regulation. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2007;7(7):939–949 doi: 10.1517/14712598.7.7.939
21. Wirth T, Westendorf AM, Bloemker D, Wildmann J, Engler H, Mollerus S, Wadwa M, Schäfer MK, Schedlowski M, del Rey A. The sympathetic nervous system modulates CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells via noradrenaline dependent apoptosis in a murine model of lymphoproliferative disease. *Brain Behav Immun*. 2014;38:100–110. doi: 10.1016/j.bbi.2014.01.007
22. Savino W. Intrathymic T cell migration is a multivectorial process under a complex neuroendocrine control. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(3):142–145. doi: 10.1159/000258708
23. Savino W, Postel-Vinay MC, Smaniotto S, Dardenne M. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand J Immunol*. 2002;5(5):442–452. doi: 10.1046/j.1365-3083.2002.01077.x
24. Marković L. [Interaction involving the thymus and the hypothalamus-pituitary axis, immunomodulation by hormones]. *Srp Arh Celok Lek (Serb.)*. 2004;32(5–6):187–193. doi: 10.2298/SAR-H0406187M
25. Dimitrijevic M, Stanojevic S, Kustrimovic N, Leposavic G. End-point effector stress mediators in neuroimmune interactions: their role in immune system homeostasis and autoimmune pathology. *Immunol Res*. 2012;52(1–2):64–80. doi: 10.1007/s12026-012-8275-9
26. Nishiyama N. Thymectomy induced deterioration of learning and memory. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001;47(1):161–165.
27. Song C. The effect of thymectomy and IL-1 on memory: implications for the relationship between immunity and depression. *Brain Behav Immun*. 2002;16(5):557–568. doi: 10.1016/S0889-1591(02)00012-0
28. Saito H, Nishiyama N, Zhang Y, Abe Y. Learning disorders in thymectomized mice: a new screening model for cognitive enhancer. *J Behav Brain Res*. 1997;83(1–2):63–69 doi: 10.1016/S0166-4328(97)86047-0
29. Новоселецкая АВ, Киселева НМ, Иноземцев АН, Белова ОВ, Зимина ИВ, Арион ВЯ. Тактивин и тималин ускоряют процесс обучения и памяти после тимэктомии. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2013;15(1–4):51–52.
30. Chai Q, He WQ, Zhou M, Lu H, Fu ZF. Enhancement of blood-brain barrier permeability and reduction of tight junction protein expression are modulated by chemokines/cytokines induced by rabies virus infection. *J Virol*. 2014;88(9):4698–4710. doi: 10.1128/JVI.03149–13
31. Reggiani PC, Martinez EV, Camihort GA, Poch B, Goya RG, Console GM. Role of thymulin on the somatotrophic axis in vivo. *Life Sci*. 2012;91(5–6):166–171. doi: 10.1016/j.lfs.2012.06.037
32. Akiyama T, Qin J, Ohshima D, Inoue J. Identification of transcription factors activated in thymic epithelial cells during embryonic thymus development. *Methods Mol Biol*. 2014;1164:163–170. doi: 10.1007/978-1-4939-0805-9_13
33. Reggiani PC, Morel GR, Console GM, Barbeito CG, Rodriguez SS, Brown OA, Bellini MJ, Pléau JM, Dardenne M, Goya RG. The thymus-neuroendocrine axis: physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1153:98–106. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03964.x
34. Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damin-Matsumura PG, Castillo L, Rosas P. Effects of thymulin and GnRH on the release of gonadotropins by in vitro pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle. *Life Sci*. 2004;76:795–804. doi: 10.1016/j.lfs.2004.07.017
35. Safieh-Garabedian B, Ochoa-Chaar CI, Poole S, Massaad CA, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE. Thymulin reverses inflammatory hyperalgesia and modulates the increased concentration of proinflammatory cytokines induced by ICV endotoxin injection. *Neuroscience*. 2003;121:865–873. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00500-1
36. Morris DC, Chopp M, Zhang L, Lu M, Zhang ZG. Thymosin beta4 improves functional neurological outcome in a rat model of embolic stroke. *Neuroscience*. 2010;169(2):674–182. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.017
37. Turrini P, Aloe L. Evidence that endogenous thymosin alpha-1 is present in the rat central nervous system. *Neurochem Int*. 1999;35(6):463–470. doi: 10.1016/S0197-0186(99)00084-4
38. Covelli V, Munno I, Altamura M, Decandia P, Pellegrino NM, Marcuccio C, Caradonna L, Jirillo E. Role of thymic hormones in neuroimmunomodulation. Their use in patients with phobic disorders. *Acta Neurol (Napoli)*. 1991;13(5):457–466.
39. Новоселецкая АВ, Киселева НМ, Зимина ИВ, Белова ОВ, Иноземцев АН, Арион ВЯ, Сергиенко ВИ. Стресспротективный эффект пептидов тимуса. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014;23:715–718.
40. Иноземцев АН, Новоселецкая АВ, Матвеева ОД, Аристова ВВ, Калужный АЛ, Шultzовский ВВ, Зимина ИВ, Арион ВЯ. Опиоидная система участвует в реализации анальгетических эффектов тактивина. *Доклады Академии наук*. 2013;430(5):1–4.
41. Helmy A, Guilfoyle MR, Carpenter KL, Pickard JD, Menon DK, Hutchinson PJ. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in severe traumatic brain injury: a phase II randomized control trial. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(5):845–851. doi: 10.1038/jcbfm.2014.23
42. Giles JA, Greenhalgh AD, Davies CL, Denes A, Shaw T, Coutts G, Rothwell NJ, McColl BW, Allan SM. Requirement for interleukin-1 to drive brain inflammation reveals tissue-specific mechanisms of innate immunity. *Eur J Immunol*. 2015;45(2):525–530 doi: 10.1002/eji.201444748
43. Mohan Kumar PS, ThyagaRajan S, Quadri S.K. Interleukin-1 stimulates the release of dopamine and dihydroxyphenylacetic acid from the hypothalamus in vivo. *Life Science*. 1991;48:925–930. doi: 10.1016/0024-3205(91)90040-1
44. Holzinger D, Becker H, Jacobi AM. Interleukin-1-mediated diseases. *Internist (Berl)*. 2013;54(4):408–415. doi: 10.1007/s00108-012-3186-3
45. Lotrich FE, Butters MA, Aizenstein H, Marron MM, Reynolds CF 3rd, Gildengers AG. The relationship between interleukin-1 receptor antagonist and cognitive function in older adults with bipolar disorder. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014;29(6):635–644. doi: 10.1002/gps.4048
46. Jones ME, Lebonville CL, Barrus D, Lysle DT. The role of brain interleukin-1 in stress-enhanced fear learning. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(5):1289–1296. doi: 10.1038/npp.2014.317
47. Reggiani PC, Here-ú CB, Rimoldi OJ, Brown OA, Pléau JM, Dardenne M, Goya RG. Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in thymectomized mice and rats. *Gene Ther*. 2006;13(16):1214–1221. doi: 10.1038/sj.gt.3302775
48. Rochfort KD, Cummins PM. Thrombomodulin regulation in human brain microvascular endothelial cells in vitro: role of cytokines and shear stress. *Microvasc Res*. 2015;97:1–5. doi: 10.1016/j.mvr.2014.09.003

49. Jung WR, Kim HG, Shin MK, Park DI, Kim KL. The effect of ganglioside GQ1b on the NMDA receptor signaling pathway in H19-7 cells and rat hippocampus. *Neuroscience*. 2010;165(1):159–167. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.10.012
50. Thyagarajan S, Felten DL. Modulation of neuroendocrine-immune signaling by L-deprenyl and L-desmethyldeprenyl in aging and mammary cancer. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2002;123:1065–1079. doi: 10.1016/S0047-6374(01)00390-6
51. Линькова НС, Полякова ВО, Кветной ИМ, Трофимов АВ, Севостьянова НН. Особенности эпифизарно-тимических взаимоотношений при старении. *Успехи геронтологии*. 2011;24(1):38–42.
52. Mocchegiani E, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Piacenza F, Lattanzio F, Basso A. Is there a possible single mediator in modulating neuroendocrine-thymus interaction in ageing? *Curr Aging Sci*. 2013;6(1):99–107. doi: 10.2174/1874609811306010013
53. Chereshev VA, Bocharov G, Bazhan S, Bachmetyev B, Gainova I, Likhoshvai V, Argilaguet JM, Martinez JP, Rump JA, Mothe B, Brander C, Meyerhans A. Pathogenesis and treatment of HIV infection: the cellular, the immune system and the neuroendocrine systems perspective. *Int Rev Immunol*. 2013;32(3):282–306. doi: 10.3109/08830185.2013.779375
54. Yong VW, Rivest S. Taking advantage of the systemic immune system to cure brain diseases. *Neuron*. 2009;64(1):55–60. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.035
55. Quan N, Herkenham M. Connecting cytokines and brain: a review of current issues. *Histol Histopathol*. 2002;17(1):273–288.
56. Denes A, Thornton P, Rothwell NJ. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun*. 2010;24(5):708–723. doi: 10.1016/j.bbi.2009.09.010
57. Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol*. 2010;40(3):599–606 doi: 10.1002/eji.201040319
58. Engelhardt B. Regulation of immune cell entry into the central nervous system. *Results Probl Cell Differ*. 2006;43:259–280 doi: 10.1007/400_020
59. Wainwright DA, Sengupta S, Han Y, Lesniak MS. Thymus-derived rather than tumor-induced regulatory T cells predominate in brain tumors. *Neuro Oncol*. 2011;13(12):1308–1323. doi: 10.1093/neuonc/nor134
60. Ogłodek E, Szota A, Just M, Moś D, Araszkiewicz A. The role of the neuroendocrine and immune systems in the pathogenesis of depression. *Pharmacol Rep*. 2014;66(5):776–781. doi: 10.1016/j.pharep.2014.04.009
61. Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*. 2010;16(11):1267–1276. doi: 10.1038/nm.2234

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Торховская Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
ФГБУН «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» РАН
Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, тел.: +7 (499) 248-40-08, e-mail: torti@mail.ru

Белова Ольга Владимировна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной
иммунологии и биохимии ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины»
ФМБА (ФГБУН «НИИ ФХМ» ФМБА)
Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, тел.: +7 (499) 246-43-42, e-mail: olgabelova49@yandex.ru

Зимина Ирина Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН «НИИ ФХМ» ФМБА
Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: Yangicher@yandex.ru

Крючкова Алина Викторовна, младший научный сотрудник ФГБУН «НИИ ФХМ» ФМБА
Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: likkavolkhova@mail.ru

Москвина Светлана Николаевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
ФГБУН «НИИ ФХМ» ФМБА
Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: kasya45@yandex.ru

Быстрова Ольга Витальевна, ассистент кафедры педиатрии медицинского института РУДН
Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6, e-mail: bystrova110@yandex.ru

Арион Виталий Яковлевич, доктор биологических наук, академик РАЕН, профессор,
главный научный сотрудник ФГБУН «НИИ ФХМ» ФМБА
Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: VYaarion@yandex.ru

Сергиенко Валерий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ,
академик РАН, директор ФГБУН «НИИ ФХМ» ФМБА
Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: olgabelova49@yandex.ru

Оценка рациональности применения антибактериальных препаратов

Обоснование исследования. ВОЗ считает проблему резистентности к антибактериальным препаратам серьезной угрозой человечеству. Одним из подходов к ее решению, в том числе с использованием образовательных программ, является ограничение применения антибактериальных препаратов. Однако эффективность образовательных программ, на которые тратятся время и деньги, пока не прослеживается. **Цель исследования.** Определение эффективности образовательной деятельности в сфере рационализации применения антибактериальных препаратов. **Методы.** Многоцентровое двухэтапное исследование практики применения антибактериальных препаратов и результативности образовательных программ, направленных на рационализацию антибактериальной терапии в Приморском крае. **Результаты.** Установлено, что программы, направленные только на обучение врачей, малоэффективны. Частота необоснованного применения антибактериальных препаратов остается высокой — 72,7 (в 2002–2003 гг.) и 70,4% (в 2011–2012 гг.). **Заключение.** Для повышения рациональности врачебных назначений антибактериальных препаратов необходимо образовательные программы сочетать с административными мероприятиями.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, клинический фармаколог, рациональное использование антибактериальных препаратов.

(Для цитирования: Гайнуллина Ю.И. Оценка рациональности применения антибактериальных препаратов. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 734–740. Doi: 10.15690/vramn567)

Обоснование

Среди угроз человечеству резистентность к антибактериальным препаратам занимает далеко не последнее место. По мнению О.П. Щепина с соавт., одна из причин увеличения числа летальных исходов от туберкулеза связана с ростом резистентности к антибактериальным препаратам вследствие их бесконтрольного применения в массовой практике [1].

Устойчивость бактерий к существующим антибиотикам названа Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) одной из главных угроз человечеству в нынешнем веке [2]. По некоторым прогнозам, уже через несколько лет мы можем оказаться практически без эффективных лекарств, так как с конца 1980-х гг. в мире не появилось ни одного принципиально нового класса этих препаратов [3].

Среди подходов к решению проблемы антибиотикорезистентности одним из главных, наряду с синтезом новых препаратов, является ограничение применения этой группы лекарственных средств: математическое моделирование дает возможность прогнозировать распространение резистентности и выявлять факторы, влияющие на скорость этого процесса, что в свою очередь открывает перспективы управления этим процессом [3, 4].

Таким образом, в отношении использования антибактериальных препаратов должен действовать принцип «минимальной достаточности».

Осознание этих положений отражено в ряде документов, принятых международными и национальными организациями:

- глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию антибиотикорезистентности, 2001 г. [5];
- копенгагенские рекомендации, принятые странами Европейского союза, 2001 г. [6].

К сожалению, результаты исследований согласованно свидетельствуют о том, что применение антибактериальных препаратов во многих случаях носит далеко не оптимальный характер: до 50% пациентов в стационаре и, по различным данным, от 16 до 97% — на амбулаторном этапе получают неадекватную антибактериальную терапию. Применение антибактериальных препаратов остается избыточным на протяжении многих лет [7–9]. Данные эпидемиологических исследований также свидетельствуют о нерациональном применении антибиотиков [10].

Так, в исследовании G. Togoobaatar и соавт. сообщается, что более 40% детей в Монголии принимают антибиотики для лечения инфекций дыхательных путей при отсутствии медицинских предписаний [11].

Yu.I. Gaynullina

Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Evaluation of Rational Use of Antibacterial Drugs

Background. WHO considers the problem of antimicrobial resistance to be the serious threat to humanity. One approach to solve it is to restrict the use of antimicrobials. This approach implies the implementation of educational programs. Such programmes take much time and money. However, the effectiveness of educational programs is not clear. **Aims:** determine the effectiveness of educational activities in the field of rationalization of the use of antibacterial drugs. **Materials and methods.** Two-stage multicenter research on the practice of antibacterial drugs application and the effectiveness of educational programs designed to rationalize antibiotic therapy in Primorsky Territory. **Results.** It was found that programs aimed only at the training of doctors are ineffective. The frequency of unjustified use of antimicrobials remains high — 72.7% (2002–2003) and 70.4% (2011–2012). **Conclusion.** To improve the rationality of medical prescriptions (antibacterial drugs) it is necessary to combine educational programs with management measures.

Key words: antibiotic resistance; clinical pharmacologist; rational use of antimicrobials.

(For citation: Gaynullina Yu.I. Evaluation of Rational Use of Antibacterial Drugs. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 734–740. Doi: 10.15690/vramn567)

В метаанализе Х. Yin и соавт. сообщают, что при лечении пациентов в амбулаторных условиях частота назначения антибиотиков составляла 74% [12].

Важной составляющей программ минимизации применения антибактериальных препаратов является так называемая периоперационная антибиотикопрофилактика.

В настоящее время дискуссии по поводу принципа минимальной достаточности при использовании антибактериальных препаратов практически завершены [13]. Большинство исследований подтверждает эффективность короткого курса применения антибактериальных средств. В зависимости от используемого антибиотика и длительности операции часто бывает достаточно введения всего одной дозы [14–16]. Препарат должен применяться до операции, внутривенно (в/в), во время вводного наркоза [17].

Встает вопрос о том, каким способом/способами можно добиться повышения рациональности использования этой группы препаратов. С этой целью применяются различные подходы — образовательные программы (чтение лекций, публикации рекомендаций и т.д.), административные мероприятия (формуляры, авторизация при назначении, санкции и т.д.). При этом наиболее продуктивным методом к сдерживанию антибиотикорезистентности признаны образовательные программы. На них тратятся время и деньги.

Однако не ясно, насколько эффективна стратегия образовательной деятельности в сфере рационализации применения антибактериальных препаратов. Именно поэтому определение эффективности образовательных программ стало **целью настоящего исследования**.

Методы

Дизайн исследования

Двухэтапное ретроспективное когортное мультицентровое исследование рациональности применения антибактериальных препаратов.

В качестве модели для оценки рациональности применения антибактериальных препаратов мы выбрали практику их назначения при выполнении оперативных вмешательств, так называемую периоперационную антибиотикопрофилактику.

Выбор данного направления оценки обусловлен тем, что назначение антибиотиков при выполнении ряда оперативных вмешательств, таких, например, как аппендэктомия при остром неосложненном аппендиците или удаление желчного пузыря, являются достаточно рутинными стандартизированными хирургическими вмешательствами. Применение периоперационной антибиотикопрофилактики в этих случаях способствует снижению риска возникновения инфекций в области хирургического вмешательства и сокращению общих затрат [13].

Доказана эффективность и достаточность применения одной дозы антибактериального препарата внутривенно за 30 мин до разреза.

Критерии соответствия

Критерии включения: отсутствие у пациента на момент лечения других заболеваний, требующих назначения системных антибактериальных препаратов; отсутствие у пациента перфоративного, осложненного аппендицита, осложненного холецистита, требующих антибактериальной терапии; отсутствие указаний на непереносимость антибактериальных препаратов.

Критерии исключения: пациентки с сопутствующей гинекологической патологией (при проведении аппендэктомии), неполные записи.

Условия проведения

При проведении исследования эффективности образовательных программ было произведено сравнение типичной практики применения антибактериальных препаратов в периоперационном периоде с существующими клиническими рекомендациями по их использованию.

На втором этапе исследования 7 лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ), в которых оперировались взрослые пациенты с острым аппендицитом, были разделены на 3 группы:

- ЛПУ, в которых не было службы клинической фармакологии (3 учреждения);
- ЛПУ, в которых существовала служба клинической фармакологии (2 учреждения);
- ЛПУ, в которых не только существовала служба клинической фармакологии, но и была наделена административными полномочиями (вопросы назначения антибактериальных препаратов контролировал либо главный врач, либо заместитель главного врача по лечебной работе); организаторы здравоохранения имели подготовку по клинической фармакологии (2 учреждения).

Было проведено сравнение рациональности применения антибактериальных препаратов в данных группах ЛПУ. Принимали во внимание, что при остром неосложненном аппендиците у взрослых пациентов повторные дозы антибактериальных препаратов не имеют преимуществ перед единственной дозой.

Продолжительность исследования

Исследование эффективности образовательных программ, направленных на рационализацию врачебных назначений, проводилось в два этапа: на первом этапе (2002–2003 гг.) проведено многоцентровое ретроспективное исследование качества периоперационной антибиотикопрофилактики в 7 стационарах Приморского края (n=531), по результатам которого применялись образовательные программы; второй этап на базе 7 стационаров (n=269) проведен в 2011–2012 гг.

Описание медицинского вмешательства

По завершении первого этапа исследования практики применения антибактериальных препаратов были проведены образовательные программы для врачей (чтение лекций, издание и распространение методических рекомендаций).

Исходы исследования

Основной исход исследования. Соответствие врачебных назначений национальным клиническим рекомендациям (адекватность выбора препарата для проведения периоперационной антибиотикопрофилактики, адекватность способа в/в введения препарата). Учитывалось время введения антибиотика: рациональным считалось применение препарата не ранее чем за 60 мин до разреза. Для оценки качества периоперационной антибиотикопрофилактики были использованы следующие индикаторы: частота проведения антибиотикопрофилактики по показаниям, частота выбора адекватного препарата, частота введения первой дозы до разреза, т.е. дооперационно, частота адекватного способа введения препарата.

Дополнительные исходы исследования не изучались.

Методы регистрации исходов

Сплошная ретроспективная выкопировка данных из историй болезней пациентов, отвечавших критериям включения, с использованием индивидуальной регистрационной карты. Данные заносились в таблицу методом двойного ввода. Лекарственные препараты учитывались по международному непатентованному наименованию. Диагнозы кодировались в соответствии с МКБ-10.

Этическая экспертиза

Данные из историй болезни пациентов были использованы в деперсонифицированном виде.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки. Истории болезни для проведения исследования во всех центрах выбирались сплошным методом. Ориентировочная погрешность при отклонении от нулевой гипотезы (p) принималась равной или меньшей 0,05. Расчетное количество историй болезни было увеличено в 2 раза в связи с ретроспективным характером исследования.

Методы статистического анализа данных. Статистическую обработку и анализ данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 2010, Statistica 10. При выполнении описательной статистики количественных, нормально распределенных признаков использовали среднее значение признака, стандартное отклонение. При сравнении двух независимых групп по одному признаку использовался критерий Манна–Уитни, трех независимых групп — ANOVA по Краскелу–Уоллису (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, H), медианный критерий, критерий χ^2 .

Результаты

Участники исследования

В нашей работе было проведено ретроспективное многоцентровое эпидемиологическое исследование периоперационной антибиотикопрофилактики при выполнении холецистэктомии у взрослых пациентов ($n=518$) и аппендэктомии у детей ($n=403$) в 2011–2012 гг.

Использование антибактериальных препаратов при выполнении аппендэктомии у взрослых пациентов являлось моделью для оценки динамики качества назначений данной группы лекарственных средств, а также клинической и экономической значимости проведения образовательных программ и программ авторизации. Данный сегмент исследования состоял из двух этапов. На первом (2002–2003 гг.) проведено многоцентровое ретроспективное исследование качества периоперационной антибиотикопрофилактики в 7 стационарах Приморского края ($n=531$), по результатам которого проводились образовательные программы, направленные на изменение подходов к использованию антибактериальных препаратов в хирургии. В 2011–2012 гг. проведен второй этап исследования на базе 7 стационаров ($n=269$).

Все стационары были разделены на три группы: в первой группе отсутствовала служба клинической фармакологии ($n=3$), во второй все это время работал врач клинический фармаколог ($n=2$). Особенностью третьей группы стационаров являлось то, что в них клинический фармаколог был наделен административными полномочиями. Он выполнял функции главного врача или его заместителя ($n=2$).

Основные результаты исследования

В результате исследования выявлены типичные дефекты процесса оказания медицинской помощи, обусловленные нерациональным применением антибактериальных препаратов.

Редкое применение периоперационной антибиотикопрофилактики. При выполнении холецистэктомии открытым способом у пациентов, имеющих факторы риска развития инфекции в области хирургического вмешательства (ИОХВ), а именно наличие конкрементов, обструкции общего желчного протока, недавних эпизодов острого холецистита, механической желтухи; оценка по шкале Американской ассоциации анестезиологов (ASA) 3 балла и более, возраст старше 60 лет, а также сопутствующей патологии ($n=131$; 87,3% от всех больных, подвергнутых холецистэктомии), обязательная периоперационная антибиотикопрофилактика была выполнена только в $35,1 \pm 4,2\%$, при аппендэктомии у детей — в $39,7 \pm 2,4\%$ случаев.

Избыточное применение периоперационной антибиотикопрофилактики без показаний. В группе пациентов без наличия факторов риска развития инфекции в ИОХВ ($n=19$), где холецистэктомия была проведена при помощи открытого способа, антибиотикопрофилактика, не являющаяся обязательной, была выполнена в 12 случаях, что является избыточным.

Избыточное назначение антибактериальных препаратов после операции без показаний. У пациентов при проведении холецистэктомии при помощи открытого способа без факторов риска развития ИОХВ антибактериальные препараты были назначены в 5 случаях из 19, что не соответствует стандарту. В случае наличия факторов риска развития ИОХВ антибактериальные препараты необоснованно были использованы у $44,3 \pm 18,8\%$. При холецистэктомии лапароскопическим методом антибактериальные препараты в послеоперационном периоде применялись у 32 ($8,7 \pm 1,5\%$) пациентов. У детей, подвергшихся аппендэктомии, антибактериальные препараты назначались в $98,8 \pm 0,5\%$ случаев.

Нерациональный выбор препаратов. Отмечено частое назначение препаратов, не входящих в клинические рекомендации по периоперационной антибиотикопрофилактике — цефоперазона, пefлоксацина, метронидазола.

Можно считать обоснованным, с точки зрения национальных клинических рекомендаций, выбор антибактериальных препаратов у 133 пациентов ($35,8 \pm 2,5\%$). Отмечаются значительные различия в степени соответствия антибактериальных препаратов клиническим рекомендациям в госпиталях — от 0,0 до 96,1%. Чаще всего реализуется адекватная программа выбора антибактериального препарата при наличии у клинического фармаколога административных полномочий, реже всего — при отсутствии в госпитале службы клинической фармакологии ($N=100,48$; $p<0,001$).

Неадекватное время введения препаратов. Нерациональное время при выполнении холецистэктомии отмечено у 3 пациентов, при выполнении аппендэктомии — у 2 детей.

В целом частота нерационального применения антибактериальных препаратов в хирургических стационарах являлась исключительно высокой. При лапароскопической холецистэктомии практика использования антибактериальных препаратов была нерациональной у всех пациентов, при холецистэктомии открытым способом пациентам, имевшим факторы риска развития ИОХВ, тактика периоперационной антибиотикопрофилактики нерациональна в $77,1 \pm 3,4\%$ случаев. При проведении

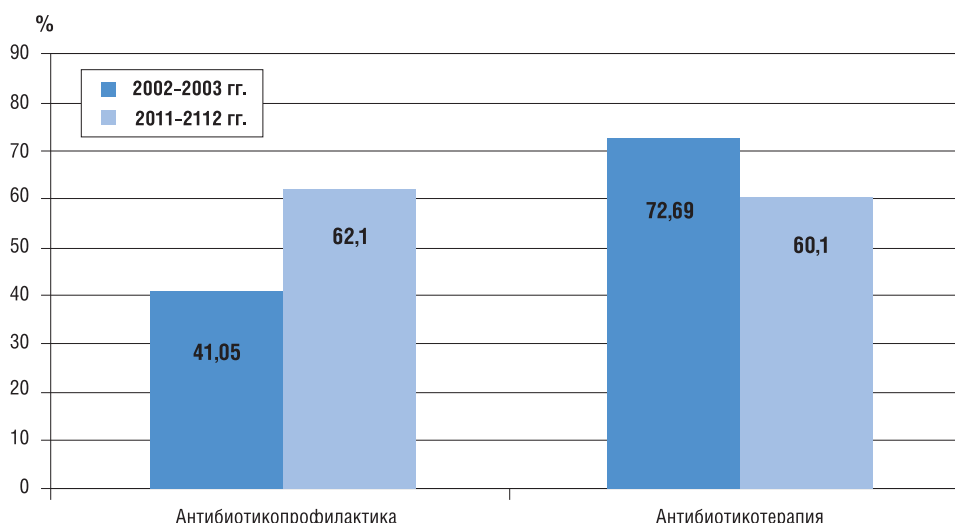


Рис. Динамика качества назначений антибактериальных препаратов при проведении аппендэктомии у взрослых

аппендэктомии у детей только в 0,5% случаев тактику использования антибактериальных препаратов можно было считать оправданной.

Как указывалось выше, использование антибактериальных препаратов при выполнении аппендэктомии у взрослых пациентов послужило моделью для оценки динамики в качестве назначений, эффективности образовательных и административных мероприятий. Оценка качества использования антибактериальных средств при выполнении аппендэктомии у взрослых проводилась в два этапа.

На первом этапе, в 2003–2004 гг., была проведена ретроспективная оценка качества использования антибактериальных препаратов при остром неосложненном аппендиците у взрослых. Выявлены дефекты оказания медицинской помощи: редкое применение периперационной антибиотикопрофилактики — $41,1 \pm 2,1\%$, неадекватный внутримышечный путь введения (рекомендуется в/в введение) — $79,0 \pm 1,7\%$, избыточное назначение антибактериальных препаратов в послеоперационном периоде — $72,7 \pm 1,9\%$ случаев. Следует отметить, что время введения антибактериальных препаратов — за 1 ч до начала наркоза — было адекватным у всех больных.

После первого этапа исследования были проведены образовательные программы, которые включали лекции и индивидуальные консультации для врачей, выпуск методических рекомендаций. При проведении анализа на втором этапе, в 2011–2012 гг., установлено повышение частоты применения периперационной антибиотикопрофилактики до $62,1 \pm 2,0\%$ (рис.).

Как видно из рис. 1, антибактериальные препараты стали использоваться реже, чем при исследовании в 2002–2003 гг. ($\chi^2 = 19,90$, $p < 0,001$), однако разница незначительна.

Процент отказа от использования антибактериальных препаратов различался: от 11,0% в стационарах, где клинический фармаколог обладал административными полномочиями, до 56,4% в учреждениях, где такая служба отсутствовала. Только в двух стационарах, где клинический фармаколог был наделен административными полномочиями, антибактериальные препараты в послеоперационном периоде чаще не назначалась, чем назначалась ($\chi^2 = 76,5$, $p < 0,0001$).

Преобладали адекватный — в/в — путь введения антибактериального препарата ($81,5 \pm 2,0\%$).

У 55 пациентов ($14,8 \pm 1,8\%$) в истории болезни отсутствовали указания о времени введения антибактериального препарата. В случае если клинический фармаколог

в госпитале обладал административными полномочиями, время от момента введения антибактериального препарата до операции указывалось всегда. Почти всегда время введения было рациональным и при отсутствии у клинического фармаколога административных полномочий. Однако, если в госпитале врач клинический фармаколог не работал, время введения антибактериального препарата указывалось в $31,7 \pm 5,2\%$ случаев.

Нежелательные явления

Учет нежелательных явлений не проводился.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Одним из стратегически важных направлений для снижения темпов развития резистентности является использование протоколов периперационной антибиотикопрофилактики [14, 18]. Однако наше исследование свидетельствует о низкой приверженности врачей современным рекомендациям.

Одной из основных проблем остается назначение антибактериальных препаратов в послеоперационном периоде без достаточных оснований (до 92–98% пациентов) [15, 16].

Таким образом, наряду с разработкой рекомендаций по использованию антибактериальных препаратов необходим поиск адекватных путей внедрения данных рекомендаций в практику и изменение существующего подхода врачей к этой проблеме. И, как показали наши исследования, интервенционные программы, направленные только на их обучение, малоэффективны.

Обсуждение основного результата исследования

Избыточное применение антибактериальных препаратов является традиционной проблемой.

Так, С.Е. Tourmousoglou и соавт. оценивали приверженность общих хирургов практическим рекомендациям по периперационному применению антибактериальных препаратов. Хотя только 78,5% операций требовали назначения антибиотиков, их использование достигло 97,5%. Продолжительность применения антибиотиков была адекватна только в 36,3% случаев [18].

В работе D.W. Bratzler и соавт. установлено, что только в 40,7% случаев введение антибактериальных препаратов было прекращено в пределах суток после операции [19].

Плешков В.Г. с соавт. сравнивали типичную практику применения антибактериальных препаратов с общепринятыми стандартами при операции кесарева сечения. Адекватная антибиотикопрофилактика была проведена в 24,9% случаев. Основными ошибками были несоблюдение сроков введения и нерациональный выбор антибактериального средства [20].

Ahmed Abdel-Aziz и соавт. указывают на избыточную продолжительность (96%) периоперационной антибиотикопрофилактики и расширение показаний к применению цефалоспоринов третьего поколения [21].

Попытки снизить частоту назначения антибактериальных препаратов при острых респираторных вирусных инфекциях и остром бронхите с использованием мер, направленных только на обучение врачей, не всегда эффективны [22, 23]. Одной из причин такого положения вещей S.A. Khan и соавт. называют недостаточную информированность врачей. Кроме того, отдельные специалисты воспринимают национальные руководства как «поваренную книгу медицины» (cookbook medicine), мешающую им принимать собственные решения. И только команда, включающая в том числе и клинического фармацевта, способна преодолеть эту проблему [24].

Следует отметить, что субъективные причины для некомфортной работы у врача существуют. Е.Н. Индейкин считает, что главной причиной сопротивления врачей при внедрении клинических рекомендаций является боязнь утраты контроля, потери профессиональной автономии. В рекомендациях они видят попытку отрицать сложность медицины, покушение на клиническое мышление. Более того, они прекрасно понимают, что ответственность за плохие исходы лежит на них, хотя контроль над лечением уже утрачен [25]. Именно поэтому мониторинг тактики антибактериальной терапии при конкретной нозологической форме в динамике является важным компонентом системы управления качеством медицинской помощи, так как подобные исследования позволяют оценить действенность мероприятий, направленных на оптимизацию использования антибактериальных препаратов [26].

М. O'Reilly и соавт. оценивали приверженность врачей принципам периоперационной антибиотикопрофилактики при внедрении программ «обратной связи». Перед началом проекта только 69% пациентов получали адекватную периоперационную антибиотикопрофилактику в пределах до 60 мин до разреза, в конце — рациональность применения антибактериальных препаратов увеличилась до 92% [27].

Z. Ozkurt и соавт. показали, что после внедрения программ авторизации использование антибактериальных препаратов ограниченного доступа было уменьшено до 44%. Ученые считают, что только при наличии у клинического фармаколога полномочий возможно изменение сложившихся стереотипов использования антибактериальных препаратов [28].

Наши результаты согласуются с данным S.R. Arnold и соавт. Авторы провели систематический обзор влияния интервенционных вмешательств на сложившуюся практику использования антибактериальных препаратов и установили низкий эффект образовательных программ. Они считают, что необходимо образовательные программы сочетать с мерами административного регулирования [29].

По нашим данным, эффективно работающая служба клинической фармакологии является центральным компонентом системы под названием «рациональное на-

значение антибиотиков». Отмечена четкая зависимость частоты рациональности назначения антибактериальных препаратов в зависимости от наличия службы клинической фармакологии в медицинской организации и статуса данной службы, которая прослеживается как на амбулаторном, так и на стационарном этапе лечения пациентов.

Схожие результаты получили и другие авторы при интервенционных программах, направленных на улучшение качества назначений антибактериальных препаратов как в периоперационном периоде [17], так и при другой патологии. Такие результаты можно объяснить негативным отношением врачей к вмешательству в оказании медицинской помощи со стороны администраторов, поскольку специалисты считают, что только они вправе определять оптимальное ведение пациента [30].

По результатам нашего исследования необходимо обосновать обязательность наличия административных полномочий у врача клинического фармаколога, так как только в этом случае мы видим реальное снижение необоснованного использования антибактериальных препаратов. S.A. Khan и соавт. показали, что локальные стандарты периоперационной антибиотикопрофилактики выполнялись более тщательно, чем национальные [24]. Именно поэтому вторым важным фактором, обеспечивающим качество назначений антибактериальных препаратов, являются корректировка национальных стандартов применительно к местным условиям и создание региональных клинических рекомендаций, так как в этом случае приверженность к рекомендациям становится выше.

Ограничения исследования

Исследование проводилось в Приморском крае, и его результаты с осторожностью могут быть экстраполированы на другие территории.

Заключение

Эффективность программ авторизации является более высокой, чем эффективность образовательных программ. При проведении только образовательных программ повышается частота оправданного назначения антибактериальных препаратов в предоперационном периоде — с 41,1 (в 2002–2003 гг.) до 56,4% (в 2011–2012 гг.). При этом частота необоснованного применения антибиотиков в послеоперационном периоде остается высокой — 72,7 (в 2002–2003 гг.) и 70,4% (в 2011–2012 гг.). Только в случаях дополнения образовательных программ административными мероприятиями частота оправданного назначения антибактериальных препаратов может увеличиваться до 96,1% в предоперационном периоде при снижении неоправданного применения антибактериальных препаратов до 34,7% после операции.

Закрепление за врачом клиническим фармакологом административных полномочий приведет к улучшению качества периоперационной антибиотикопрофилактики (адекватно подбирается сам препарат, а также время и путь его введения) и ее снижению в послеоперационном периоде.

Стратегия рационального использования антибиотиков — одна из важнейших задач современной медицины. Низкий уровень инфекционного контроля способствует распространению антибиотикорезистентности. Все это происходит на фоне недопонимания проблем в данной сфере. Проблема оптимизации использования антибакте-

риальной терапии должна стать одним из основных элементов лекарственной политики на всех уровнях управления [26].

Источник финансирования

Исследование осуществлялось на базе Государственного учреждения «Территориальный фонд обязательного медицинского страхования Приморского края» (до 2011 г.), на базе Дальневосточного федерального университета, Владивосток (с 2012 г.).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Выражение признательности

Автор благодарит заведующего лабораторией молекулярной и клеточной нейробиологии ДВФУ, канд. мед. наук И.С. Брюховецкого за ценные рекомендации при подготовке рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

- Щепин ОП, Белов ВБ, Роговина АГ. Современная медико-демографическая ситуация в России. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2009;6:3–8.
- World Health Organization Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014; 234 p. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1 (Available: 22.11.2015).
- Арепьева МА, Колбин АС, Курылев АА, Балыкина ЮЕ, Сидоренко СВ. Систематический обзор математических моделей, применяемых для прогнозирования развития резистентности бактерий к антибиотикам. *Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия*. 2014;16(2):137–143.
- Davey P, Brown E, Charani E, Fenelon L, Gould IM, Holmes A, Ramsay CR, Wiffen PJ, Wilcox M. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;4:CD003543.
- WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance, 2001. World Health Organization. URL: <http://www.who.int/drug-resistance/summaryR.pdf>. (Available: 22.11.2015).
- Prudent use of antimicrobial agents in human medicine. URL: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=URISERV:c11569> (Available: 22.11.2015).
- Barnett ML, Linder JA. Antibiotic prescribing for adults with acute bronchitis in the United States, 1996–2010. *JAMA*. 2014;311(19):2020–2022. doi: 10.1001/jama.2013.286141
- Putnam LR, Chang CM, Rogers NB, Podolnick JM, Sakhuja S, Matuszczak M. et al. Adherence to surgical antibiotic prophylaxis remains a challenge despite multifaceted interventions. *Surgery*. 2015;158(2):413–419. doi: 10.1016/j.surg.2015.04.013
- Kronman MP, Zhou C, Mangione-Smith R. Bacterial prevalence and antimicrobial prescribing trends for acute respiratory tract infections. *Pediatrics*. 2014;134(4):956–965. doi: 10.1542/peds.2014-0605
- Красножон ТВ, Дьяченко СВ, Адаев АМ, Бондаренко ОА. Фармакоэпидемиологический анализ использования анти-микробных препаратов в многопрофильном хирургическом стационаре. *Вестник общественного здоровья и здравоохранения Дальнего востока России*. 2013;3:118–121.
- Togoobaatar G, Ikeda N, Ali M, Sonomjamts M, Dashdemberel S, Mori R, Shibuya K. Survey of non-prescribed use of antibiotics for children in an urban community in Mongolia. *Bull World Health Organ*. 2010;88:930–936. doi: 10.2471/BLT.10.079004
- Yin X, Song F, Gong Y, Tu X, Wang Y, Cao S. et al. A systematic review of antibiotic utilization in China. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(11):2445–2452. doi: 10.1093/jac/dkt223.
- Clinical Practice Guidelines for Antimicrobial Prophylaxis in Surgery ASHP Therapeutic Guidelines American Society of Health System Pharmacists 2013. P. 582–666. URL: <http://www.ashp.org/surgical-guidelines> (Available: 22.11.2015).
- Togo Y, Taoka R, Yamamoto S, Hiyama Y, Uehara T, Hashimoto J. et al. A questionnaire Survey of Antimicrobial Prophylaxis to Prevent Perioperative Infection in Urological Field in Japan. *Japanese Journal of Urology*. 2013;104(4):579–588. doi: 10.5980/jpnjurol.104.579
- Ozgun H, Ertugrul BM, Soyder A, Ozturk B, Aydemir M. Peri-operative antibiotic prophylaxis: adherence to guidelines and effects of educational intervention. *Int J Surg*. 2010;8(2):159–163. doi: 10.1016/j.ijsu.2009.12.005
- Classen D, Evans R, Pestotnik S, Horn S, Menlove R, Burke J. The timing of prophylactic administration of antibiotics and the risk of surgical infection *N Engl J Med*. 1992;326:281–286. doi: 10.1056/NEJM199201303260501
- Nelson RL, Glenny AM, Song F. Antimicrobial prophylaxis for colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;1:CD001181. doi: 10.1002/14651858.CD001181.pub3.
- Tourmousoglou CE, Yiannakopoulou ECh, Kalapothaki VC, Bramis JJ, Papadopoulos St. Adherence to guidelines for antibiotic prophylaxis in general surgery: a critical appraisal. *J Antimicrob Chemotherapy*. 2008;61(1):214–218. doi: 10.1093/jac/dkm406
- Bratzler DW, Houck PM, Richards C, Steele L, Dellinger EP, Fry DE. et al. Use of antimicrobial prophylaxis for major surgery: baseline results from the National Surgical Infection Prevention Project. *Arch Surg*. 2005;140(2):174–182. doi: 10.1001/archsurg.140.2.174
- Плешков ВГ, Голуб АВ, Москалев АП, Галкин Д.В., Козлов Р.С. Антибактериальная профилактика и качество ее проведения в абдоминальной хирургии. *Инфекции в хирургии*. 2007;5(2):21–28.
- Abdel-Aziz A, El-Menyar A, Al-Thani H, Zarour A, Parchani A, Asim M. et al. Adherence of surgeons to antimicrobial prophylaxis guidelines in a tertiary general hospital in a rapidly developing country. *Adv Pharmacol Sci*. 2013;2013:842593. doi: 10.1155/2013/842593.
- Ackerman SL, Gonzales R, Stahl MS, Metlay JP. One size does not fit all: evaluating an intervention to reduce antibiotic prescribing for acute bronchitis. *BMC Health Serv Res*. 2013;13:462. doi: 10.1186/1472-6963-13-462
- Lalana-Josa P, Laclaustra-Mendizábal B, Aza-Pascual-Salcedo MM, Carcas-de-Benavides C, Lallana-Álvarez MJ, Pina-Gadea MB. Does the prescribing of antibiotics in paediatrics improve after a multidisciplinary intervention? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(2):78–83. doi: 10.1016/j.eimc.2014.05.017.
- Khan SA, Rodrigues G, Kumar P, Rao PG. Current challenges in adherence to clinical guidelines for antibiotic prophylaxis in surgery. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2006;16(6):435–437. doi:10.3746/JCPSP.435437.
- Индеев ЕН. Место практических рекомендаций в системе управления качеством медицинской помощи. *Вопросы экспертизы и качества медицинской помощи*. 2009;5:8–12.
- Fridkin S, Baggs J, Fagan R, Magill S, Pollack LA, Malpiedi P. et al. Vital signs: improving antibiotic use among hospitalized patients. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014;63(9):194–200.

27. O'Reilly M, Talsma A, VanRiper S, Kheterpal S, Burney R. An anesthesia information system designed to provide physician-specific feedback improves timely administration of prophylactic antibiotics. *Anesth Analg*. 2006;103(4):908–912. doi: 10.1213/01.ane.0000237272.77090.a2
28. Ozkurt Z, Erol S, Kadanali A, Ertek M, Ozden K, Tasyaran MA. Changes in antibiotic use, cost and consumption after an antibiotic restriction policy applied by infectious disease specialists. *Jpn J Infect Dis*. 2005;58(6):338–343.
29. Arnold SR, Straus SE. Interventions to improve antibiotic prescribing practices in ambulatory care. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;4:CD003539. doi: 10.1002/14651858.CD003539.pub2
30. Гончаров НГ, Воробьев ПА, Авксентьева МВ, Оранская ОВ, Акимова ОС, Лукьянцева ДВ, Тюрина ИВ. Создание системы управления качеством в центральной клинической больнице Российской академии наук. *Проблемы стандартизации в здравоохранении*. 2008;4:3–7.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Гайнуллина Юлия Игоревна, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической и экспериментальной хирургии Школы биомедицины Дальневосточного федерального университета

Адрес: 690922, Владивосток, о. Русский, НП «Аякс», д. 10, кампус ДВФУ, **e-mail:** yuliadoc12.y@yandex.ru

Уничтожение фармацевтической продукции как элемент эффективности государственного контроля (надзора) за обращением лекарственных средств

Современная система государственного контроля качества лекарственных средств позволяет выявлять и изымать из обращения лекарственные препараты (ЛП), не соответствующие установленным требованиям. Однако проблема оборота недоброкачественных, контрафактных и фальсифицированных лекарств и их уничтожения в Российской Федерации (РФ) по-прежнему актуальна. **Цель исследования:** провести оценку эффективности государственного контроля качества ЛП и сложившейся в РФ практики соблюдения субъектами обращения ЛП правил их уничтожения. **Методы:** в исследование включали данные официальных сайтов Министерства здравоохранения РФ и Республики Северная Осетия-Алания (РСО-Алания), Росздравнадзора, ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» Минздрава РСО-Алания (РЦККиСЛС). При социологических исследованиях использовали метод бесповторной выборки. Всего обработано 225 анкет. Исследование проводилось в Северо-Осетинской государственной медицинской академии в период с 2013 по 2015 г. совместно с РЦККиСЛС. **Результаты:** исследованы отдельные недостатки осуществления государственного контроля (надзора) за соблюдением субъектами обращения лекарственных средств правил их уничтожения. Сделан вывод о том, что не установлен порядок и механизм охвата мониторингом постоянного сбора информации о выявлении, перемещении, уничтожении недоброкачественных и фальсифицированных, контрафактных, приостановленных и вызывающих сомнения ЛП. Подтверждена неэффективность контрольно-надзорных мероприятий организационного характера в условиях критического дефицита необходимой нормативной правовой базы. Проведен анализ терминологии, характеризующей порядок уничтожения лекарственных препаратов. **Заключение:** недостатки, связанные с осуществлением государственного контроля за соблюдением субъектами обращения лекарственных препаратов правил уничтожения недоброкачественной и фальсифицированной продукции, выявленные в результате проведенных исследований, доказывают необходимость принятия мер по созданию новой модели осуществления контрольно-надзорных функций, повышающей общие результаты деятельности, основой которой должны стать критерии эффективного взаимодействия участников противодействия обороту нестандартных ЛП, в том числе и выработка отсутствующих понятий и терминологии. **Ключевые слова:** государственный контроль, качество лекарственных средств, государственный надзор, фальсифицированные лекарства, недоброкачественные лекарства, уничтожение лекарственных препаратов.

(Для цитирования: Бидарова Ф.Н. Уничтожение фармацевтической продукции как элемент эффективности государственного контроля (надзора) за обращением лекарственных средств. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 741–747. Doi: 10.15690/vramn585)

741

F.N. Bidarova^{1,2}¹ North-Ossetian State Medical Academy, the Republic of North Ossetia-Alania, Vladikavkaz, Russian Federation² Republican Center of Quality Control and Certification of Medicines, the Republic of North Ossetia-Alania,
Vladikavkaz, Russian Federation

The Destruction of Pharmaceutical Products as an Element of the Efficiency of State Control (Supervision) Over the Circulation of Medicines

Background: The modern system of state quality control over medicine makes it possible to reveal and withdraw drugs, that do not meet the requirements. However the problem of the turnover of substandard and fake drug and their destruction in the Russian Federation is still urgent. **The aim of the study:** to evaluate the effectiveness of state quality control over medicine and the practice of fake medicine destruction. **Methods:** data of the official websites of the Ministry of Health of the Russian Federation and the Republic of North Ossetia — Alania, Russian Sanitary Inspection, National Center of Quality control and Certification of Drugs were included in the investigation. Method of unrepeatable samples was used in sociological investigations. 225 questionnaires have been worked out. The research was carried out in the North-Ossetian State Medical academy during the period from 2013 to 2015 with the help of the National Center of Quality Control and Certification of Drugs. **Results:** The shortcomings of the state quality control over the rules of fake drug destruction were studied. It was found out that the mechanism of permanent data collection monitoring of revealing, moving and destruction of substandard and fake drug destruction has not been determined. The ineffectiveness of controlling measures under the condition of critical legal base deficiency has been confirmed. The analysis of terminology characterizing the order of fake drug destruction was carried out. **Conclusion:** deficiencies related to the implementation of the state quality control over the fake drug destruction rules revealed during the course of investigations prove the necessity of adopting measures in creating new model of control functions, increasing the results of activity.

Key words: state control, drugs unfit for medical use, state inspective system, drugs turnover, low quality medicines, destruction of medications.

(For citation: Bidarova F.N. The Destruction of Pharmaceutical Products as an Element of the Efficiency of State Control (Supervision) Over the Circulation of Medicines. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (6): 741–747. Doi: 10.15690/vramn585)

Обоснование

С 2004 г. в России радикально реформируется система государственного контроля качества лекарственных средств, что позволяет выявлять и изымать из обращения лекарственные препараты (ЛП), не соответствующие установленным требованиям; тем не менее проблема некачественных ЛП и их уничтожения в Российской Федерации (РФ) по-прежнему актуальна [1]. Отсутствуют официальные данные об объемах фальсифицированных и недоброкачественных ЛП (НДЛП). Наблюдается расхождение оценок размеров оборота фальсифицированных ЛП в РФ. Точно отследить число лекарственных подделок на российском фармацевтическом рынке невозможно, а все показатели, касающиеся доли фальсификатов, являются примерными [2]. Именно поэтому вполне ожидаемо и то, что в настоящее время на фармацевтическом рынке имеются в обращении непригодные к использованию лекарственные средства, которые представляют опасность для здоровья человека.

Цель исследования: проанализировать эффективность государственного контроля качества ЛП и сложившейся в РФ практики соблюдения субъектами обращения ЛП правил уничтожения фальсифицированной и недоброкачественной продукции.

Методы

Дизайн исследования

В настоящей статье представлены результаты этапа исследований по изучению особенностей государственного регулирования в системе контроля качества ЛП, определению степени соответствия проводимых в регионах мер действующему законодательству в сфере обращения ЛП, уточнению основных понятий и терминов.

Условия проведения

С целью изучения ситуации на фармацевтическом рынке РСО-Алания, в рамках подготовки к обсуждению на заседании Совета экономической и общественной безопасности РСО-Алания вопроса «Об эффективности контроля качества фармацевтической продукции и биологически активных добавок, поступающих в медицинские учреждения и реализуемых аптечной сетью РСО-Алания» была создана межведомственная рабочая группа. В ее состав входили специалист-эксперт Росздравнадзора по РСО-Алания, специалист-эксперт отдела лицензирования Министерства здравоохранения РСО-Алания, начальник Республиканского центра контроля качества и сертификации лекарственных средств, ведущий специалист-эксперт отдела санитарного надзора Роспотребнадзора по РСО-Алания.

Продолжительность исследования

Исследования проводились в Северо-Осетинской государственной медицинской академии и Республиканском центре контроля качества и сертификации лекарственных средств Минздрава Республики Северная Осетия-Алания в период с 2013 по 2015 г. Анкетирование проведено в апреле 2014 г.

Исходы исследования

Оценивали качество исполнения контрольно-надзорных функций органами исполнительной власти в сфере обращения ЛП и эффективность взаимодей-

ствия участников системы противодействия обороту недоброкачественных, фальсифицированных и контрафактных ЛП.

Методы регистрации исходов

Основными методами оценки эффективности контрольно-надзорной практики Росздравнадзора и его территориальных органов при реализации ими своих полномочий в вопросах государственного контроля качества лекарственных средств и порядка их уничтожения были выбраны факторный и контент-анализ документального наблюдения.

Для фактического анализа использовались:

- отчетные данные организации по уничтожению ЛП на территории республики ОАО «Стандарт» за 2013 и 2014 гг, в разрезе структуры фактического уничтожения ЛП фармацевтическими организациями и количества серий ЛП;
- обобщенные данные итоговых официальных отчетов, ежегодных докладов о состоянии рынка ЛП, подготовленных Росздравнадзором (РЗН) и территориальным органом Росздравнадзора (ТО РЗН);
- данные справки по результатам межведомственного взаимодействия Совета экономической и общественной безопасности (СЭиОБ) по РСО-Алания;
- данные материалов социологического исследования (анкетирования) фармацевтических организаций.

В исследование включены результаты всех (16 аптечных и 3 оптовых) проведенных совместных проверок межведомственной рабочей группы совета экономической и общественной безопасности и представителей прокуратуры РСО-Алания. Обобщены результаты проверок СЭиОБ, которые сравнивали с итоговыми данными контрольно-надзорных мероприятий ТО РЗН за предшествующий период. Результаты проверок межведомственной рабочей группы также сравнивали с итоговыми данными контрольно-надзорных мероприятий ТО РЗН за предшествующий период.

Проведено анкетирование специалистов фармацевтических организаций (одно аптечное учреждение заполняло анкету только один раз). В анкетирование включали представителей аптечных организаций, функционирующих на территории РСО-Алания и имеющих различную форму собственности, заключивших договор на оказание услуг с ГБУЗ «РЦККиСЛС» РСО-Алания. Отбор участников осуществлялся по случайному принципу. Анкеты, полученные от респондентов, были проверены на правильность и полноту заполнения и затем обработаны с применением математико-статистического анализа. В начале исследования проведено пилотное анкетирование с участием 58 фармспециалистов для коррекции анкет. На основе анализа результатов анкетирования проведен поиск взаимосвязи исследуемых процессов (помещение, нахождение и перемещение ЛП в карантинную зону, а также уничтожение ЛП с неэффективностью работы как самих субъектов фармацевтического обращения, так и системы государственного контроля качества ЛП).

Исходной информацией, обеспечивающей достоверность, надежность и точность выводов, служили данные официальных сайтов Министерства здравоохранения Российской Федерации, показатели деятельности Росздравнадзора, территориальных органов Росздравнадзора, информационно-аналитического центра Минздрава РСО-Алания, ГБУЗ «РЦККиСЛС» МЗ РСО-Алания, региональных экспертных испытательных лабораторий, а также результаты межведомственного взаимодействия СЭиОБ по РСО-Алания.

Количественной оценке подвергли следующие данные:

- наличие карантинной зоны в аптечном учреждении;
- месторасположение карантинной зоны в организации;
- соответствие условий хранения для ЛП, находящихся в карантинной зоне (температура, влажность);
- движение ЛП в карантинной зоне (наличие акта об уничтожении);
- перемещение в карантинной зоне забракованных или приостановленных ЛП;
- наличие договора с организацией, имеющей право на уничтожение ЛП на территории республики, или с иной такой организацией, имеющей лицензию на деятельность по сбору, использованию, обезвреживанию, транспортировке и размещению отходов I–IV класса опасности;
- фактическое уничтожение ЛП;
- фактическое наличие ЛП в карантинной зоне на момент анкетирования.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

В республике функционируют 487 субъектов фармацевтического обращения, имеющих лицензию на фармацевтическую деятельность: 198 аптек, 289 аптечных пунктов. Для репрезентативной выборки достаточно было исследовать 200 аптечных организаций (для обеспечения доверительной вероятности в 0,95 и ошибки не более 10%).

Методы статистического анализа данных

Расчеты проводили с применением стандартного статистического пакета Microsoft Excel for Windows (2010). Количественные данные представлены в виде абсолютных значений (частота ответов) и среднего арифметического.

Результаты

Объект исследования

В процессе проведения исследования в рамках совместных проверок субъектов фармацевтического обращения в составе рабочей группы СЭиОБ по РСО-Алания проверено 16 аптечных и 3 оптовые организации, расположенные на территории РСО-Алания. Схемы исполнения порядка уничтожения ЛП в этих структурах сходны. Отбор субъектов контроля осуществлялся представителями прокуратуры. Совместные проверки проводили в рамках внеплановых мероприятий.

В анкетировании приняли участие 225 специалистов фармацевтических организаций: представители руководящего состава или назначенные ответственными за обе-

спечение системы качества. В анкетирование включали фармацевтические организации, расположенные в двух муниципальных образованиях РСО-Алания (Владикавказ и Беслан).

Основные результаты исследования

В ходе анкетирования субъектов фармацевтического обращения в республике дополнительно визуально фиксировались и другие отклонения. Так, у 100% прошедших анкетирование организаций карантинная зона была представлена отдельной коробкой с маркировкой «карантинная зона», а ЛП, помещенные в специально выделенную (карантинную) зону отдельно от других лекарственных средств, до их идентификации или уничтожения не имели необходимой маркировки. Недоброкачественные и фальсифицированные ЛП также не имели четкой маркировки, указывающей на то, что товар фальсифицирован и/или отозван с рынка. ЛП, требующие особых условий хранения, содержались в карантинной зоне с нарушением требований.

Неэффективность имеющихся нормативно-правовых актов сферы регулирования организационного характера, а также низкая исполнительская дисциплина субъектов фармацевтического обращения подтверждаются результатами совместных проверок субъектов фармацевтического обращения в 2011 г. в составе рабочей группы СЭиОБ по РСО-Алания. Так, установлено отсутствие комплекса мероприятий по выявлению НДЛП, в том числе по организации внутренних проверок на наличие признаков фальсификации ЛП (реализация НДЛП, а также впервые выявленный брак, подлежащий изъятию; табл. 1).

По результатам анкетирования, 30% фармацевтических организаций имеют неправильное месторасположение карантинной зоны, у 55% карантинная зона находится изолированно от других групп ЛП, но не поддерживаются необходимые условия хранения (температура, влажность), и только у 15% карантинная зона обнаружена в надлежащем состоянии. Установленный факт является подтверждением того, что карантинная зона фармацевтических организаций носит формальный характер, т.е. организуется только на время проверок контрольно-надзорными организациями. Никто из респондентов не занимается фактическим уничтожением ЛП, при этом только у 3% опрошенных подписан договор с организацией, имеющей право на уничтожение ЛП на территории республики.

Не смогли подтвердить фактическое нахождение ЛП в карантинной зоне за длительный период 65% опрошенных субъектов, что подтверждает неэффективную работу фармацевтических организаций с письмами РЗН об изъятии ЛП. Эти письма публикуются на сайте ежедневно,

Таблица 1. Справка Совета экономической и общественной безопасности по РСО-Алания по результатам проверок фармацевтических (ФО) и медицинских (МО) организаций республики

Наименование	Результат, %
Отсутствие комплекса мероприятий в МО и ФО по выявлению НДЛП, подлежащих изъятию, по письмам РЗН	58
Отсутствие в ФО внутренних проверок на наличие признаков фальсификации ЛП	70
Наличие в реализации НДЛП, указанных в информационных письмах Росздравнадзора	50
Отсутствие информирования ТО РЗН о проводимых мероприятиях по изъятию НДЛП субъектами фармацевтического обращения фальсифицированных и других ЛП, подлежащих изъятию по письмам РЗН	80
Выявлены забракованные ЛП (впервые выявленный брак), подлежащие изъятию из обращения: 15 серий из 56 отобранных образцов (32 упаковки на сумму 317 тыс. рублей)	26,7

Примечание. НДЛП — недоброкачественные лекарственные препараты, РЗН — Росздравнадзор, ТО РЗН — территориальные органы Росздравнадзора.

что является основанием постоянного движения и перемещения ЛП в карантинную зону.

Только 1% субъектов фармацевтического обращения смогли предоставить акты об уничтожении ЛП, у остальных респондентов соответствующих документов не оказалось. Это подтверждает тот факт, что уничтожение ЛП происходит незаконными методами или не происходит совсем, продлевая, таким образом, сроки нахождения недоброкачественных и фальсифицированных ЛП на фармацевтическом рынке.

Анализ структуры фактического уничтожения ЛП фармацевтическими организациями за период 2012–2013 гг. на территории РСО-Алания на основании 42 актов об уничтожении лекарственных средств показал, что из 15 фармацевтических субъектов, заключивших договор с ОАО «Стандарт», только 5 организаций за этот период осуществили фактическое уничтожение ЛП. Характерно, что все серии ЛП были уничтожены только по одному показателю: «Истечение срока годности». В то же время за период 2012–2013 гг. было официально опубликовано 1060 писем РЗН об изъятии фальсифицированных и недоброкачественных лекарственных средств на территории РФ, в которых содержалась информация о 2917 сериях ЛП, подлежащих изъятию или требующих приостановления их обращения. Эти ЛП могли присутствовать в обращении на территории РСО-Алания, что также подтверждает вероятность реализации нестандартных ЛП на фармацевтическом рынке.

Дополнительные результаты исследования

По результатам совместных проверок субъектов фармацевтического обращения в составе рабочей группы СЭиОБ в регионе также установлено:

- отсутствие организации карантинной зоны, движения и перемещения в ней забракованных или приостановленных ЛП в 43% случаев из общего числа обследованных аптечных организаций республики;
- отсутствие договоров с организацией, имеющей право на уничтожение ЛП на территории республики, с ОАО «Стандарт» или с иной такой организацией, имеющей лицензию на деятельность по сбору, использованию, обезвреживанию, транспортировке и размещению отходов I–IV класса опасности в 96% случаев.

Ряд проблем связан и с тем, что вне рамок государственного контроля качества в регионах остаются отдельные группы ЛП, которые реализуются субъектами

фармацевтического обращения, но не подтверждены процессом перемещения ЛП в карантинную зону и обратно (табл. 2).

Обсуждение

Сочетание различных методов исследования позволило выявить пробельные и неэффективные места контрольно-надзорной функции и практики исполнения субъектами фармацевтического обращения правил уничтожения, требующие дальнейшего совершенствования нормативно-правовой базы сферы регулирования.

Резюме основного результата исследования

Субъекты фармацевтического обращения реализуют не подтвержденную переконтролем медицинскую продукцию, заведомо зная, что ее подлинность находится под сомнением. Проведенный анализ свидетельствует о неполноте объемов выявления и изъятия из обращения уполномоченными органами недоброкачественных, фальсифицированных ЛП, а также ЛП, подлинность которых вызвала сомнение. Это также влияет на итоговые результаты и объемы по выявлению фальсифицированных лекарственных средств и НДЛП и свидетельствует о том, что официальные данные, касающиеся доли ФЛС и НДЛП, не отражают реальных значений и, по всей вероятности, занижены.

Обсуждение основного результата исследования

В нашей стране одним из видов государственного контроля обращения ЛП является осуществление проверок по соблюдению отдельными субъектами основных правил изъятия из оборота и уничтожения недоброкачественной продукции, а именно ЛП, в результате которых уполномоченный орган осуществляет следующие мероприятия:

- получение и обработка данных, касающихся соблюдения отдельными субъектами правил изъятия и уничтожения недоброкачественной продукции;
- проведение плановых и внеплановых проверок по выявлению соблюдения требований по изъятию и уничтожению недоброкачественных ЛП.

В свою очередь территориальные органы исполнительной власти по субъектам РФ должны:

- обеспечить получение достоверной информации о соблюдении и выполнении субъектами обращения

Таблица 2. Информация базы данных экспертной организации по результатам мониторинга качества ЛП при ввозе на территорию республики

Группы лекарственных препаратов	Число лекарственных препаратов (2011–2013 гг.)	Результаты
Впервые вызвавшие сомнение в подлинности (ФЛС, подлежащие в соответствии с письмами РЗН переконтролю в испытательной лаборатории (по результатам экспертизы)	19	На переконтроль в ЭО не поступили В ТО РЗН информацию не предоставляли В карантинную зону ЛП не перемещались
ЛП, подлежащие дальнейшей реализации, ранее приостановленные письмами ТО РЗН в связи с сомнением в их подлинности	30	Отсутствие движения и перемещения в карантинной зоне В ТО РЗН информацию не предоставляли
ЛП, находящиеся на остатках в фармацевтических и медицинских организациях, на момент поставки которых сведения в базе данных РЗН отсутствовали, но были внесены туда позже (при повторной обработке реестров сертификатов)	304	В ТО РЗН информацию не предоставляли

Примечание. ФЛС — фальсифицированное лекарственное средство, НДЛП — недоброкачественные лекарственные препараты, РЗН — Росздравнадзор, ТО РЗН территориальный орган Росздравнадзора, ЭО — экспертная организация.

лекарственных средств правил уничтожения недоброкачественных ЛП;

- обеспечить проведение плановых и внеплановых проверок соблюдения субъектами обращения лекарственных средств правил уничтожения ЛП и представление в Росздравнадзор данных результатов проверок.

С учетом существующих положений Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» и Постановления Правительства РФ от 03.09.2010 № 674 в нашей стране утверждены Правила уничтожения недоброкачественных, фальсифицированных и контрафактных ЛП. В соответствии с вышеуказанными правилами Росздравнадзор в случае выявления обращения на территории РФ недоброкачественных и/или фальсифицированных ЛП вправе вынести решение, обязывающее владельца указанных средств осуществить их изъятие, уничтожение и/или вывоз в полном объеме с территории РФ.

В результате проверок, проводимых в 2013 г. Росздравнадзором, выявлено, что практически 40% хозяйствующих субъектов, осуществляющих деятельность в сфере здравоохранения, нарушают законодательство РФ в том числе в части соблюдения требований по осуществлению контроля за оборотом недоброкачественной продукции на территории РФ. Доля организаций-нарушителей за год увеличилась на 5% (с 35 до 40%) [3].

Росздравнадзором установлено, что при осуществлении фармацевтической деятельности чаще всего допускаются нарушения условий хранения ЛП. За 2013 г. доля таких нарушений увеличилась на 16,5% и составила 69,2% от общего числа нарушений [3].

Как известно, нарушение условий хранения влечет за собой утрату потребительских свойств фармацевтической продукции и требует принятия уполномоченным органом решения о переконтроле данной продукции. Следствием этого может явиться приостановление обращения фармацевтической продукции, перемещение ее в карантинную зону, изъятие и/или уничтожение ее из оборота. Данная группа ЛП в результате нарушений порядка хранения также представляет опасность для здоровья человека.

Контроль за обеспечением исполнения субъектами обращения ЛП ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [4] относительно соблюдения запрета на реализацию недоброкачественных ЛП возлагается на территориальный орган Росздравнадзора.

После того, как Росздравнадзором вынесено решение об изъятии, уничтожении и вывозе недоброкачественных, фальсифицированных ЛП, их владелец обязан выполнить это решение в срок не позднее 30 дней со дня его вынесения или сообщить о своем несогласии с ним. Владелец ЛП, подлежащих уничтожению, продолживший их реализацию, несмотря на полученную информацию, фактически нарушает требования положения о лицензировании фармацевтической деятельности, совершая тем самым грубое правонарушение. Непредоставление или несвоевременное предоставление сведений о подлежащих уничтожению ЛП в федеральный орган исполнительной власти, осуществляющего функции по контролю и надзору в сфере здравоохранения, если представление таких сведений является обязательным в соответствии с законодательством, либо предоставление заведомо недостоверных сведений влечет наложение административного штрафа.

Невыполнение в установленный срок предписаний, решений Росздравнадзора влечет за собой ответственность, предусмотренную ч. 21 ст. 19.5. Административного кодекса. Однако выявляемость вышеуказанных правонарушений ограничивается рамками контрольно-

но-надзорных мероприятий с периодичностью 1 раз в 2 года.

Основанием для уничтожения лекарственных средств являются [5]:

- решение соответствующего уполномоченного федерального органа исполнительной власти;
- решение суда;
- решение владельца лекарственных средств.

В связи с этим необходимо отметить, что действующее гражданское законодательство РФ не определяет и не раскрывает понятие «владелец», которым оперирует Росздравнадзор в своих инструктивных письмах. Однако по смыслу гражданско-правовых норм владельцем товара является лицо, которое владеет им на любых законных основаниях: в частности, владельцем товара является его собственник, если он не передал права владения другому лицу (например, не передал товар на реализацию или комиссию) [6].

ЛП с истекшим сроком годности должны храниться отдельно от других наименований групп ЛП, что определено соответствующими правилами хранения ЛП. Тем не менее на сегодняшний день нет четкого определения понятия «карантинная зона», которое было бы подтверждено законодательно. Понятие карантин (quarantine) различные источники трактуют как «статус продукции, изолированной физически или другими эффективными способами, пока ожидается решение о выдаче разрешения на их обращение или отказе в нем» [7].

Пробел в понятийном аппарате позволяет произвольно толковать порядок исполнения правил уничтожения лекарственных средств. Таким образом, необходимо устранить ряд неясностей на уровне понятийного аппарата порядка уничтожения ЛП.

В РФ с 2015 г. введена уголовная ответственность за обращение фальсифицированных, недоброкачественных и незарегистрированных лекарственных средств. Однако, учитывая низкую степень профессиональной подготовленности субъектов фармацевтического обращения ЛП, в том числе уполномоченных по качеству ЛП в медицинских организациях, масштабы нарушений обеспечения лицензионной деятельности кадровыми ресурсами и сокрытия информации говорят о низкой исполнительности субъектов обращения ЛП. Так, РЗН предлагает субъектам обращения ЛП и медицинским организациям в случае выявления партий недоброкачественной продукции провести ряд мероприятий, направленных на их изъятие и уничтожение, на основании статьи 38 ФЗ № 184-ФЗ «О техническом регулировании» [8–10].

Доведение официальной информации о фальсифицированной, недоброкачественной и приостановленной к обращению лекарственной продукции до субъектов фармацевтического обращения, а также контроль полноты ее использования никакими другими нормативными документами не регламентированы. Также не установлен порядок и механизм охвата информацией о выявленных ФЛС и недоброкачественных ЛП, подлежащих уничтожению во всех сегментах сферы обращения ЛП в регионе. Издаются только письма Росздравнадзора, поэтому о полноте исполнения предписаний субъектами фармацевтического обращения говорить не приходится. Не охватывает весь механизм и регламент РЗН по исполнению функций по контролю уничтожения ЛП [11]. В ежегодных итоговых докладах РЗН и ТО РЗН [12] отмечается, что в проверенных фармацевтических и медицинских организациях не был организован должный контроль с информационными письмами Росздравнадзора. Эти же доклады не содержат информации об объемах предостав-

ления сведений фармацевтическими и медицинскими организациями об имеющихся в наличии ЛП, подлежащих уничтожению по письмам РЗН.

По официальной статистике РЗН, с 2007 г. объемы обнаруженных и изъятых из обращения забракованных ЛП значительно снизились; количество фальсифицированных ЛП на рынке РФ в настоящее время составляет менее 1%. В то же время органами прокуратуры РФ в 2014 г. только в 26 проверенных регионах выявлено более 8 тыс. нарушений; свыше 1,5 тыс. виновных лиц привлечены к административной ответственности [13]. По международным сообщениям, в 100 странах мира Интерпол изъяс поддельных лекарств на 41 млн долларов США [14]. Вероятно, статистические данные РЗН и реальный объем ЛП, подлежащих уничтожению, значительно расходятся.

На территории РСО-Алания долгое время не было организации, имеющей право на уничтожение ЛП. Только с 2011 г. начало функционировать ОАО «Стандарт», имеющее лицензию на уничтожение медицинской продукции на территории РСО-Алания. Однако по состоянию на январь 2013 г. договоры на уничтожение ЛП с данной компанией подписали всего лишь 15 из 600 субъектов фармацевтического обращения.

Остро стоит вопрос об осуществлении контрольно-надзорных мероприятий при обращении ЛП в условиях межведомственной раздробленности в регионах. Орган исполнительной власти, имеющий полномочия государственного контроля (надзора), при передаче части полномочий органам исполнительной власти субъектов РФ не перераспределил функции детально, не актуализировал административный регламент осуществления этой функции.

Практика осуществления переданных полномочий на уровень органов исполнительной власти субъектов РФ подтверждает следующие недостатки:

- не определен порядок организации экспертизы ЛП специалистами отдела лицензирования;
- не определен порядок отбора образцов ЛП специалистами отдела лицензирования, вследствие чего группы препаратов, подлежащие переконтролю, остаются в местах реализации;
- не определен порядок обязательного подтверждения соответствия ЛП установленным требованиям при выявлении несоответствия лицензионным требованиям и условиям в части грубых нарушений правил хранения ЛП, ведущих к ухудшению их качества;
- не определен механизм организации сбора сведений о фактах выявления ФЛС и НДЛП при проверках органами исполнительной власти субъектов РФ.

Нормативно-правовое регулирование данных вопросов остается пробельным. Вопросы, отошедшие к сфере переданных полномочий на уровень субъектов, по-прежнему отнесены к расходным обязательствам органов исполнительной власти РФ. Эти противоречия значительно затрудняют работу органов исполнительной власти субъектов и не способствуют созданию действенной системы по противодействию оборота ФЛС и НДЛП, их изъятию и уничтожению.

Неурегулированность уполномоченным органом вопросов получения и анализа сведений о соблюдении субъектами обращения лекарственных средств правил

уничтожения ЛП ведет к дальнейшему обороту неконтролируемых забракованных или приостановленных ЛП.

Проведенный анализ свидетельствует о необходимости разработки подходов документального отражения движения и перемещения в карантинной зоне забракованных, просроченных или приостановленных ЛП и всей системы управления процессом уничтожения ЛП. Это позволит оптимизировать контроль движения нестандартной фармацевтической продукции на всех этапах и предотвратить повторное их использование.

Заключение

Полученные результаты подтвердили, что такие процессы, как помещение, нахождение и перемещение ЛП в карантинную зону, а также уничтожение ЛП, происходят произвольно, доказывая неэффективную работу как самих субъектов фармацевтического обращения, так и системы государственного контроля качества ЛП.

Установлено также, что отсутствует терминология ключевых понятий, которыми оперирует РЗН в своих письмах и инструктивных указаниях. Это создает дополнительные противоречия в системе контрольно-надзорных функций и требует отдельного изучения для принятия нормативно-правовых актов.

Проведенные исследования говорят о том, что процесс представления информации о выявлении, перемещении, уничтожении недоброкачественных и фальсифицированных, контрафактных, приостановленных и вызывающих сомнение ЛП не имеет механизма полного охвата.

Сложившаяся в регионах практика деятельности участников фармацевтического рынка по изъятию из обращения и уничтожению фальсифицированных и НДЛП свидетельствует о следующем:

- о недостаточности нормативно-правового обеспечения контрольно-надзорных мероприятий сферы обращения ЛП;
- невысокой эффективности исполнения контрольно-надзорных функций органами исполнительной власти в сфере обращения ЛП;
- неэффективности взаимодействия участников системы противодействия обороту недоброкачественных, фальсифицированных и контрафактных ЛП.

Подтверждается необходимость научного обоснования принятия мер по созданию новой модели осуществления контрольно-надзорных функций, повышающей общие результаты деятельности, основой которой должны стать критерии эффективного взаимодействия участников противодействия обороту недоброкачественных, фальсифицированных и контрафактных ЛП при гражданском обороте, в том числе и выработка отсутствующих понятий и терминологии.

Конфликт интересов

Автор данной статьи подтвердил отсутствие финансовой поддержки исследования/конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Косенко ВВ, Беланов КЮ, Глаголев СВ, Рогов ЕС, Тарасова СА. Совершенствование системы государственного контроля качества лекарственных средств. *Вестник Рос-*

здравнадзора. 2014;5:48–55. Доступно: http://www.remedium.ru/public/journal/vr/2014/VR_05_2014.pdf (дата обращения: 10.07.2015).

2. Тумусов ФС. Мы вынуждены констатировать отсутствие системы государственного контроля качества лекарственных средств. Пленарное заседание Госдумы от 23.01.2013. Доступно: http://www.spravedlivo.ru/5_46407.html (дата обращения: 30.01.2015).
3. Расширенная коллегия РЗН. Об итогах работы Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и ее территориальных органов по субъектам Российской Федерации в 2013 г. и планах на 2014 г. Доступно: <http://www.roszdravnadzor.ru> (дата обращения: 16.03.2014).
4. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61 «Об обращении лекарственных средств». Доступно: <http://base.garant.ru/12174909/> (дата обращения: 28.03.2014).
5. Постановление Правительства РФ от 03.09.2010 г. № 674 «Об утверждении Правил уничтожения недоброкачественных лекарственных средств, фальсифицированных лекарственных средств и контрафактных лекарственных средств». Доступно: <http://www.zakonprost.ru/content/base/262605> (дата обращения: 28.03.2014).
6. Милушин МИ, Титова ЛИ. Юридические и аудиторские консультации за 30.05.2013 г. Доступно: <http://www.unico94.ru/consult/show/?id=3781> (дата обращения: 22.03.2014).
7. Письмо Росздравнадзора от 15 июля 2009 г. № 01И-396/09 «О Руководстве по надлежащей практике производства лекарственных средств». Доступно: <http://www.lawmix.ru/medlaw/4649актная информация> (дата обращения: 18.11.2015).
8. Информация о лекарственных средствах, подлежащих изъятию. Доступно: <http://www.roszdravnadzor.ru> (дата обращения: 28.03.2014).
9. Письмо Росздравнадзора «О предоставлении сведений» от 05.04.2007 г. № 01И-271/07. Доступно: <http://rudoctor.net/medicine2009/bz-tw/med-ympaе.htm> (дата обращения: 28.03.2014).
10. Письмо Росздравнадзора от 01.12.2011 г. № 04 И-1216/11 «О контроле за качеством и уничтожением лекарственных средств». Доступно: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70046966/> (дата обращения: 28.03.2014).
11. Приказ МЗ РФ от 29.09.2011 г. № 1090 н «Об утверждении административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по контролю за уничтожением лекарственных средств». Доступно: http://www.medbrak.ru/doc_5_12741_1_8_0_0.html (дата обращения: 28.03.2014).
12. Доклад «Об осуществлении государственного контроля (надзора) в сфере здравоохранения Территориальным органом Росздравнадзора по Приморскому (Карачаево-Черкесскому) краю и об эффективности такого контроля (надзора) в 2013 г. Доступно: <http://www.roszdravnadzor.ru/i/upload/files/1338208874.69267> (дата обращения: 28.03.2014).
13. Прокуратура нашла в России массовые нарушения при продаже лекарств. «РИА-новости» от 05.12.2015 г. Доступно: <http://ria.ru/society/20141205/1036724416.html#ixzz3TABFV5Ry> (дата обращения: 15.12.2015).
14. International operation targets online sale of illicit medicines. Media release. 2013. URL: <http://www.interpol.int/layout/set/print/News-and-media/News/2013/PR077> (available: 05.03.2015).

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Бидарова Фатима Николаевна, кандидат фармацевтических наук, заведующая кафедрой фармации Северо-Осетинской государственной медицинской академии, директор Республиканского центра контроля качества и сертификации лекарственных средств

Адрес: 362019, РСО-Алания, Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 40, **тел.:** +7 (8672) 56-32-85,

e-mail: apteka-83@yandex.ru

DOI: 10.15690/vramn583

М.А. Сновская¹, А.С. Батырова¹, Л.С. Намазова-Баранова^{1, 2, 3}, А.А. Алексеева^{1, 2},
Е.А. Вишнёва^{1, 2}, О.В. Кожевникова¹, А.А. Марушина¹, В.Н. Лубов¹¹ Научный центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Москва, Российская Федерация³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России,
Москва, Российская Федерация

О минимизации затрат на высокоэффективную диагностику аллергии у детей: анализ согласованности результатов аллергологического *in vitro*- и *in vivo*-обследования

Распространенность atopических заболеваний, в том числе высокая значимость пыльцы злаковых трав как сенсibilизирующего агента, определяют актуальность поиска методов аллергодиагностики с целью последующего назначения адекватной терапии. В связи с разработкой нового типа диагностической тест-системы, не требующей дорогостоящего оборудования, актуальными стали изучение наиболее значимых для пациентов аллергенов, исключение дублирующих и малоинформативных тестов. **Цель исследования:** оценить результаты *in vitro*- и *in vivo*-тестирования у детей с разной нозологической формой аллергии, обусловленной пылью злаковых трав, и выбрать наиболее значимые прогностические параметры для оптимизации диагностики. **Методы:** в исследование были включены 277 детей в возрасте 4–16 лет с разными нозологическими формами atopической болезни. Пациентам были выполнены кожные тесты и определение содержания IgE к цельным экстрактам аллергенов ежеи сборной (g3), овсяницы луговой (g4), тимopheевки луговой (g6). **Результаты:** от 32 до 50% детей в исследуемых группах имеют антитела к аллергенам злаковых трав. Отмечены тесная связь между антителным ответом на изучаемые аллергены, а также количественное совпадение у пациентов содержания IgE-антител к аллергенам g3 и g4, близкое к IgE(g3) и IgE(g4) значение концентрации IgE к g6 ($85,0 \pm 21,6\%$). Анализ результатов кожных тестов показал, что 44% пациентов имеют позитивный ответ на аллергены злаковых трав, и в качественном отношении ответы *in-vivo*-тестов совпадают с результатами серологического тестирования пациентов. Наиболее значимая связь между *in vivo*- и *in vitro*-тестами отмечена между результатами тестирования с цельным экстрактом аллергенов овсяницы. **Заключение:** показатель концентрации IgE к аллергенам овсяницы луговой можно использовать в качестве прогностического маркера для определения сенсibilизации пациентов с разной нозологической формой аллергии, обусловленной сенсibilизацией к пылью злаковых трав, и на основании этого оптимизировать лабораторную аллергодиагностику.

Ключевые слова: аллергический ринит, бронхиальная астма, аллергены трав семейства Злаковые, диагностика.

(Для цитирования: Сновская М.А., Батырова А.С., Намазова-Баранова Л.С., Алексеева А.А., Вишнёва Е.А., Кожевникова О.В., Марушина А.А., Лубов В.Н. О минимизации затрат на высокоэффективную диагностику аллергии у детей: анализ согласованности результатов аллергологического *in vitro*- и *in vivo*-обследования. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 748–755. Doi: 10.15690/vramn583)

Обоснование

По всему миру наблюдается неуклонный рост распространенности различных нозологических форм аллергии, таких как поллиноз и бронхиальная астма, возрастает частота аллергических реакций на пищевые продукты [1]. Среди atopических заболеваний наибольшее распространение имеют аллергический ринит — у 4–30% населения, бронхиальная астма (БА) — у 4–10%; симптомы atopического дерматита наблюдаются почти у 30% российских детей в возрасте 2–3 лет [2]. На долю сезонного аллергического ринита приходится от 1 до 40% случаев, на долю круглогодичного — от 1 до 18% общего числа обследованных [3]. Многие пациенты имеют одновременно несколько нозологических форм atopической болезни [4], при этом число заболевших увеличивается с возрастом [5].

Среди факторов, влияющих на развитие аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, БА, значительное влияние оказывают аэроаллергены (бытовые, эпидермальные, пыльцевые) [6]. В исследовании, проведенном Е.И. Козулиной и соавт., было показано, что среди молодого населения (возраст от 18 до 24 лет) за 10 лет увеличилось число пациентов, сенсibilизированных к домашней пыли (44,4%), в том числе к

клещам рода *Dermatophagoides pteronissinus* (33,29%) и *Dermatophagoides farinae* (27,7%), шерсти собаки (22,2%) и кошки (27,7%), пыльце деревьев (38,8%), пыльце злаковых (22,2%) и сорных трав (22,2%) [3]. В результате 4-летнего исследования R. Peternel и соавт. [7] показали, что повышенная реактивная чувствительность организма к луговым травам, по данным кожных тестов, встречается у 46,9% взрослых пациентов, имеющих сенсibilизацию к пылью растений.

В литературе показана роль аллергенов злаковых трав в развитии аллергического риноконъюнктивита и БА [7]. Сравнительно недавно Европейским респираторным сообществом охраны здоровья (European Community Respiratory Health Survey, ECRHS) в крупном эпидемиологическом исследовании была подтверждена первостепенная роль пыльцы злаковых трав в развитии ингаляционной аллергии [8]. Особое внимание требует рассмотрение вопроса перекрестной реактивности IgE-антител, развивающейся на гомологичные (имеющие сходную структуру молекул) аллергены. С развитием молекулярной аллергологии было показано, что пыльца злаковых трав состоит из белков и гликопротеинов,

многие из которых являются сильными аллергенами [9]. На основании высокой внутригрупповой перекрестной реактивности такие аллергены делят на 10 групп. В качестве примера можно выделить аллергены тимфеовки луговой (*Phleum pratense*), экстракты и отдельные компоненты которой (Phl p 1, 2, 5, 6) широко используются в *in vitro*- и *in vivo*-диагностике аллергии на пыльцу злаковых трав, и в специфической иммунотерапии [10], а также аллергены овсяницы луговой (Fes p 1, Fes p 4, Fes p 5, Fes p 13) и ежи сборной (Dac g 1, Dac g 2, Dac g 3, Dac g 4, Dac g 5) [11].

Своевременная точная диагностика заболевания — необходимый этап в постановке правильного диагноза пациенту и назначения адекватного лечения аллергии. В педиатрической практике вопрос стоит еще более остро: раннее выявление сенсибилизирующего агента предотвращает развитие множественной сенсибилизации.

Обследование пациентов с аллергией включает несколько этапов: сбор анамнеза заболевания, выяснение наследственной предрасположенности, в случае подтверждения аллергического характера симптомов проводят лабораторно-инструментальное обследование пациента, цель которого — поиск конкретных аллергенов, ответственных за развитие болезни [12].

Доступными инструментами для диагностики аллергии, в том числе в педиатрии, являются оценка эффективности элиминационных мероприятий, *in vivo*- (кожные тесты) и *in vitro*-тестирование с целью определения уровня циркулирующих в сыворотке крови аллергенспецифических антител IgE [12].

До настоящего времени наибольшее внимание уделяли установлению качественной зависимости между сенсибилизирующей способностью перекрестно-реактивных аллергенов, однако количественной оценки зависимости концентрации антител между близкородственными ал-

лергенами и аллергенами, вызывающими перекрестные аллергические реакции, не проводилось.

Также остается неизученной взаимосвязь между родственными аллергенами растительного происхождения, их влияние на образование специфических IgE-антител, а также роль лабораторной диагностики в установлении степени сенсибилизации пациента к перекрестно-реактивным аллергенам.

Большинство тест-систем, которыми оснащены клинические лаборатории нашей страны, позволяют количественно определять содержание аллергенспецифических IgE; спектр тестов широк, а стоимость их прямо пропорциональна качеству используемых реагентов. Для точной количественной оценки содержания аллергенспецифических IgE-антител необходимо применение дорогостоящих тест-систем. Именно поэтому с увеличением списка аллергенов, «подозреваемых» в качестве триггеров клинических симптомов аллергии, возрастает стоимость исследования [13]. В то же время взятие крови из вены для проведения серологического исследования в педиатрической практике, с одной стороны, является для пациента стрессовой ситуацией, но с другой — не всегда может быть выполнено в полном объеме. Это определяет необходимость поиска эффективных методов диагностики, позволяющих минимизировать количество образцов крови пациента, а также выявления прогностических маркеров, позволяющих количественно оценивать уровень сенсибилизации организма без проведения большого числа аллерготестов.

Цель нашего исследования: оценить результаты *in vitro*- и *in vivo*-тестов у детей с различными нозологическими формами аллергии, обусловленными пылью злаковых трав, и выбрать наиболее значимые прогностические параметры для оптимизации диагностики и минимизации затрат.

M.A. Snovskaya¹, A.S. Batyrova¹, L.S. Namazova-Baranova^{1,2,3}, A.A. Alekseeva^{1,2},
E.A. Vishneva^{1,2}, O.V. Kozhevnikova¹, A.A. Marushina¹, V.N. Lubov¹

¹ Scientific Centre of Children Health, Moscow, Russian Federation

² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

³ The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

About Minimization of Expenses on Allergy Diagnosis in Children: Analysis of Consistency of *in Vitro*- and *in Vivo*-Allergic Examinations Results

High morbidity rate of atopic diseases among children, including high importance of grass pollen as a sensitizing agent, determine the relevance of studies on diagnostic examination systems for appointment of adequate therapy. The research of the most relevant allergens for patients to exclude of duplicating and uninformative tests became urgent after development of a new type of diagnostic tests that does not require expensive equipment.

The objective of this research was to evaluate the results of *in vitro*- and *in vivo*-diagnostic examinations of children with various forms of atopic disease caused by pollen of meadow grasses, and to choose the most significant prognostic parameters for the diagnosis. **Methods:** 277 children aged 4–16 years with various forms of atopic disease were included in the study. There were performed skin prick tests and determination of IgE-antibodies levels to allergen extracts of cocksfoot (g3), meadow fescue (g4), timothy grass (g6). **Results:** In the studied group of patients 32–50% of children have antibodies to grass allergens. There was a close correlation of antibody response on the investigated allergens, quantitative coincidence of IgE-antibodies to g3 and g4 allergens levels. IgE (g6) concentration was close to the IgE(g3) and IgE(g4) levels (85,0±21,6%). Analysis of the skin tests results showed that 44% of patients have a positive response to grass allergens, and *in vivo*-tests results coincide with serological tests results, mostly in a qualitative sense. The most significant relationship was noted between *in vivo* and *in vitro*-tests in the results of testing the response to meadow fescue pollen. **Conclusion:** Based on these data IgE concentration index to meadow fescue allergens can be used as a prognostic marker to determine the sensitization of patients with different nosology forms of allergy and can help to improve allergic diagnostics.

Key words: allergic rhinitis; bronchial asthma; grass allergens; diagnostic.

(For citation: Snovskaya M.A., Batyrova A.S., Namazova-Baranova L.S., Alekseeva A.A., Vishneva E.A., Kozhevnikova O.V., Marushina A.A., Lubov V.N. About Minimization of Expenses on Allergy Diagnosis in Children: Analysis of Consistency of *in Vitro*- and *in Vivo*-Allergic Examinations Results. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 748–755. Doi: 10.15690/vramn583)

Методы

Дизайн исследования

Проведено одномоментное наблюдательное исследование по оценке сопряженности концентраций аллергенспецифических IgE-антител к цельным экстрактам аллергенов трав семейства Злаковые, триба Мятликовые (лат. *Poaceae*) — ежи сборной (g3), овсяницы луговой (g4), тимopheевки луговой (g6), а также сопряженности результатов кожного тестирования к указанным аллергенам у детей с различными нозологическими формами аллергии.

Критерии соответствия

Критерии включения в исследование: дети в возрасте от 4 до 16 лет включительно, имеющие аллергию в анамнезе и сезонный характер клинических симптомов. В исследование включались пациенты с atopической БА вне зависимости от степени тяжести, и/или поллинозом (риноконъюнктивальным синдромом, аллергическим ринитом с сезонным проявлением), и/или atopическим дерматитом вне зависимости от степени тяжести. Законные представители пациентов были проинформированы о процедурах и плане исследования и дали письменное согласие на участие.

750

Условия проведения

Исследование выполнено на базе ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России). Прием пациентов осуществлялся в консультативно-диагностическом центре, лабораторные исследования — в отделе инструментальной диагностики НИИ педиатрии.

Продолжительность исследования

В рамках исследования проанализированы медицинские данные пациентов, наблюдавшихся в ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России с марта по октябрь 2015 г. Исследование образцов крови проводилось однократно.

Описание медицинского вмешательства

У всех пациентов была взята кровь в количестве 5 мл из локтевой вены с помощью системы однократного применения BD Vacutainer Safety-Lok (Becton Dickinson International, США). Кровь набирали в пробирку BD Vacutainer (США) с активатором свертывания и разделительным гелем, центрифугировали в течение 15 мин при 2,5 тыс. оборотов и хранили при +5 °С в течение двух суток до проведения исследования.

Кожное аллергологическое тестирование проводилось методом скарификационных проб с водно-солевыми экстрактами аллергенов трав семейства Злаковые (ежа сборная, овсяница луговая, тимopheевка луговая) компании «Микроген» согласно инструкции компании-производителя пациентам, не имеющим противопоказаний для проведения данного типа исследования.

Исходы исследования

Достижением исхода исследования считалось получение результатов кожного тестирования у наблюдаемых пациентов, определение концентрации аллергенспецифических IgE-антител к аллергенам злаковых трав и получение размера выборки пациентов, достаточной для статистического анализа.

Методы регистрации исходов

Содержание аллергенспецифических антител IgE к аллергенам злаковых трав (ежи сборной, овсяницы луго-

вой, тимopheевки луговой) определяли с помощью непрямого иммунофлюоресцентного метода (анализатор ImmunoCAP250, Thermo Fisher Scientific, ранее Phadia AB, США). Тест считался положительным при концентрации IgE $\geq 0,35$ кЕ/л.

Результаты прик-тестов оценивали по размеру папулы в месте нанесения аллергена: проба считалась положительной при диаметре папулы ≥ 3 мм, сомнительной — при диаметре 2 мм; размер папулы 3 мм соответствовал значению «1+», 4–5 мм — «2+», 6–9 мм — «3+», более 10 мм — «4+».

Этическая экспертиза

В исследование были включены пациенты, проходящие плановое обследование и лечение в различных отделениях ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России. Серологическое тестирование и кожные пробы входили в план обследования пациентов, а результаты обследования были использованы в исследовательских целях с письменного разрешения родителей.

Статистический анализ

Оценку результатов исследования осуществляли с использованием пакета программного обеспечения Statistica v. 8.0 (StatSoft Inc., США) и Excel (Microsoft, США). Для установления прямых связей между изучаемыми признаками по их абсолютным значениям применяли линейный корреляционный и множественный регрессионный анализ. Для оценки значимости различий между выборками использовали критерий Фридмана. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

Участники исследования

Общее количество детей, вошедших в исследование, — 277, из них 121 девочка, 156 мальчиков. Возраст пациентов — от 4 до 16 лет включительно. Для решения поставленной цели было сформировано пять групп пациентов в зависимости от клинических проявлений аллергии:

- группа I: дети с поллинозом — 77;
- группа II: дети с поллинозом и atopическим дерматитом (АтД) — 47;
- группа III: дети с поллинозом и БА — 67;
- группа IV: дети с поллинозом, АтД, БА — 49;
- группа V: дети с БА и АтД — 37.

Всем детям выполнено исследование *in vitro*, а 201 из них также проведено кожное тестирование с аллергенами ежи сборной, овсяницы луговой, тимopheевки луговой. Не проводили кожного тестирования 76 пациентам: 11 — вследствие длительной терапии кортикостероидными препаратами, 43 — из-за обострения аллергического заболевания, 7 — из-за поражения кожного покрова, 15 — в связи с отказом официальных представителей пациента от проведения кожного тестирования.

Основные результаты исследования

Оценка концентрации антител к аллергенам злаковых трав у детей с различными клиническими симптомами аллергии показала, что более чем у 32% пациентов, включенных в исследование, имелись диагностически значимые уровни специфических IgE-антител к аллергенам ежи сборной, овсянице луговой, тимopheевке луговой. При этом не отмечено ни одного случая позитивного ответа одного из тестов при двух других отрицательных.

Таблица 1. Позитивные результаты серологического тестирования пациентов в зависимости от нозологической формы atopической болезни

Группы пациентов	Всего пациентов, n	Число пациентов с уровнем IgE >0,35 кЕ/л	Позитивный ответ, %
I (П)	77	25	32,5
II (П + АтД)	47	21	44,7
III (П + БА)	67	28	42,0
IV (БА + П + АтД)	49	26	53,0
V (БА + АтД)	37	12	32,4

Примечание. П — поллиноз, АтД — atopический дерматит, БА — бронхиальная астма.

Количество детей, имеющих антитела к травам семейства Злаковые, различалось в изучаемых группах (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что у пациентов с поллинозом, бронхиальной астмой и atopическим дерматитом диагностически значимые уровни IgE-антител к аллергенам злаковых трав встречаются в 32% случаев. В то же время у пациентов с клиническими симптомами поллиноза, бронхиальной астмы и atopическим дерматитом в 50% случаев имеются антитела к аллергенам злаковых трав.

Для оценки взаимосвязи антителного ответа на пыльцевые аллергены родственных злаковых трав были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона, характеризующие тесноту линейной связи изучаемых параметров (табл. 2).

В каждой изучаемой группе пациентов была выявлена статистически значимая сильная корреляция между значениями концентрации антител IgE к аллергенам ежи сборной, овсяницы луговой, тимopheевки луговой: коэффициент корреляции Пирсона превысил значение 0,96 для всех групп пациентов.

В связи с высокой частотой совместного положительного антителного ответа на аллергены пыльцы злаковых трав нами был применен множественный регрессионный анализ для оценки предиктивной ценности значения концентрации антител IgE к изучаемым растительным аллергенам (табл. 3).

Анализ показал, что значения концентраций специфических IgE-антител к аллергенам изучаемых злаковых трав тесно взаимосвязаны: при росте значения одного из параметров пропорционально возрастает концентрация IgE-антител к прочим изучаемым аллергенам. Коэффициенты детерминации составили не менее 0,92, а остаточное отклонение находилось в диапазоне 0,16–4,35 при уровне значимости $p < 0,0001$ для всех изучаемых аллергенов во всех группах пациентов, что говорит о сильной сопряженности значений концентраций IgE-антител к аллергенам ежи, овсяницы, тимopheевки.

Для количественного сопоставления измеренных показателей (IgE к g3, g4, g6) на одной и той же выборке детей в каждой группе пациентов был применен критерий Фридмана. Было показано отсутствие статистически значимых различий между значениями концентраций IgE-антител к аллергенам ежи сборной и овсяницы луговой ($p > 0,05$), однако концентрация IgE-антител к аллергенам тимopheевки луговой в каждой группе пациентов статистически значимо отличалась от концентрации IgE к g3 и g4 ($p = 0,0002$ и $p = 0,0001$, соответственно) — в среднем 87,3% от уровня IgE к аллергенам ежи сборной и 85,1% от уровня IgE к аллергенам овсяницы. Данные представлены в табл. 4 и на рис. 1.

При оценке результатов кожного тестирования, проведенного с аллергенами трав семейства Злаковые, было показано, что в среднем у $44,3 \pm 17\%$ детей наблюдается

751

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между уровнями специфических IgE к пыльцевым аллергенам трав семейства Злаковые (ежи сборной, овсяницы луговой, тимopheевки луговой)

Группы пациентов	Сравниваемая пара аллергенов*	Коэффициент корреляции Пирсона, r	95% доверительный интервал для r
I (П)	g3–g4	0,997	0,995–0,998
	g3–g6	0,960	0,937–0,974
	g4–g6	0,973	0,957–0,983
II (П + АтД)	g3–g4	0,999	0,998–0,999
	g3–g6	0,967	0,941–0,981
	g4–g6	0,961	0,930–0,978
III (П + БА)	g3–g4	0,998	0,996–0,999
	g3–g6	0,999	0,999–1,000
	g4–g6	0,999	0,997–0,999
IV (БА + П + АтД)	g3–g4	0,983	0,970–0,990
	g3–g6	0,981	0,970–0,990
	g4–g6	0,949	0,911–0,970
V (БА + АтД)	g3–g4	0,999	0,998–0,999
	g3–g6	0,999	0,999–1,000
	g4–g6	0,999	0,999–1,000

Примечание. * — уровни значимости (p) для всех рассматриваемых пар аллергенов $< 0,0001$. П — поллиноз, АтД — atopический дерматит, БА — бронхиальная астма.

Таблица 3. Результаты регрессионного анализа: в качестве независимой переменной выступает концентрация IgE(g3) или IgE(g4)

Группы пациентов	Сравниваемая пара аллергенов*	Коэффициент детерминации, R^2	Остаточное стандартное отклонение
I (П)	g4–g3	0,994	1,15
	g3–g6	0,921	4,36
	g4–g6	0,946	3,41
II (П + АтД)	g4–g3	0,998	0,35
	g3–g6	0,935	2,17
	g4–g6	0,924	2,55
III (П + БА)	g4–g3	0,997	0,73
	g3–g6	0,999	0,16
	g4–g6	0,997	0,99
IV (БА + П + АтД)	g4–g3	0,967	1,47
	g3–g6	0,966	1,49
	g4–g6	0,901	2,81
V (БА + АтД)	g4–g3	0,998	0,37
	g3–g6	0,999	0,15
	g4–g6	0,999	0,31

Примечание. * — уровни значимости (p) для всех рассматриваемых пар аллергенов $<0,0001$. П — поллиноз, АтД — атопический дерматит, БА — бронхиальная астма.

752

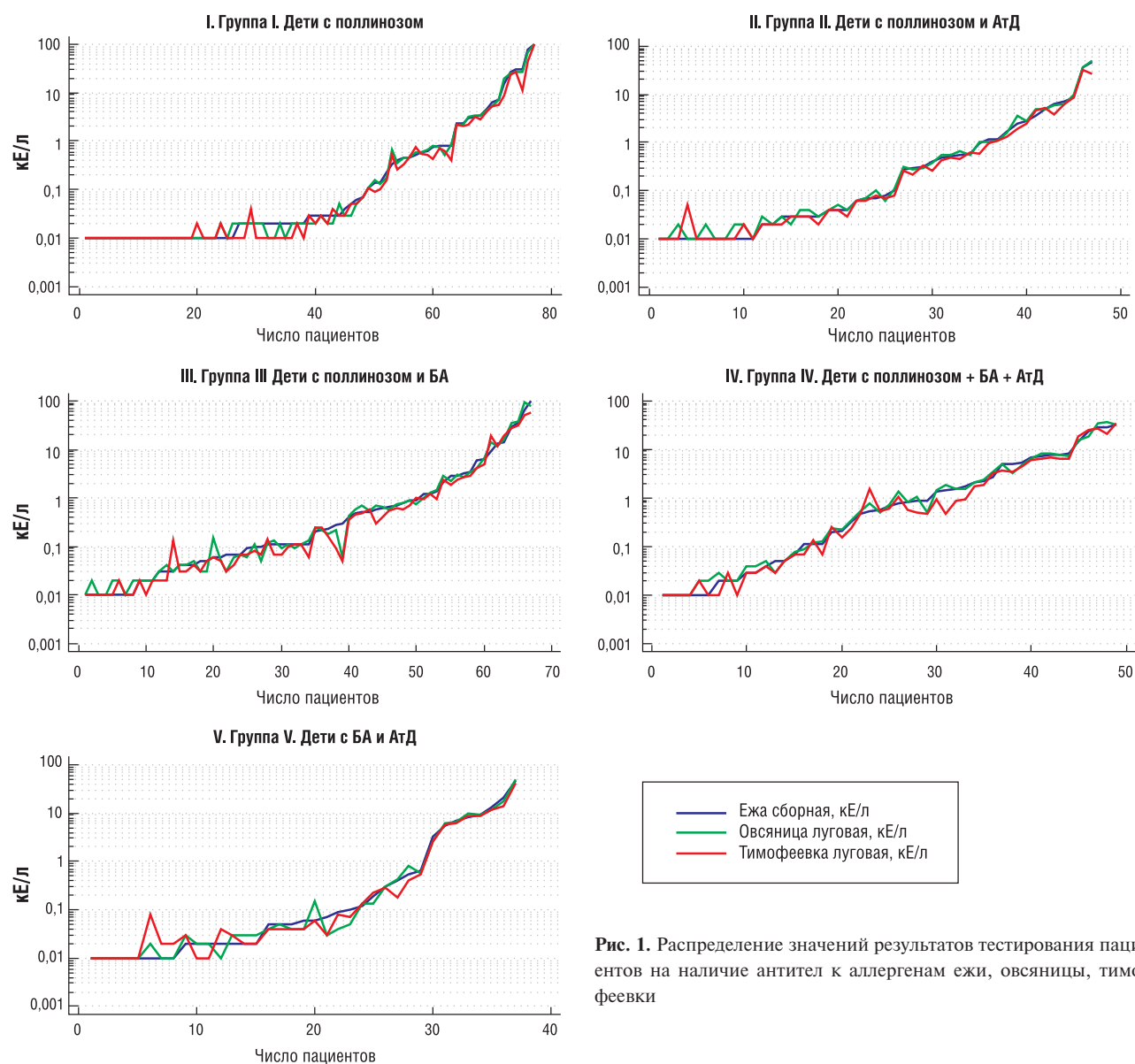


Рис. 1. Распределение значений результатов тестирования пациентов на наличие антител к аллергенам ежи, овсяницы, тимфеевки

Таблица 4. Распределение значений IgE к аллергенам тимopheевки в зависимости от содержания у пациента антител к аллергенам ежи и овсяницы; значений IgE к аллергенам ежи в зависимости от содержания у пациента антител к аллергенам овсяницы

Группы пациентов	Тимофеевка-Ежа		Тимофеевка-Овсяница		Ежа-овсяница	
	Среднее значение, %	Станд. отклонение, %	Среднее значение, %	Станд. отклонение, %	Среднее значение, %	Станд. отклонение, %
I	85,0	21,5	84,2	22,5	101,3	16,7
II	87,3	18,5	84,4	18,0	97,3	12,5
III	89,0	27,6	85,9	21,0	98,9	18,8
IV	90,3	25,8	86,0	28,8	99,8	20,8
V	84,9	15,8	84,8	19,0	100,2	16,7

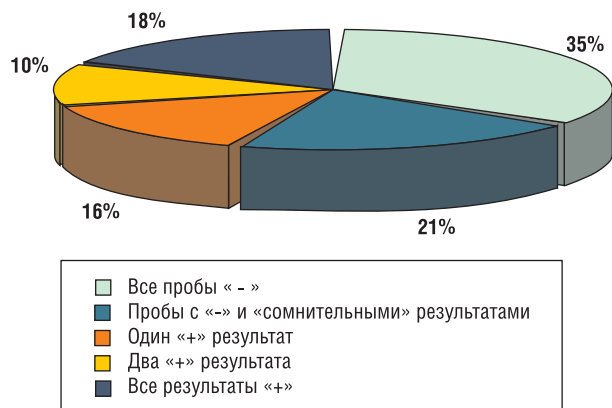


Рис. 2. Распределение результатов кожного тестирования с аллергенами трав семейства Злаковые (ежи сборной, овсяницы луговой, тимopheевки луговой)

положительный ответ (размер папулы ≥ 3 мм) хотя бы на один исследуемый аллерген (рис. 2).

Согласующиеся результаты *in vivo*-тестирования были получены в 74% случаев, из них 35% для отрицательных результатов, 21% — для сомнительных, 18% — для положительных. В 26% случаев наблюдались различные сочетания негативных, сомнительных и позитивных ответов при тестировании пациентов с аллергенами ежи, овсяницы, тимopheевки.

При рассмотрении результатов тестирования пациентов, давших позитивный ответ хотя бы на один исследуемый аллерген, было показано, что в 41,9% случаев имела положительная реакция на все исследуемые пыльцевые аллергены, а еще у 14,6% детей позитивный ответ на два аллергена сочетался с «подпороговым», или сомнительным, ответом на третий аллерген.

Проведенный корреляционный анализ показал, что для пациентов всех групп имеется статистически значи-

мая сильная и умеренная корреляция между результатами *in vivo*-тестов с аллергенами ежи, овсяницы, тимopheевки. Коэффициент корреляции Пирсона составил $>0,650$ в отношении пар аллергенов ежа-овсяница, $>0,720$ — для пар аллергенов ежа-тимopheевка, $>0,600$ — для пар аллергенов тимopheевка-овсяница при $p < 0,001$.

Выполненный анализ однородности статистических данных с помощью критерия Фридмана показал статистически значимые различия между результатами тестирования пациентов с аллергией к еже, овсянице, тимopheевке ($p = 0,0000$ для всех групп пациентов и аллергенов). Вместе с тем наблюдалась выраженная взаимосвязь появления ответов на родственные аллергены. Взаимосвязь результатов *in vivo*-тестирования, ранжированных от отсутствия реакции до ответа, достигающего уровня «4+», суммарно по всем группам пациентов проиллюстрирована на рис. 3.

Наибольшая величина ответа пациентов наблюдалась на аллергены овсяницы и тимopheевки и, напротив, менее выраженный ответ — на аллергены ежи сборной вне зависимости от нозологической формы атопической болезни.

Дополнительные результаты исследования

Сравнение результатов *in vitro*- и *in vivo*-диагностики сенсибилизации пациентов к аллергенам трав семейства Злаковые показало статистически значимую среднюю и сильную корреляцию между позитивным ответом при кожном тестировании и выявлении диагностически значимого уровня IgE-антител к изучаемым аллергенам. Результат зависел от нозологической формы аллергии, и максимальная взаимосвязь была показана для групп 2 и 3 ($r > 0,750$ и $r > 0,770$ для аллергенов овсяницы и тимopheевки, соответственно, при $p = 0,0001$) и группы 1 ($r > 0,720$ и $r > 0,710$ для аллергенов ежи и овсяницы, соответственно, при $p = 0,0001$). В отношении иных изучаемых групп па-

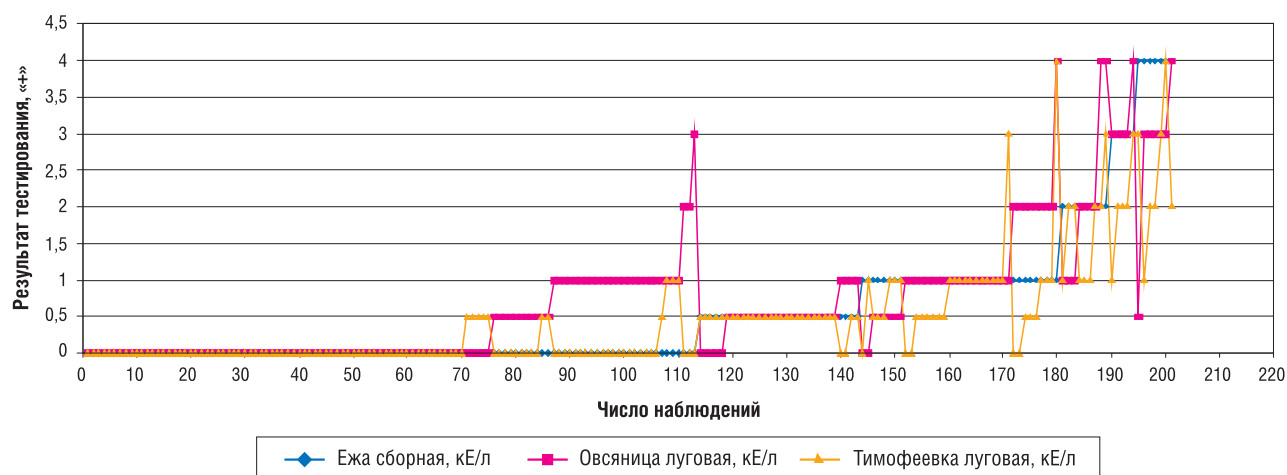


Рис. 3. Результаты проведения кожных тестов пациентам с аллергией к злаковым травам

циентов получена диагностически значимая средняя корреляция между результатами кожного и серологического тестирования ($0,540 < r < 0,690$ при $p < 0,001$). При этом степень позитивного ответа при кожных пробах имела корреляцию средней силы с уровнем IgE-антител к изучаемым аллергенам ($0,44 < r < 0,67$ при $p < 0,0001$).

Нежелательные явления

Нежелательные явления отсутствовали.

Обсуждение

Результаты *in vitro*- и *in vivo*-диагностики аллергии, полученные в нашей работе, имели сходные качественные результаты для пациентов с различными нозологическими формами аллергии. В среднем 41% пациентов имели IgE антитела к исследуемым аллергенам и 44% — положительные кожные пробы. Полученные нами результаты распространенности сенсибилизации пациентов к аллергенам злаковых трав, а также частота выявления диагностически значимого уровня IgE-антител к исследуемым аллергенам согласуются с данными А. Navarго, который показал, что к пыльце растений сенсибилизировано не менее 51% пациентов с аллергическим ринитом и не менее 43% с бронхиальной астмой [14]. В работе С. Canova, описывающей масштабное исследование по распространенности сенсибилизации к злаковым травам, также показано, что в Северной Европе от 28 до 49% пациентов с бронхиальной астмой в зависимости от региона исследования имеют положительные результаты кожного тестирования и уровень аллергенспецифических IgE, превышающий пороговую границу $0,35 \text{ кЕ/л}$ [8].

Наше исследование показало наличие единых тенденций при оценке содержания IgE-антител к различным аллергенам трав семейства Злаковые у пациентов с различными нозологическими формами аллергии. Сопряженность образования IgE к аллергенам трав семейства Злаковые может быть объяснена сходством белковых молекул, входящих в состав аллергенных экстрактов различных растений, принадлежащих одному семейству [16]. Благодаря появлению молекулярной аллергологии стало известно, что цельный экстракт пыльцевых аллергенов, например тимофеевки луговой, содержит более 28 белков, 15 из которых являются аллергенами. Один из главных аллергенов тимофеевки — белок Phl p 1 — участвует в развитии перекрестных аллергических реакций с родственными растениями вследствие его гомологичности с главным аллергеном ежи сборной Das g 1 [17] и главным аллергеном овсяницы луговой Fes p 1 [16]. Антитела IgE к Phl p 1 обнаруживаются у 95% пациентов, сенсибилизированных к злаковым травам [18].

В связи с тем, что при рутинной аллергодиагностике как *in vivo*, так и *in vitro* применяются цельные экстракты аллергенов, сходная реакция развивается на гомологичные аллергенные молекулы, имеющиеся как в экстракте ежи сборной, овсяницы луговой, так и тимофеевки луговой. Таким образом, используя любой цельный экстракт злаковых трав для диагностики, мы получаем инструмент для полуколичественной оценки уровня IgE-антител к родственным аллергенам, а также для качественной оценки наличия у пациента сенсибилизации.

Выводы

Оценивая результаты данного исследования, необходимо подчеркнуть следующие моменты. Полученные

нами не только качественные, но и количественные совпадения результатов серологического тестирования у детей с различными нозологическими формами аллергии позволили рассмотреть тесты по определению специфических IgE-антител к аллергенам ежи, овсяницы, тимофеевки как взаимозаменяемые. На основании полученной зависимости в случае выявления положительного ответа на один из изучаемых аллергенов, к примеру овсяницы, следует ожидать положительный ответ на аллергены тимофеевки и ежи. При этом концентрация антител к аллергенам тимофеевки и аллергенам ежи в зависимости от концентрации антител к аллергенам овсяницы составляет $85,0 \pm 21,8$ и $99,5 \pm 17,1\%$, соответственно.

Количественному совпадению результатов *in vitro*-тестирования ранее не уделялось достаточного внимания, однако совпадение результатов кожного аллергологического тестирования отражено в литературе [7, 8] и согласуется с результатами, полученными в нашем исследовании.

При рассмотрении результатов *in vivo*-тестов, сопоставляемых с результатами определения аллергенспецифических IgE, отмечено, что позитивный ответ на аллергены овсяницы был выше по сравнению с ответом пациентов на аллергены ежи и тимофеевки. Кроме того, значение концентрации IgE-антител к аллергенам овсяницы наиболее тесно коррелировало с результатами кожного тестирования. Выявленный факт позволил определить данный параметр как прогностический в отношении сенсибилизации пациента к злаковым травам.

Полученные нами данные позволяют аргументированно использовать единый маркерный показатель — концентрацию специфических IgE-антител к цельному экстракту аллергенов овсяницы луговой — для диагностики сенсибилизации пациентов к пыльце трав семейства Злаковые. Применение в лабораторной диагностике ограниченного набора аллерготестов позволяет уменьшить объем исследования и, как следствие, его стоимость.

Заключение

Исследование показало, что концентрации IgE-антител к аллергенам трав семейства Злаковые (timoфеевки, овсяницы, ежи) взаимосвязаны, имеют линейную зависимость, обладают высокой прогностической ценностью. Значение концентрации антител к аллергенам овсяницы наиболее тесно коррелирует с результатом кожного тестирования. Полученные результаты определяют концентрацию антител IgE к аллергенам пыльцы овсяницы как прогностический параметр сенсибилизации пациентов к аллергенам злаковых трав и позволяют предложить новый подход в диагностике аллергии.

Источник финансирования

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках соглашения №14.607.21.0017 о предоставлении субсидии (уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0017).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Намазова-Баранова ЛС. Аллергия у детей: от теории – к практике. М.: *Союз педиатров России*. 2011. 668 с.
2. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: учебник. М.: *ГЭОТАР-Медиа*. 2011. 640 с.
3. Козулина ИЕ, Курбачева ОМ, Ильина НИ. Аллергия сегодня. Анализ новых эпидемиологических данных. *Российский аллергологический журнал*. 2014;3:3–10.
4. Bartra J, Sastre J, del Cuvillo A, Montoro J, Jauregui I, Davila I, et al. From pollinosis to digestive allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 (Suppl 1):3–10.
5. Bousquet J, Gern JE, Martinez FD, Anto JM, Johnson CC, Holt PG, et al. Birth cohorts in asthma and allergic diseases: report of a NIAID/NHLBI/McDALL joint workshop. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1535–1546. doi: 10.1016/j.jaci.2014.01.018.
6. Лопатин АС, Чучуева НД. Эпидемиология аллергического ринита в России и в мире. *Российский аллергологический журнал*. 2013;2:3–11.
7. Peternel R, Toth I, Hercog P, Vojnikovic B, Cop R, Bradic-Hammoud M. Influence of aeroallergens on the incidence of conjunctivitis in Zagreb and Zagreb County. *Coll Antropol*. 2013;37 (Suppl 1):13–17.
8. Canova C, Heinrich J, Anto JM, Leynaert B, Smith M, Kuenzli N, et al. The influence of sensitisation to pollens and moulds on seasonal variations in asthma attacks. *Eur Respir J*. 2013;42(4):935–945. doi: 10.1183/09031936.00097412.
9. Schenk S, Breiteneder H, Susani M, Najafian N, Laffer S, Duchene M, et al. T cell epitopes of Phl p 1, major pollen allergen of timothy grass (*Phleum pratense*). Crossreactivity with group I allergens of different grasses. *Adv Exp Med Biol*. 1996;409:141–146. doi: 10.1007/978-1-4615-5855-2_19
10. Gangl K, Niederberger V, Valenta R. Multiple grass mixes as opposed to single grasses for allergen immunotherapy in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(11):1202–1216. doi: 10.1111/cea.12128.
11. Yman L. Pharmacia: Allergenic Plants. Systematics of common and rare allergens. Version 1.0. CD-ROM. *Uppsala, Sweden: Pharmacia Diagnostics*, 2000.
12. Хаитов РМ. Клиническая аллергология: руководство для практических врачей. М.: *МЕДПресс-информ*. 2002. 624 с.
13. Павлова КС, Курбачева ОМ. Клинико-экономический анализ терапии больных аллергическим ринитом и atopической бронхиальной астмой с наличием бытовой сенсибилизации. *Российский аллергологический журнал*. 2006;3:22–27.
14. Navarro AR. Rinitis. En: SEAIC & Schering-Plough editores. *Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en*. 2005:107–131.
15. Canova C, Heinrich J, Anto JM, Leynaert B, Smith M, Kuenzli N, et al. The influence of sensitisation to pollens and moulds on seasonal variations in asthma attacks. *Eur Respir J*. 2013;42(4):935–945. doi: 10.1183/09031936.00097412.
16. Grobe K, Becker WM, Schlaak M, Petersen A. Grass group I allergens (beta-expansins) are novel, papain-related proteinases. *Eur J Biochem*. 1999;263(1):33–40. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00462.x.
17. Focke M, Mahler V, Ball T, Sperr WR, Majlesi Y, Valent P, et al. Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination. *FASEB J*. 2001;15(11):2042–2044. doi: 10.1096/fj.01-0016fje.
18. Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Dosch IM, Becker WM, Behrendt H. Immunomicroscopic identification of major allergens in pollen of cat's tail grass (*Phleum pratense* L.). *Pneumologie*. 2001;55(5):224–225. doi: 10.1055/s-2001-13944.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Сновская Марина Андреевна, врач отдела инструментальной диагностики НИИ педиатрии ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: snows@inbox.ru

Батырова Анна Сергеевна, врач отдела инструментальной диагностики НИИ педиатрии ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: melograno8@yandex.ru

Намазова-Баранова Лейла Сеймуровна, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ педиатрии ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: namazova@nczd.ru

Алексеева Анна Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением ОВЛД с аллергическими болезнями и заболеваниями органов дыхания

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: aleksaa06@yandex.ru

Вишнёва Елена Александровна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения ОВЛД с аллергическими болезнями и заболеваниями органов дыхания, исполняющая обязанности заведующей отделом стандартизации и клинической фармакологии

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: vishneva@nczd.ru

Кожевникова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, заведующая отделом инструментальной диагностики НИИ педиатрии ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: fd@nczd.ru

Марушина Анастасия Александровна, врач отдела инструментальной диагностики НИИ педиатрии ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: jasnoe@mail.ru

Лубов Василий Николаевич, клинический ординатор ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: lubov.vasily@yandex.ru

Николай Фёдорович Герасименко



Академик РАН Николай Фёдорович Герасименко — известный политический и общественный деятель, ученый, посвятивший свою жизнь здравоохранению и медицинской науке, заслуженный врач Российской Федерации, родился 1 декабря 1950 г. в селе Верх-Суетка Алтайского края.

Окончив Алтайский государственный медицинский институт в 1973 году,

начинал работу хирургом Благовещенской ЦРБ, затем заведовал отделением санитарной авиации Алтайской краевой клинической больницы, работал заместителем главного врача краевой больницы по хирургии, главным хирургом Алтайского края. В 1990 г. назначен председателем комитета по здравоохранению Администрации Алтайского края. Не отрываясь от практической работы, в 1986 г. защитил кандидатскую, а в 1990 — докторскую диссертацию, в которой впервые в России были научно обоснованы стандарты хирургической помощи, которые были утверждены Минздравом СССР в качестве методических рекомендаций. Практическую работу он активно совмещал с научно-преподавательской деятельностью. В 1992 г. избран профессором по кафедре факультетской хирургии.

Годы активной практической и научной деятельности пришлось на сложный для России период изменения социально-экономической и политической формации, что напрямую коснулось путей развития российского здравоохранения. В 1992 г. Н.Ф. Герасименко совместно с руководителями органов здравоохранения Сибирского региона была организована межрегиональная Ассоциация «Здравоохранение Сибири», с помощью которой происходила координация действий и обмен опытом работы Сибирских регионов при внедрении страховой модели российского здравоохранения и других новых форм работы в здравоохранении и социальной сфере.

Занимая активную жизненную и профессиональную позицию, Николай Фёдорович в 1995 г. по одномандатному округу в Государственной Думе Российской Федерации 2-го созыва и был избран председателем Комитета по охране здоровья.

В последующем избирается в Государственную Думу РФ 3—6 созывов (в 3-м созыве — председатель Комитета по охране здоровья и спорту, в последующих — 1-й заместитель Председателя Комитета по охране здоровья).

В это сложное время создавалось медицинское законодательство России как правовая основа происходящих реформ в отечественном здравоохранении. Этому процессу посвящена написанная им книга «Очерки становления современного Российского законодательства в области охраны здоровья».

При непосредственном участии Н.Ф. Герасименко разрабатывалось и принималось большинство современных законов в области охраны здоровья с последующими изменениями и дополнениями: «О лекарственных средствах», «О наркотических средствах и психотропных веществах», «О санитарно-эпидемиологическом бла-

гополучии», «О пенсиях за выслугу лет медицинским работникам», «О качестве и безопасности пищевых продуктов», «О введении уголовной ответственности за отключение больниц от электроэнергии», «Об ограничении курения табака», «О предупреждении распространения туберкулеза в Российской Федерации», «О социальных гарантиях гражданам, подвергнутых радиационному воздействию вследствие ядерных испытаний на Семипалатинском полигоне», «Об упрощении обеспечения наркотическими обезболивающими онкологических больных» и др.

Важнейшим делом своей законодательной и научно-исследовательской работы академик Н.Ф. Герасименко считает научное обоснование разработки Кодекса законов в сфере охраны здоровья, определяющих нормативно-правовую базу системы охраны здоровья в Российской Федерации.

С 1997 г. началось формирование Кодекса законов об охране здоровья населения. Кодекс опирается на нормы Конституции РФ, ГК РФ, УК РФ и «Основ законодательства РФ об охране здоровья граждан». Структурно в настоящее время Кодекс включает в себя следующие блоки законов:

1. Надзорные законы, направленные на обеспечение безопасных условий жизни и среды обитания человека: «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», «Об охране атмосферного воздуха», «О качестве и безопасности пищевой продукции», «О радиационной безопасности» и т.д.;
2. Законы профилактической направленности: «Об иммунопрофилактике инфекционных заболеваний», «О защите населения от табачного дыма и последствий потребления табака», «О предупреждении распространения заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция)», «О наркотических средствах и психотропных веществах» и т.д.;
3. Законы, защищающие права граждан на охрану здоровья: основы законодательства об охране здоровья граждан, о защите прав потребителей, о лекарственных средствах и т.д.;
4. Законы, определяющие права и ответственность медицинских работников: основы об охране здоровья граждан, КЗОТ, соответствующие статьи в УК РФ, о пенсиях за выслугу лет для медицинских работников и т.д.;
5. Законы, регламентирующие деятельность национальной системы здравоохранения: об основах охраны здоровья граждан РФ, об ОМС, об обращении лекарственных средств и т.д.;
6. Законы, регулирующие финансирование здравоохранения: об ОМС, о бюджете ФФОМС, раздел 17 Федерального бюджета «Здравоохранение», о тарифах страховых взносов на ОМС, налоговый и таможенный кодекс и т.д.;
7. Законы, регулирующие отдельные виды медицинской деятельности: о психиатрической помощи и гарантиях прав граждан при ее оказании, о защите населения от туберкулеза, о трансплантации органов и тканей человека, о донорстве и т.д.

Тем самым были выделены основные направления правового регулирования в области охраны здоровья и смежных областях, определены отношения и перспекти-

вы их правового регулирования. Н.Ф. Герасименко является автором или соавтором более ста законов в области охраны здоровья, социальной сферы и др.

Им сформировано новое научное направление «Медицинское законодательство и право в области охраны здоровья». Этому направлению посвящен ряд монографий, книг и учебных пособий.

В 2000 г. в Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова Н.Ф. Герасименко организована кафедра основ законодательства в здравоохранении, заведующим которой он является.

В 1997 г. Н.Ф. Герасименко избран членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук по отделению профилактической медицины, в 2002 г. — академиком РАМН. С 2013 г. он — действительный член Российской академии наук, член Бюро отделения медицинских наук РАН.

Много сил и энергии Н.Ф. Герасименко отдает развитию и популяризации профилактики неинфекционных заболеваний и формированию здорового образа жизни в России. Им организованы и регулярно проводятся национальные форумы с международным участием по профилактике неинфекционных заболеваний (НИЗ) и формированию здорового образа жизни (ЗОЖ), форумы, посвященные борьбе с табакокурением в России, — «Здоровье или табак». Он является одним из ведущих разработчиков законодательных инициатив в области ограничения потребления наркотиков, табачных изделий и алкоголя в России. Этой проблеме посвящено значительное количество книг и статей.

Н.Ф. Герасименко является автором более 340 опубликованных научных работ, среди которых 26 монографий, книг и учебных пособий. Он входит в состав редакционных советов и коллегий журналов «Здравоохранение Российской Федерации», «Экономика здравоохранения» и др. Является членом Экспертного совета Правительства РФ по здравоохранению, членом Координационного совета при Министерстве здравоохранения Российской Федерации по борьбе против табакокурения, членом коллегии и Этического комитета

Минздрава России, членом Диссертационного совета Д.208.040.02. при Первом МГМУ им. И.М. Сеченова.

Н.Ф. Герасименко ведет большую международную деятельность. Он много лет являлся вице-президентом Европейского парламентского форума по народонаселению и развитию, членом международной ассоциации врачей-парламентариев, членом Союзного Парламента Россия—Белоруссия.

Н.Ф. Герасименко активно участвует в общественной жизни. Является вице-президентом «Общества врачей России». Много лет руководит ведущим партийным проектом ЕР «Медицина — качество жизни». В течение ряда лет возглавлял Российскую ассоциацию медицинских обществ по качеству. Член Правления Лиги здоровья нации. Член попечительских и наблюдательных советов ряда общественных организаций.

Академик Н.Ф. Герасименко награжден орденом «За заслуги перед Отечеством» IV степени, орденом «Почета», медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, медалью за Крым и др. Имеет почетный знак Государственной Думы Федерального Собрания «За заслуги в развитии парламентаризма», награжден нагрудным знаком «Отличник здравоохранения», золотой медалью и почетным дипломом ВОЗ «За выдающийся вклад в дело борьбы с табаком», дипломом и памятным знаком Всемирной противораковой ассоциации в номинации «Государственный деятель, внесший выдающийся вклад в борьбу с табаком в Российской Федерации», орденом Русской православной церкви «Святого Трифона» за выдающийся вклад в борьбу с наркотиками, Почетными грамотами Президента Российской Федерации, Государственной Думы ФС РФ, Министерства здравоохранения Российской Федерации и др.

Бюро Отделения медицинских наук РАН, редколлегия журнала «Вестник РАМН», многочисленные ученики, друзья и коллеги сердечно поздравляют глубокоуважаемого Николая Федоровича с юбилеем и желают ему крепкого здоровья, счастья, долгих лет жизни и новых творческих успехов на благо отечественной медицинской науки, здравоохранения и образования.

Юрий Владимирович Лобзин



Исполнилось 65 лет выдающемуся российскому ученому, инфекционисту, организатору здравоохранения, заслуженному деятелю науки Российской Федерации, академику РАН, доктору медицинских наук, профессору Юрию Владимировичу Лобзину.

Ю.В. Лобзин родился 22 ноября 1950 г. в городе Порт-Артуре (КНР) в семье военно-морского

врача Владимира Семеновича Лобзина, в последующем — профессора-невролога, заслуженного деятеля науки Российской Федерации. С момента поступления в Военно-медицинскую академию им. С.М. Кирова Юрий Владимирович всю свою жизнь посвятил служению медицине. С первых лет обучения в Академии он увлекся изучением инфекционных болезней, активно участвовал в работе научного кружка кафедры инфекционных болезней.

Окончив в 1974 г. Академию с золотой медалью, Юрий Владимирович в течение трех лет служил на Северном Флоте в должности врача войсковой части (1974–1976) и старшего врача-инфекциониста корабельной группы специализированной медицинской помощи (1976–1977). Он приобрел опыт работы по оказанию медицинской помощи при вспышках инфекционных заболеваний в воинских коллективах, погрузился в изучение научных проблем клиники, диагностики и лечения менингококковой инфекции у военнослужащих и реабилитации переболевших этой тяжелой патологией. Данный опыт позволил Ю.В. Лобзину в 1977 г. поступить в адъюнктуру при кафедре инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. В 1980 г. им была успешно защищена кандидатская диссертация, посвященная изучению сложных вопросов формирования исходов менингококковой инфекции. Результаты этой важной для Юрия Владимировича научной работы до сих пор являются актуальными и используются в практическом здравоохранении. С 1980 г. Ю.В. Лобзин — преподаватель, затем старший преподаватель (1987) кафедры инфекционных болезней Академии.

Его учителями были продолжатели боткинской клинической школы, опытнейшие педагоги и организаторы здравоохранения — В.С. Матковский, А.П. Казанцев и А.И. Иванов.

Период деятельности Ю.В. Лобзина на кафедре совпал с его участием в оказании медицинской помощи военнослужащим в Афганистане (1988–1989), где уже тогда при массовом поступлении больных проявились его организаторские способности. В то же время эффективно начали внедряться некоторые научные разработки по вопросам реабилитации больных после инфекционных заболеваний. На основе этих разработок в 1988 г. Ю.В. Лобзин защитил докторскую диссертацию, открывшей новое научное направление в инфекционной патологии: в ней впервые был представлен анализ теоретико-методологических обоснований реабилитации, ее принципов и методов при различных инфекционных болезнях. В 1991

г. Ю.В. Лобзину присвоено ученое звание профессора, а в 1994 г. он избран начальником кафедры инфекционных болезней.

По решению руководства медицинской службы ВС РФ в 1995 г. Юрий Владимирович находился в служебной командировке в Чеченской Республике. За помощь раненым и больным, а также за большой вклад в организацию противоэпидемических мероприятий в войсках, он был награжден высокой правительственной наградой.

В 2000 г. профессор Ю.В. Лобзин был избран в состав Российской академии медицинских наук в качестве члена-корреспондента, в 2007 г. — избран действительным членом (академиком) Российской академии медицинских наук. С 2001 г. по совместительству являлся заведующим кафедрой инфекционных болезней Санкт-Петербургской медицинской академии последиplomного образования (в дальнейшем СЗГМУ им. И.И. Мечникова).

Благодаря неразрывной связи с Военно-медицинской академией, в которой произошло становление Юрия Владимировича как ученого, врача-клинициста, высококлассного специалиста в области военной эпидемиологии и инфекционных заболеваний, происходило и его служебное становление. Ю.В. Лобзин достойно и по праву занимал должности от врача ВМФ до генерала-майора медицинской службы, начальника кафедры инфекционных болезней, главного инфекциониста МО РФ, заместителя начальника Военно-медицинской академии по научной работе.

В 2008 г. после увольнения из Вооруженных Сил Российской Федерации Ю.В. Лобзин занимал пост директора ФГБУ «Научно-исследовательский институт детских инфекций» ФМБА России, был назначен главным внештатным специалистом Министерства здравоохранения Российской Федерации по инфекционным болезням у детей и сосредоточил свое внимание на решении новых научных проблем детской инфекционной патологии, ведущими из которых являются:

- совершенствование научных основ организации медицинской помощи детям с инфекционными болезнями, результатом чего стала разработка порядка и медико-экономических стандартов оказания лечебно-диагностической помощи детям при подобных заболеваниях;
- разработка и внедрение новых технологий по иммунопрофилактике ослабленных детей, что существенно снизило риск развития осложненного течения вакцинального процесса, увеличило число привитых детей и уменьшило заболеваемость;
- своевременная диагностика и адекватное лечение детей с нейроинфекциями и их последствиями, что способствовало уменьшению инвалидизации данной категории пациентов;
- диагностика и лечение критических состояний при тяжелом течении инфекционных болезней у детей, выявление факторов риска и разработка мер по их предупреждению;
- изучение внутриутробных инфекций и условий их возникновения, что позволило разработать научно обоснованные алгоритмы оценки риска развития некоторых врожденных инфекций.

Академик РАН Ю.В. Лобзин — основатель нового научного направления «Реабилитация инфекционных больных», он сформировал собственную научную школу.

При его научном консультировании и руководстве подготовлены 23 докторские и 45 кандидатских диссертаций в области инфекционных болезней, военной эпидемиологии и организации здравоохранения.

В 2002 г. Юрий Владимирович был удостоен государственной награды — почетного звания «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».

Юрий Владимирович является соавтором 4 научных открытий, автором 830 научных трудов, среди которых 26 учебных пособий, 6 справочников, 17 руководств для врачей и 34 монографии — «Руководство по инфекционным болезням» (1996, дополненные и переработанные издания 2000, 2003, 2011 — в 2 книгах), учебник для медицинских вузов «Инфекционные болезни» (2001), руководство по «Рациональной антимикробной фармакотерапии» (2003), руководство по «Избранным вопросам терапии инфекционных больных» (2005), руководство и атлас по паразитарным болезням (протозоозам и гельминтозам) (2006, 2011), руководство «Энтеровирусные инфекции» (2012), курс лекций для практических врачей «Вакцинопрофилактика» (2012), Справочник по инфекционным болезням у детей (2013), «Вирусные болезни человека» (2015) и др.

Немаловажным аспектом деятельности Ю.В. Лобзина является его активное участие в общественно-научной работе. Он является членом президиума Северо-Западного отделения РАН, президентом Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, куратором по Северо-Западному федеральному округу от Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, заместителем председателя Национального научного общества инфекционистов, Президентом Ассоциации врачей-инфекционистов Санкт-Петербурга и Ленинградской области,

членом Фармкомитета Минздрава России, председателем Диссертационного совета в Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, членом Диссертационного совета в СЗГМУ им. И.И. Мечникова, главным редактором «Журнала инфектологии», членом редколлегий и редсоветов журналов «Эпидемиология и инфекционные болезни», «Медицинский академический журнал», «Инфекционные болезни», «Военно-медицинский журнал», «Вестник Российской Военно-медицинской академии» и ряда других центральных медицинских научных изданий.

Ю.В. Лобзин является лауреатом премии Правительства Российской Федерации в области образования за 2013 год, имеет Благодарности Президента Российской Федерации, Председателя Правительства Российской Федерации, Министра обороны Российской Федерации и руководителя ФМБА России за эффективное решение вопросов теории и практики предупреждения и лечения инфекционных болезней. За большой вклад в организацию противоэпидемических мероприятий в войсках он награжден орденом «За военные заслуги».

Профессионализм высокого уровня, добросовестное отношение к своим обязанностям, любовь к научной и педагогической деятельности, верность своему призванию, а также доброжелательность снискали Юрию Владимировичу заслуженный авторитет и уважение в кругу медицинской и научной общественности.

Редакция журнала «Вестник РАМН», многочисленные ученики, друзья и коллеги сердечно поздравляют Юрия Владимировича с юбилеем и желают ему крепкого здоровья, счастья, дальнейших творческих успехов, новых открытий, неиссякаемой энергии, благополучия и всего самого наилучшего!

Предлагаем редакционную подписку на Журнал «Вестник Российской медицинской академии наук». Журнал входит в Перечень ВАК. Периодичность выхода журналов 6 раз в год.
Адрес редакции: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2/62.
Телефон/факс: 8 (499) 132-72-04, e-mail: sales@nczd.ru



За один номер — 750 рублей