



№ 2 (38) июнь 2011

КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор:

Эмануэль В. Л., д. м. н., проф.

Заместители главного редактора:

Зыбина Н. Н., д. б. н., проф.

Сухоруков В. С., д. м. н., проф.

Директор редакции:

Чередниченко Д. В., к. м. н.

Зав. редакцией:

Эмануэль Ю. В., к. м. н.

Редактор перевода:

Филиппова Н. А., к. м. н.

Ответственный секретарь

Джавлах Е. С.

Адрес редакции:

197022, Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, д. 6/8

Телефон редакции:

(812) 233 97 26

Эл. почта:

ejvcons@mail.ru

Журнал зарегистрирован

в Федеральной службе

по надзору в сфере связи,

информационных технологий

и массовых коммуникаций

(Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации:

ПИ №ФС77-38698 от 22.01.2010

Учредитель:

ГОУ ВПО «СПб Государственный

медицинский университет

им. акад. И. П. Павлова

Федерального агентства

по здравоохранению

и социальному развитию»

(197022, Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, д. 6/8)

Журнал издается при поддержке

ООО «АкваТест СПб»

Санкт-Петербург

Подготовка к печати и печать:

ООО «Издательско-

полиграфическая

компания «КОСТА»»,

тел. **(812) 445 10 02**

Санкт-Петербург,

Новочеркасский пр., д. 58

Тираж 2000 экз.

Заказ №

Уважаемые коллеги!
Редакция журнала поздравляет Вас
с профессиональным праздником!

Мы желаем Вам:
Хронического здоровья,
Рецидивирующего счастья,
Гипертонической зарплаты,
Беременного кошелька!

Чтобы болезни суровые
Миру не дали пропасть,
Будьте отменно здоровыми.
С праздником!

С радостью Вас!

Директор научно-образовательного
центра «Институт лабораторной медицины»,
заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики с курсом
молекулярной медицины, д. м. н., профессор

Эмануэль В. Л.



**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА
«КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»**

Антонова И.Н., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	Карпишенко А.И., д. м. н., профессор, СПб ГУЗ МИАЦ
Афанасьев Б.В., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	Ларионова В.И., д. м. н., профессор, СПбГМА им. И. И. Мечникова
Вавилова Т.В., д. м. н., СПбГМА им. И.И. Мечникова	Лиознов Д.А., д. м. н., доцент, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
Власов Т.Д., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	Матвеев С.В., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
Жлоба А.А., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	Смирнов А.В., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
Звартау Э.Э., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	Сухоруков В.С., д. м. н., профессор, НИЛ общей патологии НИИ педиатрии и детской хирургии РАМН (Москва)
Зыбина Н.Н., д. б. н., профессор, ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС (Санкт-Петербург)	Хоровская Л.А., д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
Зуева Е.Е., д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	Чухловин А.Б., д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
	Эмануэль В.Л., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
	Ягмуров О.Д., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА
«КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»**

Айламазян Э.А., д. м. н., профессор, академик РАМН, з. д. н. РФ, НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН (Санкт-Петербург)	Сапрыгин Д.Б., д. м. н., профессор, РМАПО (Москва)
Дидур М.Д., д. м. н., профессор, ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» (Санкт-Петербург)	Соколовский Е.В., д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
Дубина М.В., д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, СПбФТНОЦ РАН	Стивен Хау Ян Вонг, Ph. D., DABCC (TC), FACS, председатель секции протеомики и молекулярной патологии AACC (США)
Дюк В.А., д. т. н., профессор, СПИИРАН (Санкт-Петербург)	Бринкманн Т., адъюнкт-профессор клинической биохимии медицинского факультета Университета Рура в Бохуме (Германия)
Калмнер Андерс, д. м. н., профессор, Каролинский госпиталь (Стокгольм, Швеция)	Цыган В.Н., д. м. н., профессор, член-корреспондент РАЕН, ВМА им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)
Мазуров В.И., д. м. н., профессор, член-корреспондент РАМН, з. д. н. РФ, СПбМАПО	Шляхто Е.В., д. м. н., профессор, член-корр. РАМН, з. д. н. РФ, ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» (Санкт-Петербург)
Петришев Н.Н., д. м. н., профессор, академик МАНВШ, академик РАЕН, з. д. н. РФ, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова	

Содержание

ПОЗДРАВЛЕНИЕ	1
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ	2
МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ «БИОХИМИЯ — БИОФИЗИКА — ИНФОРМАТИКА — ТРИ КИТА ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ XXI ВЕКА»	
<i>А.В. Арутюнян</i>	
СУТЬ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ	5
<i>О.А. Васильева, В.Д. Якушина, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий</i>	
ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГАЛЕКТИНА-3 В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ (МИНИ-ОБЗОР)	12
<i>Н.С. Демикова, Б.А. Кобринский, А.Ю. Асанов, А.В. Воинов</i>	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОГО АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ	18
<i>А.К. Мартусевич, Н.Ф. Камакин</i>	
НОВЫЙ АЛГОРИТМ ВИЗУАМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРИСТАЛЛОГЕННЫХ И ИНИЦИИРУЮЩИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ	23
<i>В.К. Поздеев, Н.В. Поздеев</i>	
ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ (ГЛУТАМАТА, АСПАРТАТА, ТАУРИНА, ГАМК) И АМИНОТИОЛОВ (ГЛУТАТИОНА, ГОМОЦИСТЕИНА, ЦИСТЕИНА) — СПОСОБ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ.	27
<i>К.С. Рожнова</i>	
ОСОБЕННОСТИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЭНЕРГООБМЕНА ПОДРОСТКОВ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ	35
<i>Т.М. Рожнова</i>	
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗАВИСИМОСТИ	46
<i>О.А. Санина, Т.А. Яхно, А.Г. Санин</i>	
НОВЫЙ ЭКСПРЕСС-ТЕСТ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ ОЖГОВОЙ ТРАВМЕ	52
<i>Ю.Ю. Тарасевич, И.В. Водолаская, О.П. Исакова</i>	
ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МЕТОД КЛИНОВИДНОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ФИЗИКИ	60
<i>В.И. Тельнов, З.Б. Токарская</i>	
БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ У ЛЮДЕЙ, ПОДВЕРГШИХСЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОМУ ОБЛУЧЕНИЮ: РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ	63
<i>В.А. Щуров, Н.О. Могеладзе</i>	
ОЦЕНКА УРОВНЯ НЕКОНЪЮГИРОВАННОГО ЭСТРИОЛА ПРИ ПАТОЛОГИИ БЕРЕМЕННОСТИ	73
<i>Т.А. Яхно, О.А. Санина, А.Г. Санин, В.Г. Яхно</i>	
ДИНАМИКА МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАПЕЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ В ПРОЦЕССЕ ВЫСЫХАНИЯ КАК ИНФОРМАТИВНЫЙ ПАРАМЕТР ДЛЯ ОЦЕНКИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО СТАТУСА ЖИДКИХ СРЕД	76
ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИИ «БИОХИМИЯ — БИОФИЗИКА — ИНФОРМАТИКА — ТРИ КИТА ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ XXI ВЕКА»	
<i>Г.М. Бутрович, О.А. Востряхина</i>	
ДИАГНОСТИКА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА МЕТОДОМ АНАЛИЗА ПРОТЯЖЕННЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК, ВЫЯВЛЕННЫХ В СТУЛЕ ПАЦИЕНТОВ	87
<i>А.А. Жлоба, Э.Л. Блашко, Е.Г. Маевская</i>	
ТЕХНОЛОГИЯ АНАЛИЗА ФРАКЦИИ ОБЩЕГО ГОМОЦИСТЕИНА, СВЯЗАННОГО С КРУПНОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ.	87
<i>А.И. Шихлярова, Г.Я. Марьяновская, Л.П. Барсукова, Е.П. Коробейникова, Т.П. Протасова, Е.А. Шейко</i>	
НЕКОТОРЫЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ	88

Содержание

<i>А.И. Шихлярова, С.М. Кечеджиева, Г.Я. Марьяновская, Л.П. Барсукова, Е.П. Коробейникова</i> КОРРЕГИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ОПТИКО-МАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА УРОВЕНЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АУТОГЕМОХИМИОТЕРАПИИ (АГХТ) БОЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	89
--	----

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЧЕК

<i>В.В. Вельков</i> NGAL — «РЕНАЛЬНЫЙ ТРОПОНИН», РАННИЙ МАРКЕР ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК: АКТУАЛЬНОСТЬ ДЛЯ НЕФРОЛОГИИ И КАРДИОХИРУРГИИ	90
<i>Ю.А. Морозов, М.А. Чарная, И.И. Дементьева</i> ЦИСТАТИН С В ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКЕ ФУНКЦИИ ПОЧЕК У КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ.	101

НОВЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

<i>А.В. Разыграев</i> АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ, УСТРАНЯЮЩАЯ ГОМОЦИСТЕИН С УЧАСТИЕМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА. ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	105
ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «БИОТЕХНОЛОГИЯ. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К БОКСАМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ» . . .	109
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	111

СУТЬ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

А.В. АРУТЮНЯН

Учреждение Академии наук «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН», г. Гатчина

Резюме. Кратко описаны физические основы метода лазерной корреляционной спектроскопии и указан традиционный аспект его применения. Описан математический инструментарий, неотделимый от метода. Показаны нетрадиционные, не вошедшие еще в широкую практику аспекты его применения, связанные с массовым мониторингом населения путем измерения и обработки спектра рассеяния различных биологических жидкостей человека (сыворотка и плазма крови, слюна и т.п.) у больших групп населения. Целью такого мониторинга может быть выяснение внешних факторов, оказывающих влияние на организм людей и «визуализируемых» в спектрах рассеяния его биологических жидкостей. Описан набор классификаторов для «тотального» (т.е. неединичного) анализа множества результатов мониторинга.

Описан компактный лазерный корреляционный спектрометр на гетеродинной схеме, доступный для работы оператора средней квалификации (медсестра).

Ключевые слова: лазерная корреляционная спектроскопия, динамическое светорассеяние, медицинский классификатор, пространственный классификатор, спектр рассеяния биологических жидкостей.

METHOD OF LASER CORRELATION SPECTROSCOPY (DYNAMIC LIGHT SCATTERING) AND METHODIC PECULIARITIES OF ITS USE IN MEDICINE

A.V. ARUTYUNYAN

B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Gatchina

Summary. This work outlines the principles of dynamic light scattering method (DLS) and its traditional ordinary application aspect. The inseparable, indispensable mathematical techniques are described in short. The main purpose of this work is to show nontraditional and not widely applied aspects of the method. Namely, a population health monitoring is possible to reveal the external factors acting on human organisms by measuring DLS-spectra of biological liquids (blood serum and plasma, saliva etc.). A set of classifiers is described as instruments for such monitoring and the compact and easy-to-use DLS-spectrometer is described for the same purpose.

Key words: dynamic light scattering, medical classifier, space-related classifier, spectrum of scattering in biological fluids.

Данные для корреспонденции:

Арутюнян Александр Владимирович, научный сотрудник,

Учреждение Академии наук «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН»,

отделение молекулярной радиационной биофизики, лаборатория медицинской биофизики,

188300, Ленинградская область, г. Гатчина, Орлова роща, тел.: +7 (905) 230-20-85,

e-mail: arut@omrb.pnpi.spb.ru, arut61@mail.ru

Суть метода

Лазерная корреляционная спектроскопия — ЛКС (или динамическое светорассеяние, или фотонная корреляционная спектроскопия, или метод оптического смещения, или dynamic light scattering) относится к широкому классу физических методов светорассеяния, когда информация о рассеивающем объекте «извлекается» из рассеянного света. Весь класс этих методов делится на две группы. Первая — более «древняя» — когда информация об объекте извлекается из интенсивности

рассеянного света, и вторая группа — собственно динамическое светорассеяние, когда информация о рассеивателе отражена в и извлекается из измененных частотных характеристик рассеянного света.

На рисунке 1А показан спектр — зависимость интенсивности от частоты — лазерного луча. В результате рассеяния на флуктуациях плотности рассеивателя он «уширяется», оставаясь центрированным на изначальной частоте лазерного луча ω (рис. 1Б). Рассасывание флуктуаций плотности рассеивателя — процесс диффу-

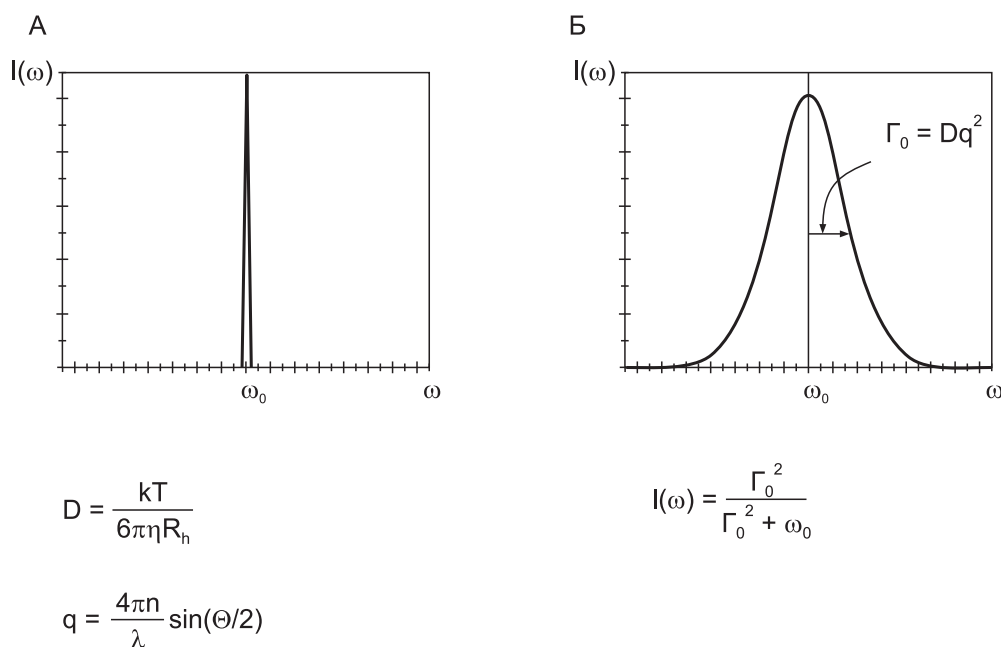


Рис. 1. Спектр невозмущенного лазерного луча (А) и его «уширение» в результате рассеяния на флуктуациях плотности рассеивателя (Б)

зионный, поэтому полуширина на полувысоте спектра рассеянного света Γ_0 оказывается пропорциональной коэффициенту диффузии растворенного рассеивающего вещества D . Он, в свою очередь, обратно пропорционален гидродинамическому радиусу — размеру — рассеивающей частицы R_h . Таким образом, появляется возможность, измеряя спектр рассеянного света, определять размер рассеивающих частиц. Но...

Задача существенно усложняется, когда исследуемый раствор состоит из нескольких монодисперсных составляющих или полидисперсен. В этом случае вклад в интегральное уширение дают разные по размеру рассеиватели, и возникает знакомая из других областей науки обратная спектральная задача, — когда по имеющемуся интегральному спектру надо определить «состав участников», давших каждый свой вклад в интегральную картину (рис. 2). Такая задача относится к классу некорректных задач, и до определенного времени — до появления методов регуляризации и их машинной реализации — задачи эти не имели решения.

В рамках нашей лаборатории создана и прошла многолетнюю апробацию (с ~ 1984 года) одна из первых успешно работающих математических процедур регуляризации, позволяющая определить вклад в интегральный спектр $A(\Gamma)$ и полуширину Γ соответствующих рассеивателей. Таким образом, в результате измерения спектра рассеяния вы можете получить распределение по размерам частиц-рассеивателей, составляющих исследуемый раствор в диапазоне размеров от 1 нм до ~ 5000 нм. В настоящее время эта процедура представляет собой часть программы, реализованной на персональном компьютере, с хорошо развитым дружественным к пользователю графическим интерфейсом. В той

же программе реализован и в необходимой мере автоматизирован процесс измерения спектра рассеяния (рис. 3). Здесь же приведен типичный пример гистограммы рас-

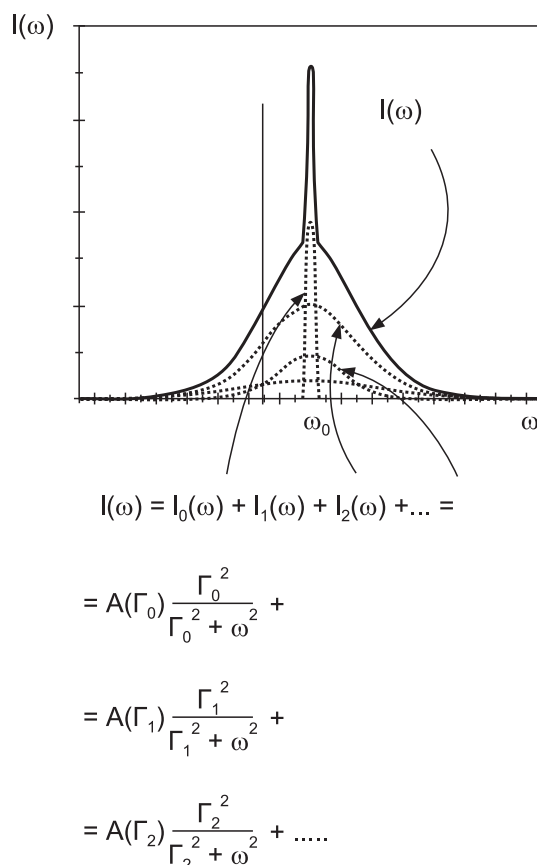


Рис. 2. Интегральный спектр рассеяния сложного образца и вклад в него разных групп рассеивателей — предмет решения обратной спектральной задачи с помощью процедуры регуляризации

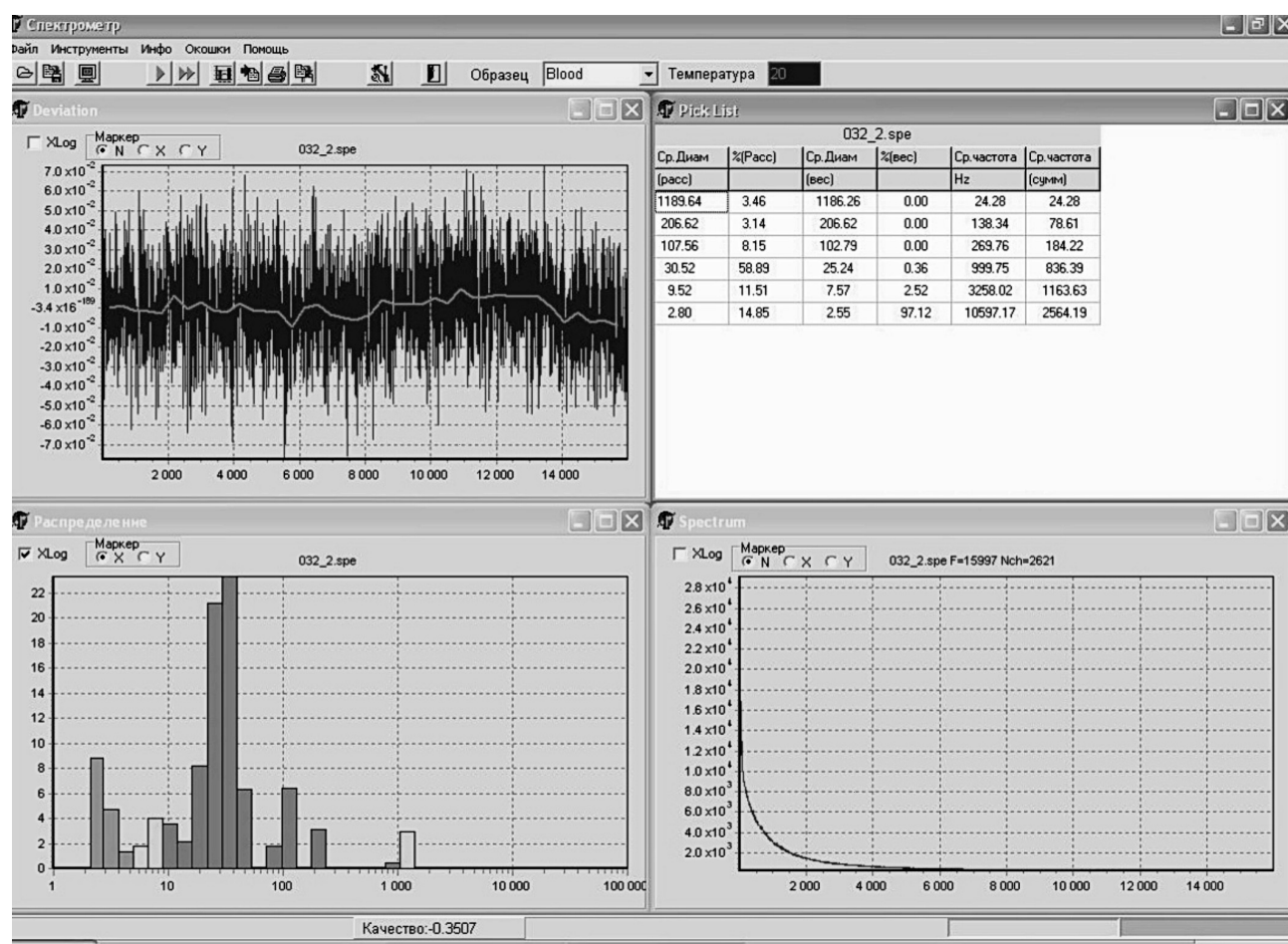


Рис. 3. Вид на дисплее компьютера программы, реализующей измерения спектров рассеяния образцов биологических жидкостей и их матобработку процедурой регуляризации

пределения частиц по размерам (ГРР) в сыворотке крови, полученной в результате матобработки спектра рассеяния. Площадь каждого столбика пропорциональна вкладу частиц данного диапазона размеров в интегральный спектр. Шкала размеров очевидно дискретна и состоит из 32 точек (левое нижнее окошко на рисунке). В правом нижнем окне — половинка (из-за симметрии) накопленного реального спектра рассеяния сыворотки крови онкологического больного, результатом матобработки которого и стала приведенная ГРР. Характеристики ярко выраженных пиков на гистограмме отражены в таблице в левом верхнем углу рисунка.

Применение метода

Устойчивые пики таких распределений исследуемых образцов и являются той информацией, которой исследователь может оперировать. Это — типичное, традиционное использование ЛКС. В его рамках в случае сложного распределения идеальным считается получить угловую зависимость частотной (средней) полуширины Γ интересующего пика, и из угловой зависимости получить D и затем средний размер R_h в этом пике. Но можно обойтись и без угловой зависимости, если для исследу-

емого идентичность или обособленность пика стала очевидной. С этим аспектом применения метода, с его методологией уместно ознакомиться в [10] и в [1, 2, 3].

Но представляет несомненный интерес другой, по всей видимости, нетрадиционный аспект использования обсуждаемого метода.

В рамках его спектры сывороток и плазмы крови измерялись при одинаковых условиях и параметрах, т. е. в одной и той же частотной полосе, при одной и той же температуре (в узком диапазоне температур) и на угле рассеяния 90° . Результаты измерений (ГРР) заносились в многолетний банк данных (~с 1988 года), организованный на магнитном носителе персонального компьютера для классификации результатов. Позднее были накоплены банки данных и для других биологических жидкостей.

Понятно, что визуальный анализ гистограмм малоэффективен. Необходимы были специальные классификационные программы, которые позволяли бы провести анализ большого количества данных для диагностических целей. Поэтому была разработана специальная методика статистического анализа ГРР исследуемых биологических жидкостей. Поясним.

Каждую гистограмму можно представить в виде 32-мерного вектора A_i (поскольку 32 точки шкалы размеров ГРР), т.е. точкой в 32-мерном пространстве. Естественно предположить, что для группы людей с определенным заболеванием или сдвигом гомеостаза точки будут группироваться в определенной области этого 32-мерного пространства. Для 2 групп измерений, априорно ожидаемых как отличающиеся, находится такая двумерная проекция этого 32-мерного пространства, чтобы эти 2 области точек были максимально разнесены. Таким образом, исследовав достаточно представительные группы таких людей, можно очертить области, в кот. лежат значения A_i для них, а значит, получить возможность качественно судить о принадлежности конкретного случая к той или иной группе. Разумеется, к примеру, области нормы и различных болезней могут частично перекрываться. Но обследование достаточно представительных групп различных болезней позволяет в ряде случаев утверждать, что данный человек не относится к какой-то группе или группам (рис. 4).

Следующим шагом было создание классификатора, позволяющего каждое ГРР отнести к какому-нибудь характерному типу распределений. Для этого все ГРР сыворотки и плазмы крови из банка данных были суммированы, определены были по такому тотальному ГРР характерные пики и впадины, и весь диапазон шкалы размеров для ГРР был поделен на 5 областей с учетом характерных пиков. На основе верифицированных больных с документированным диагнозом были определены характерные типы распределения по этим 5 областям и предложена осторожная терминология — названия каждого типа (рис. 5).

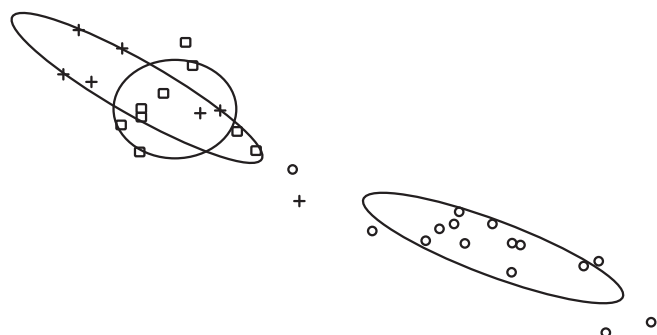


Рис. 4. Графическая классификация трех групп: информативной (O), больных раком прямой кишки 2-й стадии (+) и 4-й стадии (□)

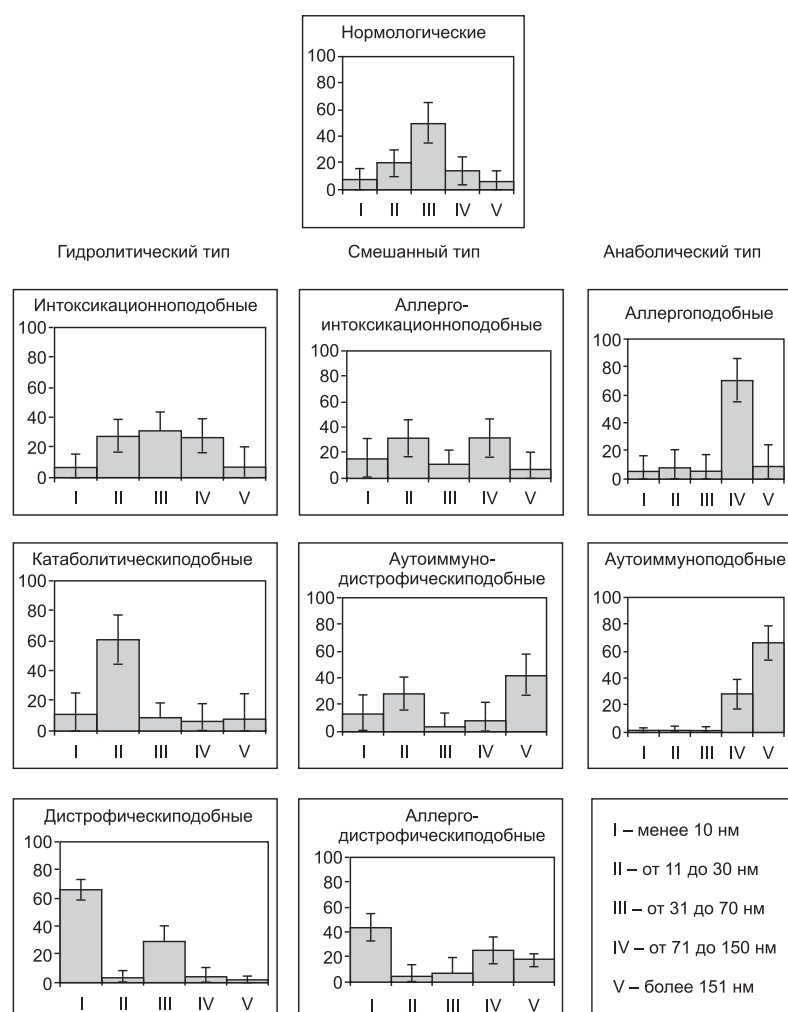


Рис. 5. Характерные типы распределения частиц-рассеивателей в крови по 5 областям размеров для разного класса болезней и предложенная терминология — название каждого типа

Подробно с применением такого диагностического классификатора можно ознакомиться в монографии [10] и в работах [4, 5, 6, 7, 8].

На наш взгляд, одной из наиболее перспективных возможностей использования ЛКС в обсуждаемом аспекте является задача мониторинга окружающей среды. Т.е. обследование достаточно представительной выборки клинически здоровых людей может сразу дать информацию о наличии постоянно действующих вредных факторов, вызывающих системный ответ организма, «визуализируемый» в спектрах ЛКС его биологических жидкостей (рис. 6).

К сожалению, эта очень перспективная возможность использования метода ЛКС еще ждет своих адептов и своего осуществления.

Следующим шагом в развитии возможностей пространственного классификатора стало определение, по каким из 32 координат (размеров) две исследуемые группы максимально отличаются одна от другой или максимально похожи одна на другую. Был построен математический функционал для анализируемых 2 групп,

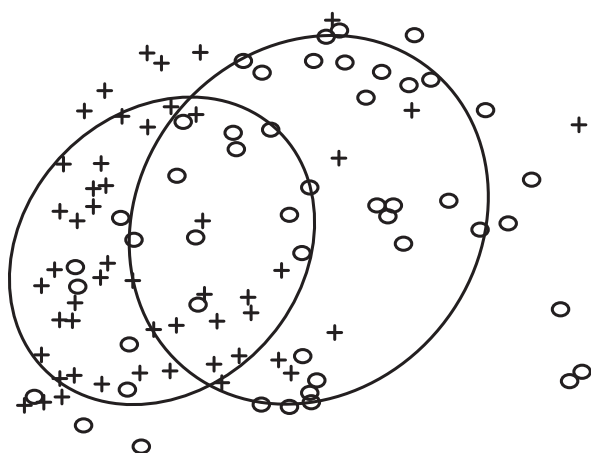


Рис. 6. Графическая классификация ГРР сыворотки крови репортерских групп из Архангельска (+) и Чернобыля (O)

зависящий от указанных 32 координат. Точки минимума этого функционала соответствуют тем координатам (размерам), по которым эти 2 группы максимально отличаются одна от другой. А точки максимума — это координаты-размеры, в которых эти 2 группы максимально похожи (рис. 7).

Из рисунка 7 видно, что функционал минимален в 9-й и 12-й координатах, а максимален, к примеру, в 11-й и 15-й. Это значит, если спроецировать 32-мерные области на плоскость этих двух координат 9-й и 12-й, то 2 исследуемые группы будут максимально разнесены, т.е. будут максимально отличаться (рис. 8).

Из таблицы слева на рисунке видно, что 9-я и 12-я координаты соответствуют диапазонам размеров со средним значением радиуса частиц в диапазоне 12,8 и 31,4 нм соответственно. Ну а если спроецировать на плоскость, задаваемую осями координат 11 и 14, то исследуемые 2 совокупности должны сильно накладываться, что и видно из рисунка 9. На этих рисунках (8 и 9) представлены 2 исследуемые группы: квадратики — онкологические больные, овалы — клинически здоровые доноры. Крестики — это средние точки — центры масс 2 этих распределений. Эллипсы — эллипсы рассеяния — ограничивают области среднеквадратичного отклонения от центров масс. Получается, что эти 2 группы по всей совокупности своих распределений максимально отличаются в размерах 12,8 и 31,4 нм и максимально НЕ отличаются в размерах частиц 23,3 и 56,9 нм (это гидродинамические радиусы R_h).

О приборе

Изменения частоты лазерного луча (спектральное уширение) в результате рассеяния на типичных образцах очень незначительны по сравнению с частотой самого луча ($\sim 10^{-10}$ – 10^{-15}). Поэтому для их регистрации используется «биение» рассеянного луча на опорном, не претерпевшем рассеяния, луче гораздо большей интенсивности. Это — т.н. схема гетеродинамирования. Либо используется «самобиение» рассеянного луча на самом себе (схема гомодинамирования, или гомодинная схема). В первом случае предполагается совмещение фронтов

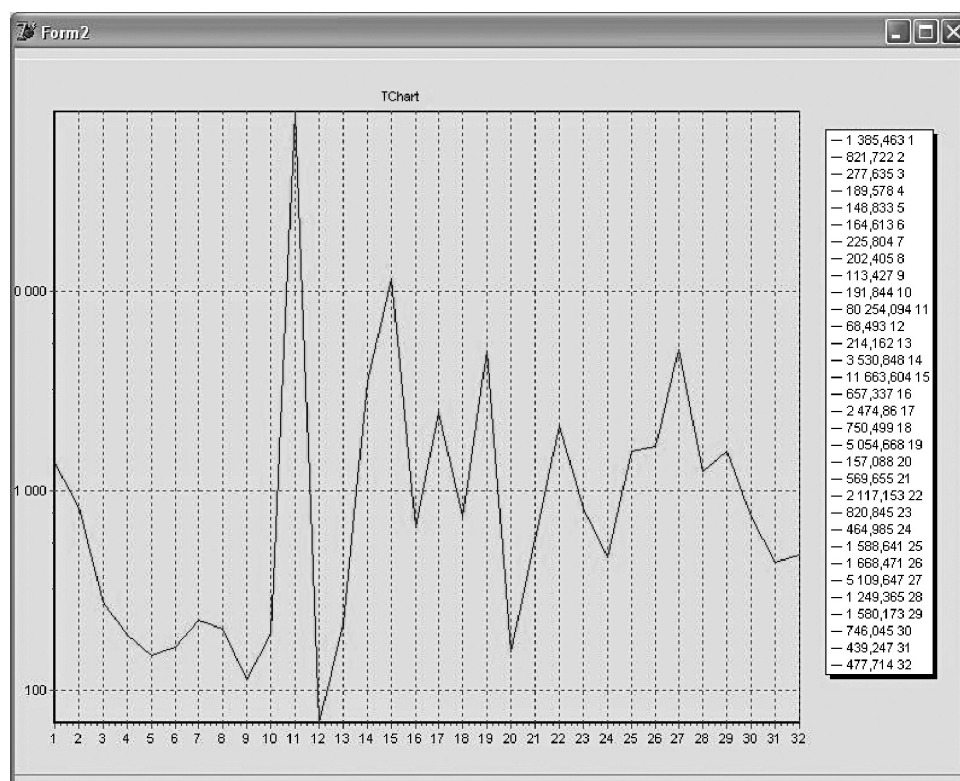


Рис. 7. График минимизируемого функционала по 32 точкам (диапазонам) размеров частиц-рассеивателей в крови, отражающий схожесть (максимумы) или различия (минимумы) для двух больших групп людей — онкологических больных и клинически здоровых

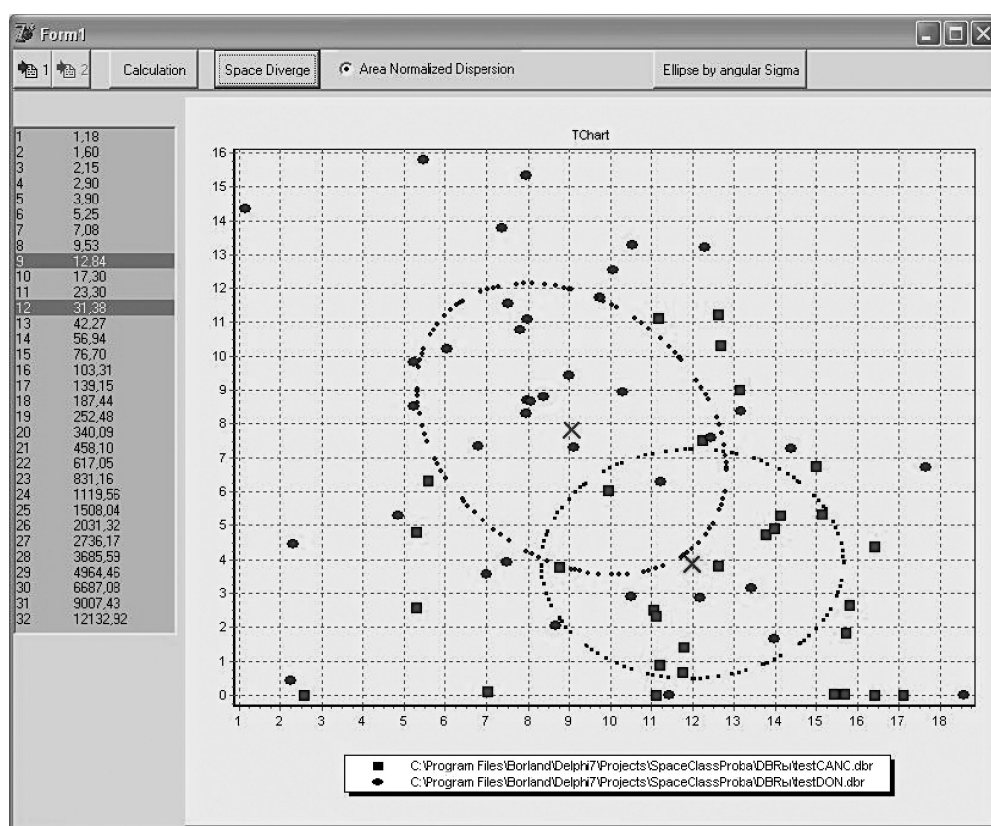


Рис. 8. Проекция 32-мерного пространства на двумерную плоскость, на которой две группы распределений по размерам (ГРП) максимально отличаются (см. текст). Каждая точка этого 32-мерного пространства — ГРП отдельного человека

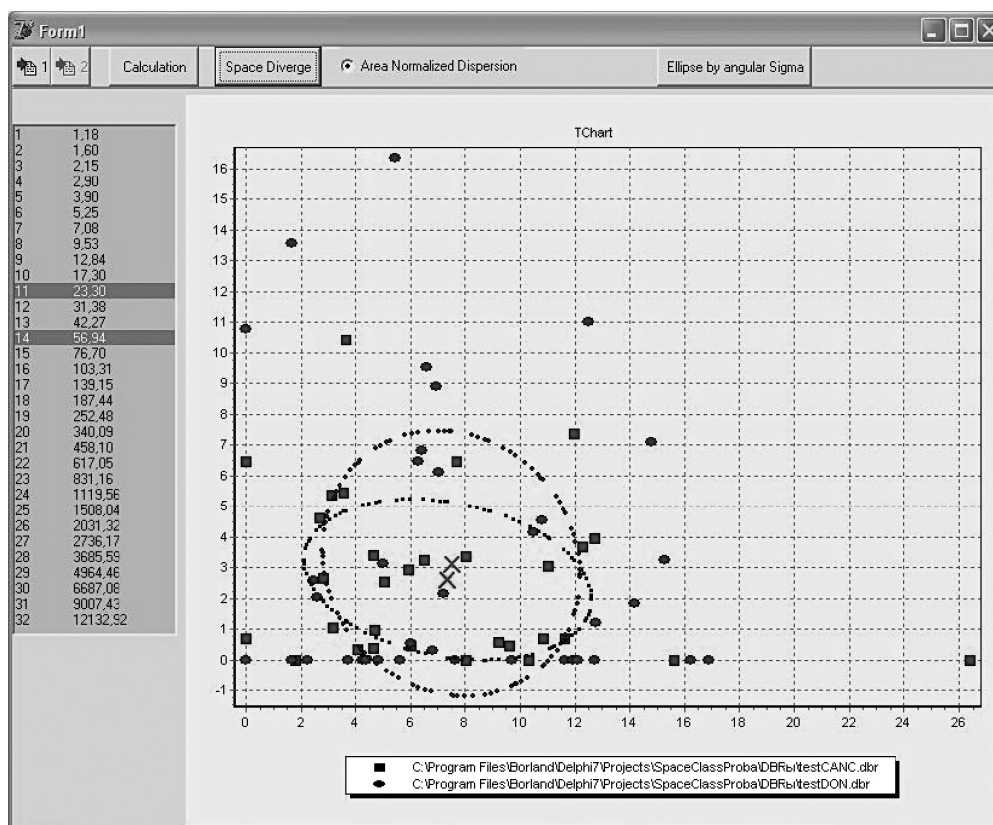


Рис. 9. То же, что и на рисунке 8, но для плоскости, где ГРП максимально похожи

двух лучей на фотоприемнике (рассеянного и нерассеянного), т. е. тщательная юстировка. Во второй схеме регистрируется лишь один — рассеянный — луч, и специальная юстировка не требуется. Именно по второй, более упрощенной схеме, работают все мировые аналоги ЛКС-спектрометров. В наших установках изначально реализована схема гетеродинамирования, как более устойчивая к присутствию посторонних сильных рассеивателей в исследуемом образце, а значит, не требующая специальной очистки образца от оптической «пыли». Работа на портативном ЛКС-спектрометре, таким образом, становится доступной оператору средней квалификации (медсестре, например), а не только научному работнику, что крайне удобно и дает возможность массового и быстрого мониторинга.

Другим немаловажным достоинством примененной нами схемы является то, что в случае попадания в поле рассеяния отдельной сильно рассеивающей частицы в принципе не происходит искажения сигнала всего спектра. В гомодинамной схеме в этом случае имеет место паразитное гетеродинамирование от сильно рассеивающей частицы, и результирующее распределение по размерам может уже не соответствовать действительности.

Таким образом, нами создан миниатюрный и упрощенный вариант ЛКС-спектрометра с рассеянием на угол 90° . Его прототипы являются коммерческим вариантом ЛКС. За последние годы создано около 40 таких установок. В этой установке реализована оригинальная геометрия рассеяния на 90° , с разделением лазерного луча на опорный и рассеиваемый (гетеродинамирование) в пределах одного стеклянного «кристалла» — так называемого «шеврона». Кювета для образца представляет собой стандартную одноразовую пластиковую кювету от спектрофотометра с объемом образца 150 мкл. Можно также использовать специальную стеклянную съемную толстостенную кювету. В последнее время в установке в качестве источника света используется лазерный светодиод, позволивший существенно упростить и миниатюризировать установку, а значит, использовать ее в том перспективном ключе, который изложен выше — для массового мониторинга населения с целью выяснения влияния внешних факторов среды на человека и не только.

Итак, есть необходимый инструментарий — прибор и программные продукты — для использования известного физического метода в «нетрадиционном» и вместе с тем полезном и, на наш взгляд, важном аспекте — для мониторинга населения с целью выяснения факторов внешней среды, неизбежно влияющих на состояние

организма людей. Констатация сдвига гомеостаза, наблюдаемого в спектрах биологических жидкостей, с дальнейшей привязкой к статистически выявляемым диагнозам, получаемым обычными клиническими методами, дала бы объективную и наглядную картину состояния здоровья населения для тех, кто определяет социальную и здоровьесберегающую политику и кто далек от медицинской практики и терминологии.

Литература

1. Ланда С.Б., Филатов М.В., Пантина Р.В., Гармай Ю.П. Исследование экзосом, секретируемых различными нормальными и злокачественно трансформированными клетками *in vitro* и *in vivo* // Клиническая лабораторная диагностика. — 2010. — Т. 12. — С. 35–43.
2. Ланда С.Б., Филатов М.В., Арутюнян А.В. Исследование экзосом, секретируемых различными нормальными и злокачественно трансформированными клетками *in vitro* и *in vivo* // Креативная хирургия и онкология. — 2010. — Т. 4. — С. 87–91.
3. Арутюнян А.В., Капшин Ю.С., Кленин С.И. Изменение жесткости полимерной цепи ДНК фага λ в водном растворе с низкой ионной силой в диапазоне pH 4–9.5 // Биофизика. — 2001. — Т. 46, вып. 2. — С. 225–234.
4. Алчинова И.Б., Вейко Н.Н., Дмитриева О.С., Ланда С.Б., Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю. Применение метода лазерной корреляционной спектроскопии для оценки метаболических сдвигов у работников радиационно-опасного производства // Гигиена и санитария. — 2006. — № 5. — С. 77–79.
5. Karganov M.Y., Kozhevnikova M.I., Aleschenko A.V., Khlebnikova N.N., Dmitrieva O.S., Alchinova I.B., Dmitrieva G.P., Pelevina I.I., Noskin L.A. Correlation between cytogenic abnormalities in cells and metabolic shifts during spinal deformities in children // Studies in Health Technology and Informatics. — 2006. — V. 123. — P. 9–13.
6. Титов В.Н., Карганов М.Ю., Ротенко А.А., Дмитриев В.А., Алчинова И.Б., Архипова Е.Н. Биологические функции и биологические реакции. Лазерная корреляционная спектроскопия в оценке чистоты межклеточной среды — функции эндозеологии (Лекция) // Клиническая лабораторная диагностика. — 2009. — № 6. — С. 21–35.
7. Karganov M., Alchinova I., Arkhipova E., Dubovoi R. Non-invasive polysystemic analysis of ecological and anthropogenic factors influence on children // J. Trends of Biomedicine. — 2009. — V. 24, N1. — P. 26–27.
8. Karganov M., Skalny A., Alchinova I., Khlebnikova N., Grabeklis A., Lakarova E., Eisazadeh S. Combined use of laser correlation spectroscopy and ICP-AES, ICP-MS determination of macro- and trace elements in human biosubstrates for intoxication risk assessment // Trace elements and electrolytes. — 2011. — V. 28, N 2. — P. 124–127.
9. Бажора Ю.И., Носкин Л.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине. — Одесса: Друк, 2002. — 400 с.
10. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. — Киев: Наукова думка, 1987. — 256 с.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГАЛЕКТИНА-3 В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ (МИНИ-ОБЗОР)

О.А. ВАСИЛЬЕВА, В.Д. ЯКУШИНА, Н.В. РЯЗАНЦЕВА, В.В. НОВИЦКИЙ

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Томск

Резюме. В статье приведены новые данные о семействе β -галактозидсвязывающих белков — галектинах. Галектины вовлечены в многочисленные процессы жизнедеятельности клеток — регуляцию клеточного цикла, адгезию клеток, передачу межклеточных сигналов, некоторые галектины являются маркерами трансформации клетки и медиаторами воспаления. В настоящее время галектин-3 в лабораторной диагностике используется в двух направлениях: как маркер опухолевой трансформации и как биомаркер хронической сердечной недостаточности. В многочисленных исследованиях описана взаимосвязь галектинов и рака и определена прямая зависимость — чем больше экспрессия галектина-3 в опухоли, тем более злокачественна опухоль и тем выше её метастатический потенциал. Кроме того, доказана повышающая регуляция галектина-3 в гипертрофированном миокарде, его стимулирующий эффект в отношении миграции макрофагов, пролиферации фибробластов и развития фиброза. Увеличение уровня галектина-3 в сыворотке крови пациентов с сердечной недостаточностью ассоциируется с неблагоприятным прогнозом заболевания.

Ключевые слова: галектин-3, опухоль щитовидной железы, маркеры хронической сердечной недостаточности.

USE GALECTIN-3 IN LABORATORY DIAGNOSTICS (MINI REVIEW)

O.A. VASILJEVA, V.D. YAKUSHINA, N.V. RYAZANTSEVA, V.V. NOVITSKY

State educational institution of higher professional education «Siberian State Medical University»

Department of Health and Social Development of Russian Federation, Tomsk

Summary. The article concerns new data about family of β -galactoside-binding proteins — galectins. Galectins are involved in numerous vital processes of cells, such as cell cycle regulation, cell adhesion, transmission of intercellular signals, some galectins are markers of cell transformation and mediators of inflammation. At the present time galectin-3 in laboratory diagnostics is used in two ways: as a marker of malignant transformation and as a biomarker of chronic heart failure. In numerous researches described the relationship galectins and cancer, and identified a direct correlation — the more galectin-3 expression in tumors, the more malignant tumor, and the higher its metastatic potential. In addition, the up-regulation by galectin-3 proved in the hypertrophied myocardium, its stimulatory effect on migration of macrophages, fibroblast proliferation and fibrosis. Increased galectin-3 in the serum of patients with heart failure is associated with poor prognosis disease.

Key words: galectin-3, tumor of a thyroid gland, markers of chronic heart failure.

Данные для корреспонденции:

Васильева Ольга Александровна, канд. мед. наук,

ассистент кафедры фундаментальных основ клинической медицины

ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России,

г. Томск, 634050, Московский тракт, 2, тел.: +7 (906) 947-35-73, e-mail: Vasiljeva-24@yandex.ru

Быстрота и информативность, с которой расширяются наши представления о регуляции иммунологического гомеостаза в норме и при различной патологии, ярко иллюстрируются стремительным накоплением наших знаний о членах семейства лектинов — галектинах. Лектины — это углеводсвязывающие белки [3]. Учение о лектинах относится к одной из наиболее динамично развивающихся отраслей знания о белках. Лектины существуют в растворимой или клеточно-связанной форме и в своей структуре имеют углеводсвязывающие

участки (домены) с различной специфичностью к лигандам. Домены лектинов выступают в качестве чувствительнейших биосенсоров, детектирующих определенные углеводные последовательности в олигосахаридах, которые являются специфическими лигандами в углевод-белковом взаимодействии [1].

Галектины в настоящее время являются предметом активного изучения, поскольку эти белки вовлечены в многочисленные процессы жизнедеятельности клеток — регуляцию клеточного цикла, адгезию клеток,

передачу межклеточных сигналов, некоторые галектины являются маркерами трансформации клетки и медиаторами воспаления [4, 27].

Галектин-3 — низкомолекулярный белок, с массой около 30 кДа [9, 14, 21], относится к семейству животных лектинов, способных распознавать β -галактозу. Структурно состоит из двух функциональных доменов: N-концевого регуляторного домена, содержащего множество повторяющихся пептидных последовательностей, богатых пролином, глицином и тирозином [24, 35], и C-концевого углеводсвязывающего домена [19, 20]. Регуляторный домен содержит повторяющиеся коллагеноподобные последовательности и обладает высокой подвижностью, с чем, вероятно, связаны трудности кристаллизации и изучения структуры нативного галектина-3. Углед-распознающий домен галектина-3 представляет собой две антипараллельные β -складчатые структуры, одна из которых образована шестью, а другая — пятью пептидными цепями [4, 20, 28].

Галектины оказывают свое влияние на клетки-мишени через связывание углеводраспознающего домена с гликоконъюгатами клеточной поверхности. При этом считается, что белки данного семейства, в отличие от цитокинов, имеющих свои специфические рецепторы на клетках определенного типа, не имеют индивидуальных рецепторов. В результате этого создается впечатление, что галектины распознают любые гликаны, несущие N-ацетиллактозамин-содержащие олигосахариды, на поверхности любой клетки. На самом деле, каждый лектин данного семейства взаимодействует с гликопротеинами, содержащими определенные олигосахариды [35].

К настоящему времени установлено, что галектин-3 связывает около 15 разных гликанов на поверхности Т-клеток [29], нейтрофилов [34], тучных клеток [15], а также гликопротеины матрикса, в том числе ламинин, фибронектин, LAMPs, 90K/Mac2BP, MP20 и SEA.

Помимо внеклеточного действия, рассматривается возможность галектинов функционировать, распознавая гликаны внутриклеточно. Стало известно, что белки данного семейства локализуются в цитоплазме и могут перемещаться в ядро или связываться с внутриклеточными везикулами при определенных условиях [22, 23]. Галектин-3 принимает участие в сплайсинге пре-мРНК [10, 32]. Ряд исследований показал, что галектины могут функционировать внутри клетки независимо от их углевод-связывающей активности. Галектин-3, в частности, связывает некоторые внутриклеточные белки, участвующие в путях сигнальной трансдукции [23]. Возможно, галектины связывают гликоконъюгаты внутри клеток во время их транспортировки к цитоплазматической мембране, когда гликаны компартиментализованы в эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи, везикулярной сети. Например, галектин-3 таким образом контролирует транспорт апикальных гликопротеинов эпителиальных клеток [13].

В настоящее время галектин-3 в лабораторной диагностике в основном используется в двух направлениях: как маркер опухолевой трансформации и как биомаркер хронической сердечной недостаточности.

Галектин-3 — маркер опухолевой трансформации

Галектин-3 участвует в регуляции всех этапов опухолевой прогрессии: способствует опухолевой трансформации клеток, стимулирует их пролиферацию, опосредует адгезию и агрегацию к экстрацеллюлярному матриксу, увеличивает миграционную способность, усиливает ангиогенез. Кроме того, галектин-3 может влиять на иммунный ответ и тем самым способствовать уходу опухолевых клеток из-под иммунологического надзора.

Стимуляция пролиферации обусловлена тем, что галектин-3 является фактором сплайсинга пре-мРНК и компонентом системы, регулирующей рост и дифференцировку клеток. Исследования рака щитовидной железы, толстой кишки и желудка показали, что экспрессия галектина возрастает пропорционально прогрессирующему росту клеток опухолей [1, 10, 32].

Галектины играют важную роль в межклеточном взаимодействии в процессе метастазирования. Галектин-3, связываясь с интегринами и белками межклеточного матрикса, ингибирует адгезию опухолевых клеток друг к другу или межклеточному матриксу, что приводит к неконтролируемому росту и инвазии опухолевых клеток [4, 22].

Также был изучен эффект галектина-3, продуцируемого опухолевыми клетками, на Т-лимфоциты, инфильтрирующие опухоль. Галектин-3 индуцирует апоптоз в противоопухолевых Т-клетках [5, 16]. На модели меланомы человека на иммунодефицитных мышах было показано, что воздействие галектина-3 на мышей со скрытой формой опухоли приводит к подавлению цитотоксического эффекта противоопухолевых Т-клеток и способствует прогрессированию опухолевого роста [25].

В многочисленных публикациях описана взаимосвязь галектинов и рака и определена прямая зависимость — чем больше экспрессия галектина в опухоли, тем более злокачественна опухоль и тем выше её метастатический потенциал [1, 5, 7, 8].

В последнее время особенно активно изучается роль галектина-3 в пато- и морфогенезе рака щитовидной железы. Тонкоигольная пункционная биопсия щитовидной железы с последующим цитологическим исследованием является первичной диагностикой доброкачественных и злокачественных новообразований данного органа, однако некоторые пункции являются неинформативными, а иногда не удается разграничить доброкачественные новообразования от злокачественных [1].

Галектин-3 является белком, практически в 100% случаев позволяющим отличить злокачественные новообразования щитовидной железы от доброкачественных.

Доброкачественные узлы и неизменная тиреоидная ткань не экспрессируют галектин-3 [1, 7, 25]. В исследованиях Д.Ю. Семенова и соавт. (2010) с помощью метода проточной цитофлуориметрии была исследована экспрессия галектина-3 в материале тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) у 66 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы (ЩЖ). По данным цитологического исследования материала ТАБ, в исследование включены 29 пациентов с папиллярным раком ЩЖ, 31 — с фолликулярной опухолью, 6 — с узловым коллоидным зобом. Среди 29 пациентов с предоперационным диагнозом папиллярный рак экспрессия галектина-3 наблюдалась в 27 случаях, из которых по данным гистологического исследования в 25 (92,6%) подтвержден диагноз высокодифференцированного рака ЩЖ, а в 2 (7,4%) диагностированы доброкачественные заболевания ЩЖ. В 2 (6,9%) случаях, когда экспрессия галектина-3 не определялась, по данным гистологического исследования образования ЩЖ был подтвержден папиллярный рак. В группе пациентов с цитологическим диагнозом фолликулярной опухоли экспрессия галектина-3 наблюдалась у 2 больных с высокодифференцированным раком ЩЖ (папиллярный и фолликулярный рак) и у 2 пациентов с фолликулярной и онкоцитарной аденомой ЩЖ. У остальных 27 пациентов с доброкачественными образованиями экспрессия галектина-3 не выявлялась. Среди 6 (100%) пациентов с узловым коллоидным зобом экспрессия галектина-3 не была выявлена. Таким образом, чувствительность метода ПФЦ для определения экспрессии галектина-3 в аспирате из узла ЩЖ составила 93,1%, специфичность — 89,2%, диагностическая точность — 90,9%. Выявление экспрессии белка галектина-3 методом проточной цитофлуориметрии может быть использовано в качестве дополнительного метода дооперационной диагностики высокодифференцированного рака ЩЖ [6].

Другие исследователи оценивали экспрессию галектина-3 с помощью непрямой иммуногистохимической реакции с использованием антител к галектину-3 в операционном материале и в цитологических препаратах, полученных с помощью ТАБ [7, 18, 25, 33]. Всеми исследователями были получены аналогичные результаты, и оценка галектина-3 предопределяла гистологическое заключение о злокачественности или доброкачественности процесса в 100% случаев [7, 18, 25, 33].

Таким образом, применение иммуноморфологического окрашивания антителами к галектину-3 является надежным и чувствительным диагностическим подходом к предоперационной диагностике папиллярного и фолликулярного рака щитовидной железы.

Галектин-3 — биомаркер хронической сердечной недостаточности

Предикторы риска ухудшения течения сердечной недостаточности (СН) или госпитализации являются

областью активного исследовательского интереса. Многообещающими оказались данные, свидетельствующие о клинической и прогностической ценности галектина-3 у пациентов с СН, представленные D.J. van Veldhuisen (Университетский медицинский центр Гронингена, Нидерланды) на научной конференции Американского общества по СН (Heart Failure Society of America) в 2009 г. В большом количестве исследований показана повышающая регуляция¹ галектина-3 в гипертрофированном миокарде, его стимулирующий эффект в отношении миграции макрофагов, пролиферации фибробластов и развития фиброза. Эти данные имеют особенное значение, поскольку ремоделирование миокарда является важной детерминантой клинического исхода СН и связано с прогрессированием заболевания и неблагоприятным прогнозом. Поскольку экспрессия галектина-3 максимальна на пике фиброза и практически отсутствует после выздоровления, стандартные измерения у лиц с СН могут оказаться ценными для идентификации пациентов высокого риска повторной госпитализации или смерти, таким образом давая возможность врачу назначать лечение с учетом индивидуальных особенностей пациента [11, 12].

Согласно результатам работы D.J. van Veldhuisen [31] повышение уровня галектина-3 свидетельствует об увеличении риска смерти или госпитализации пациентов с СН. Такой вывод сделан на основании ретроспективного обзора данных многоцентрового рандомизированного клинического исследования COACH (Coordinating study evaluating Outcomes of Advising and Counselling in Heart Failure), в котором в течение 18 месяцев проводилось сравнение 2 терапевтических стратегий с традиционной терапией у 1023 госпитализированных больных с СН. В проведенном D.J. van Veldhuisen анализе установлено повышение в > 2,5 раза риска смерти/госпитализации по поводу СН независимо от возраста, пола, уровня В-типа натрийуретического пептида у пациентов с уровнем галектина-3 в диапазоне 25,9–66,6 нг/мл (нормализованное отношение рисков составило 2,67; 95% ДИ 1,74–4,09; $p < 0,0001$) [31].

Для количественного определения уровня галектина-3 у больных хронической СН используется метод иммуноферментного анализа. Однако наборы для определения галектина-3 представлены исключительно зарубежными производителями (Human Galectin-3 ELISA: Bender MedSystems, Австрия; Abnova, США; Kamiya Biomedical Company, США; Quantikine®, R&D Systems, США; BG Medicine, Inc., США). Наборы всех перечисленных фирм позволяют определять галектин-3 в сыворотке, гепаринизированной и ЭДТА-плазме, а также в супернатантах клеточных культур.

¹ Повышающая регуляция (up-regulation) — процесс усиления взаимодействия лиганда с рецептором вследствие увеличения количества доступных рецепторов.

Диапазон нормальных значений галектина-3 в сыворотке крови составляет: 2,4–15,7 нг/мл; в ЭДТА плазме — 2,03–15,5 нг/мл; в гепаринизированной плазме — 1,92–14,3 нг/мл (Quantikine®, R&D Systems, США).

Компанией BG Medicine, Inc., США набор для определения галектина-3 был протестирован на 895 образцах плазмы пациентов с левожелудочковой дисфункцией и хронической сердечной недостаточностью II, III, IV классов на базе клиник США и Канады. На основании проведенного исследования по уровню галектина-3 были выделены 3 группы риска пациентов с хронической СН.

В группе с высоким риском летального исхода концентрация галектина-3 превышала 25,9 нг/мл; пограничный диапазон значений составил 17,8–25,9 нг/мл; а в группу с низким риском были отнесены пациенты с плазменным уровнем галектина-3 менее 17,8 нг/мл.

Интерферирующими агентами при определении галектина-3 методом ИФА являются: ревматоидный фактор (>50 уе/мл), гамма-глобулины (>2,5 г/дл). Другие компоненты сыворотки крови (прямой и непрямо́й билирубин, альбумин, триглицериды, холестерин, креатинин) не оказывают влияния на процесс определения галектина-3.

Следует отметить, что из всех производителей наборов для количественного определения галектина-3 только компанией BG Medicine, Inc., США в инструкции описаны возможные варианты интерпретации результатов анализа, даны рекомендации по анализу данных о совместном определении двух новых биомаркеров ХСН: NT-proBNP и галектина-3 [17].

Показано, что повышение уровня галектина-3 в сыворотке крови пациентов с острой сердечной недостаточностью ассоциируется с неблагоприятным прогнозом в 60-дневный период после подъема. Важно отметить, что определение галектина-3 позволяет более точно прогнозировать скорую гибель или повторное обострение при СН, чем определение NT-proBNP. Одновременное определение галектина-3 и NT-proBNP позволяет существенно повысить точность прогноза при острой СН [2, 30].

Однако, несмотря на уже достигнутые результаты, необходимы дальнейшие исследования для прояснения взаимоотношений галектина-3 с патофизиологией и прогрессированием сердечной недостаточности.

Заключение

Анализ литературы показал, что развитие процесса внедрения галектина-3 как диагностического маркера идет в двух невязанных направлениях: с одной стороны, доказана великолепная чувствительность теста в дифференциальной диагностике и прогнозировании опухолей щитовидной железы, с другой стороны — галектин-3 рассматривается как маркер сердечной недостаточности. Для качественного определения уровня экспрессии галектина-3 в клетках используются методы иммуногистохимии и проточной цитометрии, а для ко-

личественного мониторинга в биологических жидкостях — метод иммуноферментного анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы, ГК №16.512.11.2087; ГК №16.740.11.0636.

Литература

1. Антонова С.С., Юшков П.В. Галектин-3 как представитель семейства лектинов: роль в норме и при патологии // Молекулярная медицина. — 2004. — № 1. — С. 60–64.
2. Панфилова Е.Ю., Данковцева Е.Н., Затеищikov Д.А. Новые биомаркеры сердечной недостаточности // Фарматека. — 2008. — № 12. — С. 14–19.
3. Лахтин В.М., Лахтин М.В., Афанасьев С.С. и др. Общие свойства и принципы функционирования лектинов в биосистемах // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2008. — № 3. — С. 37–42.
4. Рапопорт Е.М., Курмышкина О.В., Бовин Н.В. Галектины млекопитающих: структура, углеводная специфичность и функции // Биохимия. — 2008. — Т. 73, № 4. — С. 483–497.
5. Радосавлевич Г.Д., Иванович И.П., Кнезевич М.Г. и др. Роль галектина-3 в метастазисе опухолей // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. — 2010. — Т. 51, № 3. — С. 191–196.
6. Семенов Д.Ю., Колоскова Л.Е., Борискова М.Е. и др. Экспрессия галектина-3 в дооперационной диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы // Проблемы эндокринологии. — 2010. — № 4.
7. Квежик Д., Савин С., Петрович И. и др. Экспрессия галектина-3 и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) в папиллярных карциномах щитовидной железы человека // Экспериментальная онкология. — 2005. — Т. 27, № 3. — С. 210–214.
8. Юшков П.В., Антонова С.С., Бартолаззи А. Галектин-3 в дифференциальной диагностике и прогнозировании фолликулярных опухолей щитовидной железы // Архив патологии. — 2004. — Т. 66, № 6. — С. 39–42.
9. Cooper D.N.W., Barondes S.H. God must love galectins: He made so many of them // Glycobiology. — 1999. — Vol. 9, N 10. — P. 979–984.
10. Dagher S.F., Wang J.L., Patterson R.J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — Vol. 92. — P. 1213–1217.
11. de Boer R.A., Yu L., van Veldhuisen D.J. Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure // Curr. Heart Fail. Rep. — 2010. — Vol. 7. — P. 1–8.
12. de Boer R.A., Voors A.A., Muntendam P. et al. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression // Eur. J. Heart Fail. — 2009. — N 11. — P. 811–817.
13. Delacour D. et al. Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo // J. Cell Sci. — 2008. — Vol. 121. — P. 458–465.
14. Dumić J., Dabelić S., Flögel M. Galectin-3: An open-ended story // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects. — 2006. — Vol. 1760, № 4. — P. 616–635.
15. Frigeri L.G., Zuberi R.I., Liu F.T. eBP, a β -galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc ϵ RI) and activates mast cells // Biochemistry. — 1993. — Vol. 32. — P. 7644–7649.
16. Fukumori T. et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis // Cancer Res. — 2003. — Vol. 63. — P. 8302–8311.

17. Galectin-3 information center: http://www.galectin-3.com/?page_id=15.
18. Gasbarri A., Martegani M.P., Del Prete F. et al. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules // J. Clin. Oncol. — 1999. — Vol. 17(11). — P. 3494–502.
19. Krzeslak A., Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein // Cellular & molecular biology letters. — 2004. — Vol. 9. — P. 305–328.
20. Leffler H., Carlsson S., Hedlund M. et al. Introduction to galectins // Glycoconj. J. — 2004. — Vol. 19. — N 7–9. — P. 433–440.
21. Liu F.T., Rabinovich G.A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2010. — Vol. 1183. — P. 158–182.
22. Liu F.T., Rabinovich G.A. Galectins as modulators of tumour progression // Nat. Rev. Cancer. — 2005. — Vol. 5(1). — P. 29–41.
23. Liu F.T., Patterson R.J., Wang J.L. Intracellular functions of galectins // Biochim. Biophys. Acta. — 2002. — Vol. 1572. — P. 263–273.
24. Maldonado C.A. et al. Cell-type specific regulation of galectin-3 expression by glucocorticoids in lung Clara cells and macrophages // Histology and Histopathology. — 2011. — Vol. 26. — P. 747–759.
25. Orlandi F., Saggiorato E., Pivano G. et al. Galectin-3 is a pre-surgical marker of human thyroid carcinoma // Cancer Res. — 1998. — Vol. 15, N 58(14). — P. 3015–3020.
26. Peng W., Wang H.Y., Miyahara Y. et al. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells // Cancer Res. — 2008. — Vol. 68 (17). — P. 7228–36.
27. Rabinovich G.A. et al. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer // Scand. J. Immunol. — 2007. — Vol. 66. — P. 143–158.
28. Sörme P., Arnoux P., Kahl-Knutsson B. et al. Structural and thermodynamic studies on cation- π interactions in lectin-ligand complexes: high-affinity galectin-3 inhibitors through fine-tuning of an arginine-arene interaction // J. Am. Chem. Soc. — 2005. — Vol. 127. — N 6. — P. 1737–1743.
29. Stillman B.N. et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death // J. Immunol. — 2006. — Vol. 176. — P. 778–789.
30. van Kimmenade R.R., Januzzi J.L. Jr. et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure // J. Am. Coll. Cardiol. — 2006. — Vol. 19, N 48(6) — P. 1217–1224.
31. van Veldhuisen D.J., Lok D., Damman K. et al. Clinical and prognostic value of galectin-3, a novel fibrosis-associated biomarker, in patient with chronic heart failure // J. Card. Fail. — 2009. — Vol. 15. — P. 814.
32. Vyakarnam A. et al. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing // Mol. Cell. Biol. — 1997. — Vol. 17. — P. 4730–4737.
33. Xu X.C., el-Naggar A.K., Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications // Am. J. Pathol. — 1995. — Vol. 147 (3). — P. 815–822.
34. Yamaoka A. et al. A human lectin, galectin-3 (eBP/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils // J. Immunol. — 1995. — Vol. 154. — P. 3479–3487.
35. Yang R.Y., Rabinovich G.A., Liu F.T. Galectins: structure, function and therapeutic potential // Expert Rev. Mol. Med. — 2008. — Vol. 10. — P. 17.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ
КОНСИЛИУМ

ПО ВОПРОСАМ СОТРУДНИЧЕСТВА ПРОСИМ ОБРАЩАТЬСЯ:

- ПУБЛИКАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ
в научно-практическом журнале
«Клинико-лабораторный консилиум»

Эмануэль Владимир Леонидович

Тел. 8-905-229-60-22,
e-mail: ejvcons@mail.ru

- РЕКЛАМНЫЙ ОТДЕЛ:

**Венскович Татьяна Анатольевна
Морозова Ирина Александровна**

Тел./ф: (812) 600-22-74,
e-mail: akvatest@mail.ru

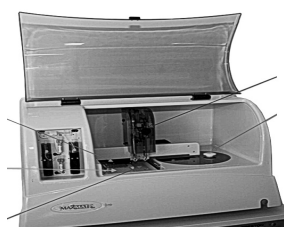


Фирма «Энергия СПб»

Авторизованный представитель «CORMEY»
Поставщик «Госзаказ Санкт-Петербурга»

Новейшее лабораторное оборудование, расходные материалы и реагенты для КДЛ
Инсталляция, обучение и сервисное обслуживание
Методическая поддержка персонала
Гарантийное и послегарантийное обслуживание

◆ **NEW!** Новейшая автоматическая система для исследования системы гемостаза – **MaxMat PL COAG**



В автоматическом режиме реализованы следующие типы измерений:

- нефелометрический (регистрация бокового рассеивания света или клоттинговый, хронометрический);
- колориметрический (фотометрический или хромогенный: кинетический или кинетический по 2 точкам);
- иммунотурбидиметрический (для латексных тестов);
- клоттинговый (для липемических плазм).

Производительность: до 140 тестов в час (Протромбиновое время) или от 50 до 57 тестов в режиме «пациент за пациентом» или «тест за тестом» для выполнения заказа панели тестов **PT/APTT/TT/FIB/D-DIMER**. В качестве реакционных кювет инструмент использует стандартные плоскодонные микропланшеты с конфигурацией 8 × 12 лунок. Система полностью открытая для любых производителей реагентов.

◆ **Гематологические анализаторы «Mythic-18», «Mythic-22» «ORPHEE»**

с частичной или полной дифференциацией лейкоцитов. Достоинства: подходят для оснащения диагностических и исследовательских лабораторий любого профиля. Отличаются высокой точностью, надежностью, удобным каталожным русифицированным меню, компактностью. «Mythic-18» – настоящий «антикризисный» прибор, отличается непревзойденной экономичностью в расходе реагентов и открытостью всех настраиваемых опций для оператора.



◆ **NEW!** Продолжение линейки «ORPHEE» – гематологический автоматический анализатор с автоподачей «Mythic 22 AL»:



Самый маленький среди своих «одноклассников», минимальный объем пробы (менее 17 мкл), экономичный по затратам на реагенты для 5Diff измерений, всего один лизирующий реагент для замера, подача образцов в кассетах для разных пробирок, очень мягкое атравматичное автоматическое перемешивание крови, одновременная автозагрузка до 50 образцов, возможность подачи STAT-пробы вручную с использованием венозной и капиллярной крови.

◆ **NEW!** Непревзойденный мастер автоматизации процесса клинического электрофореза – автоматическая система «Interlab G26»:



Достоинства: загрузил и ушел. Электрофорез фракций сывороточных белков, в том числе с разделением бета фракции β_1/β_2 , электрофорез фракций сывороточных белков с высоким разрешением, электрофоретическое разделение липидных фракций, фракций гемоглобина, белков мочи, изоферментов ЛДГ, КФК, ЩФ, иммунофиксация белков Бен-Джонса, ЦСЖ, белков мочи в геле с СДС. Производительность: до 78 электрофорезов фракций и до 16 иммунофиксаций в час.

Мы готовы к стабильному и взаимовыгодному сотрудничеству!

195221, Санкт-Петербург, пр. Металлистов, д. 96, оф. 349

Тел./факс: (812) 320-1679, 320-1680 Сайт: www.energiaspb.ru E-mail: info@energiaspb.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОГО АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Н.С. ДЕМИКОВА¹, Б.А. КОБРИНСКИЙ¹, А.Ю. АСАНОВ², А.В. ВОИНОВ³

¹ ФГУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии Минздравсоцразвития», г. Москва, Россия

² ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», г. Москва, Россия

³ Exelixis Inc., Сан-Франциско, США

Резюме. В статье описывается применение усовершенствованного метода словарного шкалирования как лингвологической процедуры интеллектуального анализа данных для классификации наследственных болезней в целях повышения эффективности клинической диагностики на долабораторном этапе обследования больных. Принципиально важно использование в данной работе шкалы весовых характеристик симптомов в описаниях заболеваний, так как признаки встречаются в различных возрастных группах с изменяющейся частотой ввиду прогрессирования заболевания и, соответственно, изменения клинической картины болезней. Сформированная выборка была подвергнута анализу методом многомерного шкалирования в пространстве трех измерений. Полученная конфигурация точек была подвергнута обработке методом кластерного анализа. Представлены результаты использования данного метода в применении к массиву описаний клинических признаков наследственных заболеваний с вовлечением соединительной ткани для выявления как сходных, так и различающихся между собой групп болезней. Показано, что клинически сходные нозологические формы попадают в один кластер, что демонстрирует возможности метода в идентификации и классификации сложных для диагностики наследственных заболеваний. Визуализация показала устойчивость кластеров, включающих близких по клиническим проявлениям больных, в псевдотрехмерном пространстве. Для формализованного описания (аннотирования) заболеваний, сформированного на основании данных литературы и личного опыта врачей-экспертов, использовался многоуровневый англоязычный классификатор MeSH. Технологически настоящее исследование опирается на инструментальный комплекс, представляющий собой многоуровневую программную систему, реализующую широкий спектр операций над данными произвольного вида.

Ключевые слова: классификация наследственных болезней, метод интеллектуального анализа данных.

USING OF THE INTELLECTUAL ANALYSIS OF CLINICAL DATA FOR HEREDITARY DISEASES DIAGNOSTICS

N.S. DEMIKOVA¹, B.A. KOBRINSKIY¹, A.U. ASANOV², A.B. VOINOV³

¹ Moscow Research Institute for Pediatrics and Children's Surgery, Moscow, Russia

² First Moscow State Medical University named by I.M. Sechenov, Moscow, Russia

³ Exelixis Inc., San Francisco, USA

Summary. The article discusses the improved procedure of verbal scaling used for the file of descriptions concerning the clinical signs of hereditary diseases with connective tissue diseases. This method gives possibility to increase the efficacy of pre-laboratory diagnosis. It is important to use the weight scales of symptoms characteristics to describe the disease. The reason for this are the changes of the signs frequency in different age groups due to the progression of the disease and changes in its clinical picture. The analysis of the signs was performed by the multiple scaling in 3D space. After this the cluster analysis of the received configuration of points was performed. The results of the use of the method in the descriptions massive of hereditary diseases involving connective tissue are shown. The aim is to reveal both clinically similar and non-similar groups of the diseases. It was shown, that clinically similar nosological units appear to be included in one cluster. This fact demonstrate possibilities of method in identification and classification of the difficult for diagnostics hereditary diseases. The clusters, including the patients having similar clinical manifestations, showed to be stable in pseudo-3D space. For formalized description (annotation) of the diseases formed basing on the publication review and personal experience of the experts we used multilevel English classificatory MeSH. Technological basis for this investigation was the instrumental complex including multilevel program system realizing wide spectrum of different types of operations.

Key words: classification of hereditary diseases, method of the intellectual analysis of data.

Данные для корреспонденции:

Демикова Наталья Сергеевна — доктор медицинских наук,
ФГУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития РФ,
125412, Москва, ул. Талдомская, д. 2; тел.: 8 (916) 138-55-68, e-mail: ndemikova@pedklin.ru, ns_d@rambler.ru

Кобринский Борис Аркадьевич — доктор медицинских наук, профессор, акад. РАЕН,
ФГУ «МНИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития РФ,
125412, Москва, ул. Талдомская, д. 2, тел.: 8-916-123-86-20, e-mail: bakob@pedklin.ru, kba_05@mail.ru

Трудности клинической диагностики наследственных болезней в значительной степени обусловлены, с одной стороны, выраженным полиморфизмом клинических проявлений, изменением клинической картины с возрастом, а с другой стороны, отсутствием у значительной части из них специфических диагностических критериев. Кроме того, имеет место перекрываемость клинической картины разных заболеваний, что еще более осложняет проблему дифференциации генетически детерминированных болезней. Перечисленными причинами определяются и проблемы применения вычислительных и лингво-логических методов классификации и распознавания этой патологии [4].

С учетом редкости многих наследственных заболеваний, идентификация таких болезней крайне трудна и в значительной степени опирается на субъективные знания и опыт врачей-генетиков. Во многом это определяется также необходимостью максимального сужения дифференциально-диагностического ряда на долабораторном этапе ввиду сложности и высокой стоимости лабораторных исследований, значительная часть которых осуществляется в ограниченном числе учреждений.

Одна из возможностей повышения эффективности диагностики наследственных болезней заключается в использовании методов интеллектуального анализа данных, в частности метода «словарного шкалирования», основанного на обобщении практики аннотирования [1]. Интеллектуальный анализ данных (ИАД) представляет собой процесс обнаружения полезных для практического использования (в рамках поставленной задачи) сведений в наборах данных. Для выявления закономерностей и тенденций, существующих в данных, в ИАД применяется математический анализ. Обычно такие закономерности нельзя обнаружить при традиционном просмотре данных, поскольку связи слишком сложны, или из-за чрезмерного объема данных.

В настоящей работе экспериментальная процедура словарного шкалирования реализована в применении к массиву описаний клинических проявлений наследственных заболеваний с поражением соединительной ткани, с целью выявления как сходных, так и различающихся между собой групп болезней.

Технологически настоящее исследование опирается на инструментальный комплекс МЕДИС 4.0 [3]. Это многоуровневая программная система, реализующая широкий спектр операций над произвольными документами. Документом может быть, например, резюме статьи

из внешней электронной библиотеки, описание истории болезни пациента или иного реального случая применения экспертизы, а также любое словесное описание объекта предметной области. Два основных способа пополнения базы данных МЕДИС — это (1) ввод содержимого документов вручную или «импортирование» из локальной базы данных (например, из массива историй болезни какой-либо конкретной клиники) и (2) извлечение резюме журнальных статей из библиотеки Pubmed по сформированному запросу.

Для формализованного описания исследуемых заболеваний использовался многоуровневый классификатор MeSH [<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>], с помощью которого вводились клинические признаки, характеризующие клиническую картину заболевания. Исходя из возможностей (особенностей) данного классификатора, мы вынуждены были использовать в описаниях отдельных заболеваний признаки разного уровня. Необходимо отметить, что аннотированию с помощью классификатора MeSH в данном случае подвергалось формальное описание болезни, сформированное на основании данных литературы и личного опыта экспертов. Оно включало представление внешнего вида (образа) больного ребенка, сложившегося в сознании специалистов, дополненное признаками, характеризующими поражение костной, нервной систем, зрения, слуха и внутренних органов.

Всего описано 41 заболевание с преимущественным поражением соединительной ткани (болезни накопления, дизостозы).

Принципиально важно отметить, что в данной работе использованы временные шкалы весовых характеристик симптомов в описаниях заболеваний, так как признаки встречаются в различных возрастных группах с разной частотой ввиду прогрессирования заболевания и, соответственно, изменения клинической картины болезней. Веса были установлены в совместном обсуждении двумя экспертами для каждого из 4 возрастных периодов: при рождении, на 1-м году жизни ребенка, с 1 года до 3 лет, старше 3 лет. Шкала построена с учетом частоты проявления признаков: 5 — почти всегда (в 90–100%), 4 — часто (в 70–80%), 3 — в половине случаев (в 50%), 2 — редко (в 20–30%), 1 — очень редко (в 10%), 0 — отсутствие патологического признака [2].

Описания наследственных болезней представлены в виде таблиц данных, пригодных для обработки в упомянутой выше системе Медис.

Примеры аннотаций

MPS-6 (Синдром Марото-Лами)	Акроцефалополисиндактилия тип II Карпентера	Акроцефалосиндактилия тип Чотзена
Черепно-лицевые аномалии	Краниосиностоз	Краниосиностоз
Помутнение роговицы	Синдактилия	Гипертелоризм
Гипертелоризм	<i>Полидактилия</i>	Прогнатия
Тугоухость	Деформация носа	Косоглазие
Контрактуры	Патология тазобедр. суставов	<i>Синдактилия</i>
Низкий рост	Умственная отсталость	
Грыжи	Ожирение	
Кифоз	<i>Стеноз клапана легочной артерии</i>	
Деформации конечностей		
Отиты		
Риниты		
<i>Стеноз аортального клапана</i>		
Гепатомегалия		
Спленомегалия		
Межпозвоночные диски		

Таблица 1 пример, Стеноз аортального клапана и Стеноз клапана легочной артерии относятся к порокам сердца, а Черепно-лицевые аномалии, Синдактилия и Полидактилия входят в группу мышечно-скелетных аномалий (выделены курсивом).

Описанная таким образом выборка из 41 заболевания, аннотированная терминами MeSH, была подвергнута анализу методом многомерного шкалирования в пространстве трех измерений. Полученная конфигурация точек была подвергнута обработке методом кластерного анализа, критерий группировки которого отвечает требованию максимальной сбалансированности кластерного дерева.

В таблице 1 приведены, в качестве примера, аннотации трех из анализируемых нами заболеваний.

Для удобства восприятия в таблице жирным шрифтом выделены терминальные признаки, совпадающие при данных заболеваниях. Кроме того, представленные болезни сближает наличие признаков, происходящих из единого более высокого узла классификатора MeSH, на-

пример, Стеноз аортального клапана и Стеноз клапана легочной артерии относятся к порокам сердца, а Черепно-лицевые аномалии, Синдактилия и Полидактилия входят в группу мышечно-скелетных аномалий (выделены курсивом).

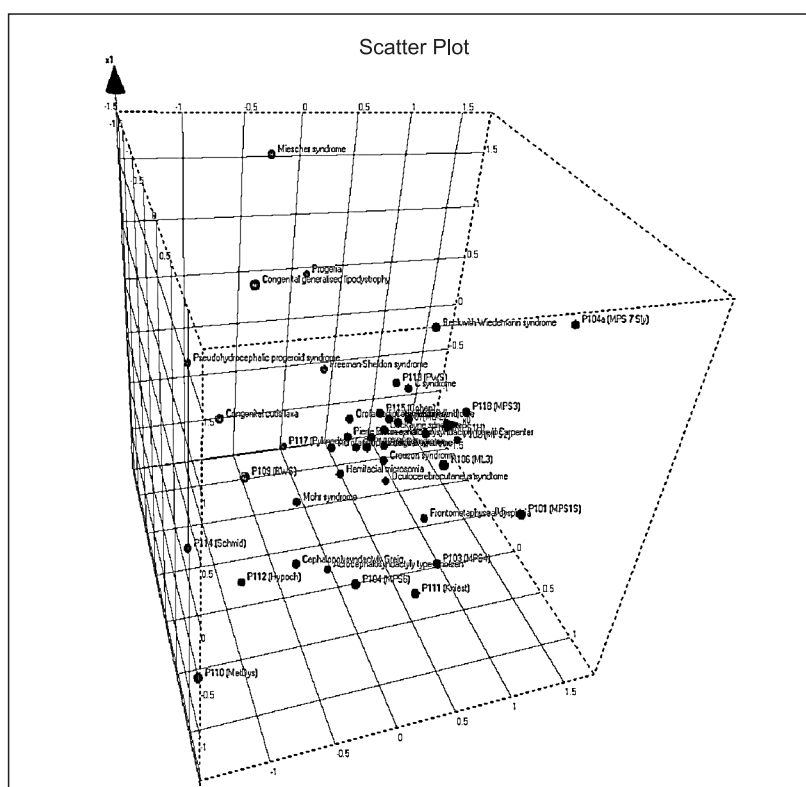


Рис. 1. Выделенные кластеры заболеваний

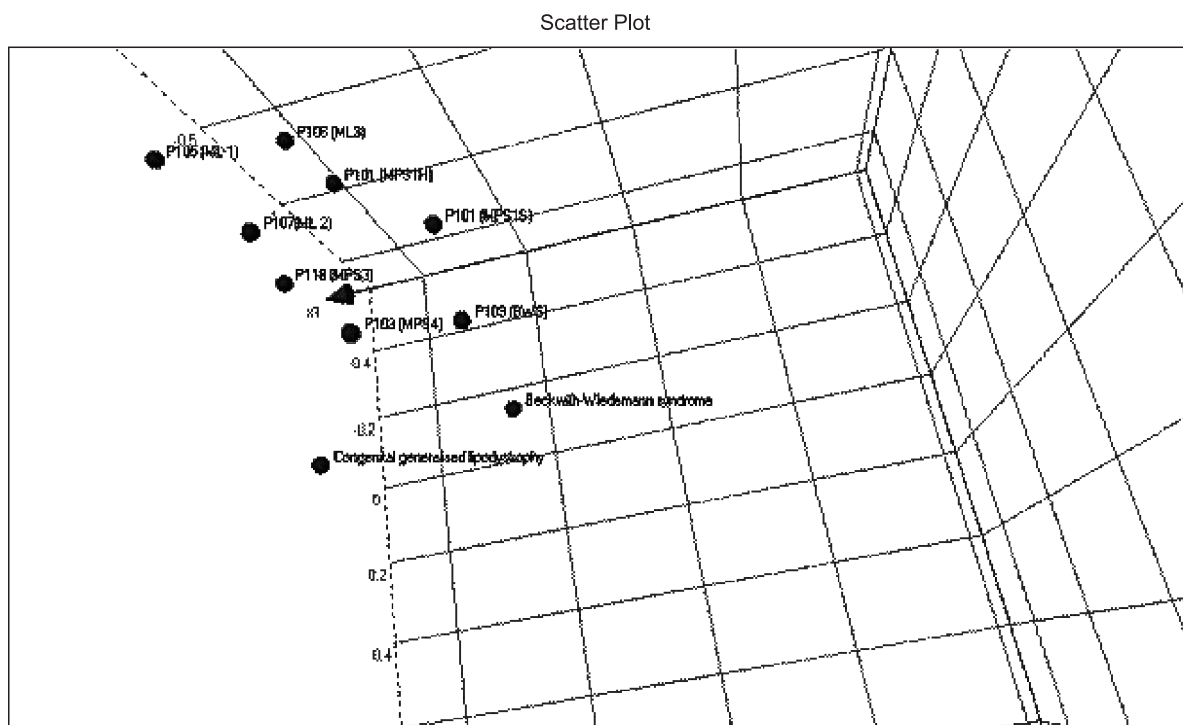


Рис. 2. Визуальное представление первого кластера в псевдотрехмерном пространстве

Результат анализа для одного из выделенных кластеров приведен на рисунке 2. Из него можно сделать вывод, что в один кластер попали близкие по клиническим проявлениям и патогенетическим механизмам заболевания. К примеру, по результатам кластеризации одну группу составили объекты, описывающие клиническую картину у больных мукополисахаридозами (MPS) IH (синдром Хурлер), IS (синдром Шейе), III (синдром Санфилиппо) и IV (синдром Моркио) типов, а также крайне схожими с ними муколипидозами (ML) I, II и III типов.

В то же время, осталось необъяснимым независимое расположение MPS VII типа (синдром Слая), визуально наблюдаемого во всех проекциях на значительном удалении от объектов, соответствующих больным со всеми

остальными типами МПС и другими заболеваниями. По-видимому, это обусловлено сравнительной новизной описания этого синдрома и отсутствием у экспертов личного опыта наблюдения таких больных. В ту же группу попали синдромы Беквитта–Видемана (BWS) и врожденной липодистрофии, у которых имеется лишь частичное перекрытие по признакам с мукополисахаридозами (табл. 2). Одним из объяснений попадания в одну группу отдельных несхожих синдромов может быть неполное соответствие используемого классификатора MeSH для описания специфической клинической картины наследственных синдромов.

В целом, при рассмотрении рисунка 2 и таблицы 2 можно видеть близость различных заболеваний в семантическом пространстве в первом кластере при различ-

Таблица 2

Объекты, соответствующие заболеваниям с различными категориями весов, объединенные в один кластер

Категория весов 1	Категория весов 2	Категория весов 3	Категория весов 4
ML1	ML1		
MPS3	MPS3	MPS3	MPS3
Вр. липодистрофия	Вр. липодистрофия	Вр. липодистрофия	
MPS1H	MPS1H	MPS1H	MPS1H
ML3	ML3	ML3	ML3
ML2	ML2	ML2	ML2
MPS4	MPS4	MPS4	MPS4
MPS1S	MPS1S	MPS1S	MPS1S
BWS	BWS	BWS	

ных категориях весов, т. е. при различном возрасте больных. Важно отметить, что объекты с нозологическими формами, совпадающими по основным клиническим проявлениям в различные возрастные периоды, попадали в один и тот же кластер независимо от различий в весовых категориях. При этом было отмечено совпадение как по отдельным терминальным признакам, так и по признакам, происходящим из единого более высокого узла классификатора MeSH. В отношении некоторых наблюдений, «выпадавших» при визуальном анализе кластеров, т. е. не соответствующих принятой классификации, была осуществлена частичная переаннотация (уточнение характеристик признаков), что позволило улучшить результаты классификации этих объектов. Частично же это определялось особенностями классификатора ввиду «конфликта» между целью составления тезауруса (для аннотации публикаций) и целью настоящего классификационного или дифференциально-диагностического исследования.

На основе изложенного можно сделать следующее заключение:

Интеллектуальный анализ данных, основанный на визуальной оценке различных кластеров, позволил оценить вклад отдельных симптомов в дифференциальную диагностику заболеваний.

Продемонстрирована эффективность процедуры словарного шкалирования. Показана возможность клас-

сификации и идентификации клинически сложных болезней наследственной природы при введении дополнительного условия, заключающегося в использовании весовых категорий для различных по возрасту больных детей.

Подтверждено высказанное нами ранее предположение о чрезвычайной чувствительности метода словарного шкалирования к выбору тезауруса терминов, используемых для аннотации, как по широте охвата, так и по семантическому содержанию конкретных терминов.

Выводы

- ✓ некоторые группировки диагнозов в кластерах устойчиво воспроизводились для всех возрастных групп;
- ✓ визуализация показала устойчивость кластеров в псевдотрехмерном пространстве;
- ✓ нетрадиционное, в отдельных случаях, объединение объектов с различными диагнозами в кластеры объяснялось близостью соответствующих терминов в таксономии;
- ✓ подобно врачу, выдвигающему первичную диагностическую гипотезу на основании отдельных высокоинформативных признаков, интеллектуальная система может объединять в кластер объекты, описания которых включают аналогичные признаки.

Литература

1. Воинов А.В., Кобринский Б.А. Иерархия локально-непротиворечивых полей знаний как модель образного мышления и интуиции эксперта в мягких предметных областях // Тр. 9-й национальной конф. по искусств. интеллекту с междунар. уч. Т. 2. — М.: Физматлит, 2004. — С. 785–793.
2. Воинов А.В., Демикова Н.С., Кобринский Б.А. Интеллектуальный анализ медицинских данных с использованием процедуры словарного шкалирования // Тр. 12-й национальной конф. по искусств. интеллекту с междунар. уч. КИИ-2010, Т. 1. — М.: Физматлит, 2010. — С. 153–160.

3. Воинов А.В., Демикова Н.С., Кобринский Б.А. Словарное шкалирование в медицинской информатике: инженерия знаний и интеллектуальный анализ данных // Тр. 10-й национальной конф. по искусств. интеллекту с междунар. уч. КИИ-2006. Т. 1. — М.: Физматлит, 2006. — С. 235–243.

4. Кобринский Б.А. От логики к интуиции и образным представлениям в искусственном интеллекте // Сб. науч. тр. Научной сессии МИФИ-2005: Т. 3. — М., 2005. — С. 34–35.

НОВЫЙ АЛГОРИТМ ВИЗУАМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРИСТАЛЛОГЕННЫХ И ИНИЦИИРУЮЩИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

А.К. МАРТУСЕВИЧ^{1, 2}, Н.Ф. КАМАКИН¹

¹ ГОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Росздрава, г. Киров, Россия

² ФГУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Росздрава, Нижний Новгород, Россия

Резюме. В данной статье изложен общий алгоритм анализа собственного и инициированного кристаллообразования биологических субстратов. Алгоритм основан на применении количественных параметров, характеризующих наиболее значимые особенности кристаллоскопических и тезиграфических фаций биоматериала человека и животных. В минимально достаточный спектр параметров, характеризующий кристаллоскопическую фацию, входят индекс структурности, кристаллизуемость, степень деструкции фации и выраженность краевой белковой зоны образца. Для тезиграфических фаций минимально достаточным является набор, включающий основной тезиграфический коэффициент (или тезиграфический индекс), коэффициент поясности, кристалличность, степень деструкции фации и выраженность краевой белковой зоны образца. Каждый из предлагаемых критериев является полуколичественным и рассчитывается по специальной балльной шкале. В статье приведено подробное описание данных шкал для всех перечисленных показателей. Постулируется, что данный визуаметрический метод может быть использован в диагностической биокристалломике.

Ключевые слова: биокристалломика, кристаллогенные свойства биологических жидкостей, кристаллогенез.

INTEGRATIVE ALGORITHM OF BIOLOGICAL SUBSTRATA CRYSTALLOGENIC AND INITIATED PROPERTIES ESTIMATION

A.K. MARTUSEVICH^{1, 2}, N.F. KAMAKIN¹

¹ State Educational Institution of Higher Professional Education «Kirov State Medical Academy» Roszdrav, Kirov, Russia

² Federal State Institution «Nijegorodski Scientific Research Institute of Traumatology and Ortopedics» Roszdrav, Nijny Novgorod, Russia

Summary. The article discusses general algorithm of basic and initiated crystallogenesis in biological substrates. Algorithm is based on quantitative criteria, characterizing main peculiarities of crystalloscopic and teziographic facias in biomaterials of humans and animals.

In minimal estimation kit for crystalloscopic facia we include structure index, crystallizability, facia destruction degree and marginal zone clarity. For teziographic facias the minimal amount of investigations include main teziographic coefficient (or teziographic index), belt coefficient, crystallity, facia destruction degree and intensity of marginal protein zone. All these criteria are semi-quantitative and can be calculated using special scale. The article describes all these indicators and scales. This method can be useful for diagnostic biocrystallogics.

Key words: biocrystallogics, crystallogenic properties of biofluids, crystallogenesis.

Данные для корреспонденции:

Мартусевич Андрей Кимович — к. м. н., профессор РАЕ, с. н. с. отделения экспериментальной медицины ФГУ «ННИИТО» МЗСР РФ, 603155, Нижний Новгород, Верхне-Волжская наб., д. 18; тел.: + 7 (909) 144-91-82; e-mail: cryst-mart@yandex.ru

Камакин Николай Федорович — д. м. н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии ГОУ ВПО «КГМА» МЗСР РФ, 610002, г. Киров, ул. К. Маркса, д. 112; тел.: 8 (8332) 37-47-67

В течение нескольких последних десятилетий отмечается нарастание интереса исследователей к вопросу кристаллизации биологических субстратов организма человека [1, 4–8]. Следствием этого явилось появление

большого количества методов исследования данного процесса в различных условиях (естественная дегидратация, высушивание в потоке теплого воздуха, на различных подложках и др.), тогда как принципиально

можно выделить лишь оценку собственных кристаллогенных свойств биоматериала (кристаллоскопические методы) и его модулирующую активность в отношении кристаллизации тестовых (базисных) веществ (тезиграфические методы).

С другой стороны, большинство работ, посвященных описанию кристаллообразования биосред при тех или иных физиологических или патологических состояниях, основано на применении феноменологического подхода, связанного с нахождением в высушенном образце качественных признаков — маркеров [4, 7].

Альтернативой этому являются немногочисленные публикации, авторы которых предлагают собственные системы количественной оценки результата дегидратации биосред [5] либо используют компьютерную морфометрию фаций [6].

Отдельными исследовательскими коллективами предложены и апробированы технологии для регистрации параметров, описывающих дегидратационный процесс в динамике [8].

Ранее нами был опубликован унифицированный алгоритм оценки свободного и инициированного кристаллообразования биожидкостей [3], однако он основан на морфологическом подходе, связанном с обнаружением в микропрепарате конкретных кристаллических образований. В то же время установлено, что многие кристаллические структуры имеют высокую субстратную специфичность и, кроме того, появилась необходимость анализа кристаллогенеза модельных био-подобных сред, а также биоматериала, полученного от животных [2]. Все это детерминирует значимость упрощения схемы описания кристаллоскопических и тезиграфических фаций и придания ей субстратной универсальности.

Немаловажным обстоятельством явилось и то, что накопленный объем знаний позволил создать новое лабораторно-диагностическое направление — биокристалломику, изучающую особенности и механизмы кристаллогенеза в биологических системах [2]. Эти задачи требуют тщательного подбора и классификации методических приемов в рамках биокристалломики.

Поэтому **целью работы** явилось создание нового упрощенного алгоритма описания результата свободного и инициированного кристаллообразования биологических субстратов.

На основании многолетнего анализа кристаллогенных и инициирующих свойств различных биосубстратов организма человека и животных (сыворотка и плазма крови, слюна, моча, слезная и внутриглазная жидкость, ликвор, лимфа, разведенный копрофильтрат и др.) был предложен усовершенствованный алгоритм описания результата тезиокристаллоскопического теста.

Он включает в себя параллельное (на одном препарате) изучение кристаллогенного и инициаторного потенциала биосубстрата. В данном случае пробоподготовка предусматривает нанесение на одно стекло образцов анализируемого биологического материала и пары

(пар — при использовании дифференциальной тезиграфии с несколькими базисными веществами) опытного (биожидкость + базисное вещество) и контрольного (базисное вещество) образцов [2, 3].

Алгоритм состоит из двух относительно независимых компонентов:

1. *Алгоритм количественного описания результатов свободного кристаллообразования биологических субстратов включает оценку следующих критериев:*

а) индекс структурности (ИС) отражает качественный состав элементов образца, наличие и относительное количество структур аморфного и кристаллического строения в микропрепарате высушенной биосреды. Является показателем энтропии биологической системы, т.к. непосредственно указывает на сложность частиц, образующих фацию, и зависит от них.

Оценивается по 4-балльной системе:

0 баллов — присутствие в микропрепарате только аморфного вещества;

1 балл — наличие в образце аморфных тел и единичных кристаллов;

2 балла — дополнение указанных элементов единичными дендритными кристаллами;

3 балла — большая часть или все поле зрения образовано крупными дендритными структурами, аморфные тела и одиночные кристаллы немногочисленны.

б) кристаллизуемость (Кр) — индикатор активности кристаллогенеза. Является основным количественным маркером способности биологического субстрата к формированию кристаллов.

Определяется по 4-балльной шкале:

0 баллов — нет кристаллических элементов;

1 балл — единичные мелкие кристаллы, преимущественно одиночные (не более 10 в поле зрения при суммарном увеличении микроскопа $\times 56$ – $\times 60$);

2 балла — значительное количество центров кристаллизации (более 10 в поле зрения при аналогичном увеличении микроскопа);

3 балла — все поле зрения представлено одиночными или дендритными кристаллами.

в) степень деструкции фации (СДФ) — интегральный показатель, отражающий «правильность» кристаллогенеза (основная качественная характеристика фации) и суммирующий как экзогенные (условия дегидратационного процесса — температура, влажность, давление, скорость потоков воздуха, попадание дополнительных веществ и т.д.), так и эндогенные (термодинамическая составляющая кристаллообразования, наличие адекватного для формирования кристаллогидратов и стабилизации органических макромолекул количества молекул воды и т.д.) факторы. Выделены четыре степени СДФ:

0 степень — все элементы фации правильной конфигурации, не разрушены как в целом, так и по фраг-

ментам; признаки разрушения текстуры фации отсутствуют;

I степень — элементы фации имеют начальные признаки разрушения, деструктивные изменения текстуры не наблюдаются;

II степень — обнаруживаются многочисленные разрушенные или измененные структуры; есть локальные нарушения целостности текстуры;

III степень — все элементы фации разрушены, невозможно различить отдельные зоны фации и структуры, образец представляет собой бесформенную массу аморфного, зачастую окрашенного, материала; отмечаются четкие признаки разрушения текстуры.

г) выраженность краевой белковой зоны (Кз) указывает на относительное содержание в биологической среде компонентов с высокой молекулярной массой, прежде всего белков. Данный показатель оценивается по 4-балльной шкале:

0 баллов — полное отсутствие краевой зоны, невозможно выделение краевой зоны при указанном выше увеличении микроскопа;

1 балл — краевая зона присутствует нечетко и/или не по всему периметру фации;

2 балла — при микроскопии по всему периметру микропрепарата отмечается наличие выраженной краевой зоны;

3 балла — краевая зона визуализируется даже без использования микроскопа.

2. Алгоритм количественного описания результатов инициированного кристаллообразования биологических субстратов. Некоторые параметры описания результата инициированного кристаллогенеза аналогичны применяемым при анализе кристаллограмм (СДФ, Кз). Особого описания требуют лишь показатели, которые являются специфичными для тезиграмм:

а) основной тезиграфический коэффициент (Q) указывает на характер изменения кристаллогенеза базисного вещества при его сокристаллизации с биологической жидкостью.

Расчет показателя производится по следующей формуле:

$$Q = \frac{A}{B},$$

где A — количество центров кристаллизации в опытном образце (биожидкость + базисное вещество), ед.; B — количество центров кристаллизации в контрольном образце базисного вещества, ед.

Практика анализа тезиграфических фаций позволила установить, что основной тезиграфический коэффициент не является оптимальным вариантом оценки количественной стороны инициированного кристаллогенеза биологического субстрата при слишком большой плотности в фации формирующихся элементов (более 50–100 ед./поле зрения). В этих случаях может быть применен тезиграфический индекс, что является более

грубым, но более простым способом описания тенденций инициации базисного вещества биологическим субстратом.

При расчете тезиграфического индекса (ТИ) можно использовать следующую 5-балльную шкалу:

0 баллов — количество кристаллов в опытном образце более чем в 3 раза меньше, чем в контрольном;

1 балл — количество кристаллов в опытном образце в 1,5–3 раза меньше, чем в контрольном;

2 балла — количество кристаллов в опытном образце сопоставимо с контрольным (допустимо отличие в большую или меньшую сторону менее, чем в 1,5 раза);

3 балла — количество кристаллов в опытном образце в 1,5–3 раза больше, чем в контрольном;

4 балла — количество кристаллов в опытном образце более, чем в 3 раза больше, чем в контрольном.

б) коэффициент поясности (P) демонстрирует степень гетерогенности изучаемого биосубстрата по параметру разброса молекулярных масс компонентов. Рассматривается как основной показатель компонентного состава биоматериала (в дополнение к основному тезиграфическому коэффициенту, выступающему в качестве количественного индикатора иницирующих свойств биосреды).

Для получения значения критерия используют диаметры наибольшего и наименьшего из имеющихся в образце поясов кристаллизации, рассчитывая коэффициент поясности по следующей формуле:

$$P = \frac{d_1}{d_2},$$

где d_1 — радиус минимального пояса кристаллизации, мм;

d_2 — радиус максимального пояса кристаллизации, мм.

в) кристалличность (K) по сущности является аналогом индекса структурности, применяемого в отношении кристаллоскопических фаций, и позволяет оценить сложность организации тезиграфической фации. Описание результатов кристаллизации с использованием параметра кристалличности осуществляется по 4-балльной шкале:

0 баллов — фация полностью образована аморфными телами;

1 балл — большинство элементов в образце имеют аморфное строение, но встречаются «островки» кристаллов, составляющие менее 30% от объема микропрепарата и количества присутствующих образований;

2 балла — в микропрепарате обнаруживаются аморфные и кристаллические элементы с количественным преобладанием последних;

3 балла — фацию полностью образуют кристаллические элементы.

Закключение. Современная биокристалломика располагает широким ассортиментом методических приемов, позволяющих изучать как динамику, так и результат дегидратации капли биологической жидкости на подложке. Использование предлагаемого алгоритма количественной оценки результата свободного и инициированного кристаллогенеза биосред создает основу для получения принципиально новых сведений о кри-

сталлообразовании последних в условиях *in vitro* и *in vivo*, для раскрытия молекулярных механизмов биокристаллогенеза и участия в нем физиологических и патологических модуляторов. Кроме того, количественное, субстрат-независимое описание кристаллогенных свойств биожидкостей дает возможность составить представление о кристаллостазе жидких биосистем и организма человека и животных.

Литература

1. Барер Г.М., Денисов А.Б. Кристаллографический метод изучения слюны. — М: ФГОУ «ВУНМЦ Росздрава», 2008. — 240 с.
2. Мартусевич А.К. Количественная оценка результата свободного и инициированного кристаллогенеза биологических субстратов. Учебное пособие. — Нижний Новгород: ФГУ «ННИИТО Росмедтехнологий», 2008. — 28 с.
3. Мартусевич А.К., Камакин Н.Ф. Унифицированный алгоритм исследования свободного и инициированного кристаллогенеза биологических жидкостей // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 6. — С. 21–24.
4. Савина Л.В., Кокуева О.В., Яковенко М.С. с соавт. Метаболические структуры сыворотки крови при эндогенной интоксикации у больных хроническим панкреатитом // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2007. — Приложение № 1. — С. 265.
5. Сидоров П.И., Кирлич М.А., Волчецкий А.Л. Кристаллографическое исследование сыворотки крови больных хроническим алкоголизмом // Наркология. — 2002. — № 1. — С. 9–13.
6. Чухман Т.П., Свердлин С.М., Ильясова Н.Ю. с соавт. Компьютерный анализ и классификация изображений кристаллограмм слезной жидкости // Мат. III Всеросс. научно-практ. конф. «Функциональная морфология биологических жидкостей». — М., 2004. — С. 43–44.
7. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. — М.: Хризопраз, 2001. — 304 с.
8. Яхно Т.А., Санин А.Г., Васса С.В. с соавт. Новая технология исследования многокомпонентных жидкостей с использованием кварцевого резонатора. Теоретическое обоснование и приложения // Журнал технической физики. — 2009. — Т. 79, вып. 10. — С. 22–29.

УДК 616-008.9 : [616.15 + 616.832.9-008.8-07]-612.398.19

**ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ
НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ (ГЛУТАМАТА, АСПАРТАТА, ТАУРИНА, ГАМК) И
АМИНОТИОЛОВ (ГЛУТАТИОНА, ГОМОЦИСТЕИНА, ЦИСТЕИНА) —
СПОСОБ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ**

В.К. ПОЗДЕЕВ, Н.В. ПОЗДЕЕВ

ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург
Департамент медицины, Харбор Хоспитал, 3001 улица Ганновер, Балтимор, Мэрилэнд, 21225 США,
тел.: +1(404) 421-88-60, e-mail: nikitapozdeyev@hotmail.com

Резюме. Одновременное определение в биологическом материале ключевых метаболитов позволяет получать интегральную информацию о состоянии метаболического здоровья пациента при любом заболевании, осуществлять патогенетически обоснованную терапию, контролировать ее эффективность [34, 45, 48]. Нами предложен в значительной степени отвечающий этим требованиям метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием одновременного определения глутамата, аспартата, таурина, гамма-аминомасляной кислоты, гомоцистеина, цистеина, глутатиона (подробное описание метода представлено ранее [19, 20] и в *Electronic publication*). Метаболизм этих биологически активных веществ между собой прямо или опосредованно связан и определяет состояние энергетического, медиаторного, иммунологического статуса организма. Одновременное их определение в исследуемом образце вскрывает взаимное влияние метаболических событий, развитие патогенеза заболеваний, прогноз, позволяет осуществлять контроль за эффективностью патогенетически обоснованной терапии [17, 21].

Ключевые слова: аминотиолы, аминокислоты, плазма крови, эксайтотоксичность, гипергомоцистеинемия, ВЭЖХ.

**HPLC-DETERMINATION IN PLASMA AND CEREBROSPINAL FLUID OF NEUROACTIVE
AMINO ACIDS (GLUTAMATE, ASPARTATE, TAURINE, GABA) AND AMINOTHIOLS
(GLUTATHIONE, HOMOCYSTEINE, CYSTEINE) IS THE WAY OF INTEGRAL DIAGNOSTICS
OF THE METHABOLIC DISTURBANCES**

V.K. POZDEYEV, N.V. POZDEYEV

Research Institute of Influenza, Ministry of Public Health and Social Development of Russia,
Saint-Petersburg
Department of Medicine, Harbor Hospital, 3001 S. Hanover Street, Baltimore, Maryland, 21225 USA
Tel.: +1(404) 421-88-60, e-mail: nikitapozdeyev@hotmail.com

Summary. Simultaneous determination of key metabolites in the biologic material allows obtaining an integral information about metabolic health condition of the patients with various diseases, performing pathogenetically justified treatment, and monitoring its effectiveness [34, 45, 48]. We suggest a high performance liquid chromatography fluorescence detection method of simultaneous determination of glutamate, aspartate, taurine, gamma-aminobutyric acid, homocysteine, cysteine, glutathione that fits above criteria. Detailed description of the method was published earlier in the electronic form [19, 20]. Metabolism of these biologically active substances is directly or indirectly interrelated and defines energy, neurotransmitter, and immunologic status of the organism. Their simultaneous determination in the sample reveals mutual interrelationship of metabolic events, development of disease pathogenesis, prognosis, allows monitoring of the effectiveness of pathogenetically based therapy [17, 21].

Key words: aminothiols, amino acids, plasma, exitotoxicity, hyperhomocysteinemia, HPLC.

Данные для корреспонденции:

Поздеев В.К.

ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург,
тел. +7 (911) 984-17-52, e-mail: vkpozdeev@mail.ru

В настоящее время предложено множество методов под конкретные исследовательские задачи. Ряд обзоров детально рассматривают особенности способов определения аминокислот и нейроактивных аминокислот, ставят задачи их совершенствования по возможностям — доступность, надежность, экологичность, информативность, экономичность [19, 20, 29, 45, 49, 52, 53]. В частности, отечественными авторами [Zhloba A., Blashko E., 61] разработан быстрый и чувствительный метод определения общих аминокислот (гомоцистеина и глутатиона) в плазме крови при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с предколоночной дериватизацией 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) и фотометрическим детектированием (330 нм).

Благодаря одномоментному исследованию ключевых метаболитов проведенные нами исследования цереброспинальной жидкости при эпилепсии позволили сформулировать концепцию гетерогенности патохимии эпилептиформных состояний (при относительно единообразных клинических симптомах разных механизмов их

возникновения на нейрохимическом уровне), выявить патогенный (преобладание возбуждающей медиации — глутамат- и аспартатергической) и компенсаторный (ответную активацию тормозных систем — ГАМК-ергической и таурина) механизмы и в соответствии с характером метаболических нарушений рекомендовать патогенетически (персонально) обоснованную щадящую терапию [15–18, 21]. Наши исследования плазмы крови при гепатите С выявили, на фоне существенного снижения содержания таурина, повышения концентрации глутамата и аспартата, значительную гипергомоцистеинемию и гиперцистеинемию. Коэффициент tCys/tHcy в 1,9 раза меньше, чем у здоровых волонтеров, что свидетельствует о недостаточной инактивации гомоцистеина посредством транссульфирования. Эти отклонения в метаболизме нарастают параллельно тяжести и длительности заболевания [13, 19, 20].

Обсуждение метода. Мы детально описали простой и чувствительный метод определения общего гомоцистеина (tHcy), общего цистеина (tCys), общего глутатиона (tGSH = GSH + GSSG) и нейроактивных аминокислот (Asp, Glu, Tau, GABA) при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с предколоночной дериватизацией орто-фталевым альдегидом и флуориметрическим детектированием на длинах волн 360 и 470 нм для возбуждения и эмиссии, соответственно. Дериватизация осуществлялась орто-фталевым альдегидом в присутствии 2-меркаптоэтанола после S-карбоксиметилирования свободных сульфгидрильных групп йодуксусной кислотой. Для определения аминокислот дисульфидные связи восстанавливались и связанные с белками тиолы высвобождались посредством добавления дитиотрейтола к плазме. Преимущество этого метода [19, 20] заключается в возможности одновременного определения в одной пробе ключевых метаболитов, связанных метаболически и функционально (рис. 1).

Орто-фталевый альдегид дериватизирует метаболиты (с высоким уровнем флуоресценции аддуктов) как по сульфгидрильным, так и по первичным аминогруппам, поэтому представляется возможность определять и аминокислоты, и аминокислоты одновременно [52]. Дериватизация происходит быстро,

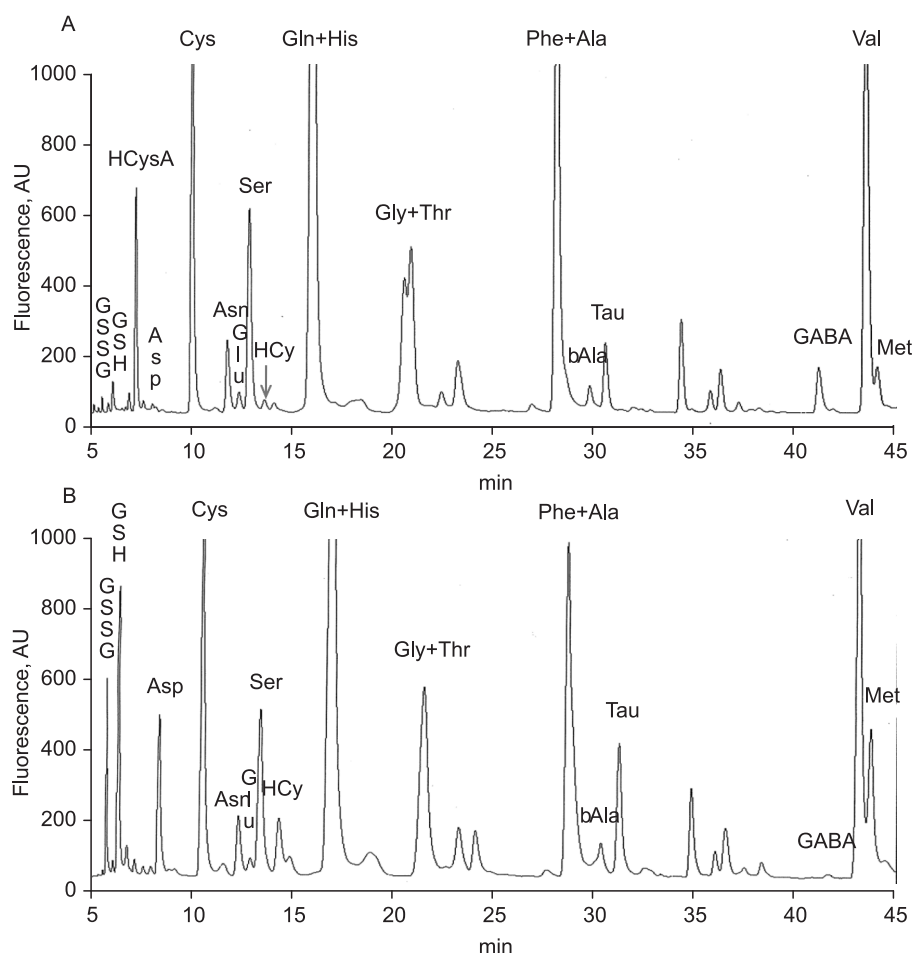


Рис. 1. Типичные хроматограммы плазмы здорового волонтера: ВЭЖХ система — Agilent Technologies 1100 HPLC; колонка Biophase ODS 250×3,5 мм, 5 мкм; 0–8 мин — изократическая элюция при pH 5,45, фаза А; затем линейный градиент с 8 по 14 мин до 16% фазы В (pH 5,6) и с 14 по 45 мин содержание фазы В линейно повышалось до 58% (pH 5,9); флуоресцентная детекция, возбуждение—эмиссия 360–470 нм. Для идентификации пиков в плазму добавлено: А — по 50 мкМ гомоцистеиновой кислоты (HcysA), GABA; В — по 50 мкМ GSH, Asp, Cys, Hcy, Tau, Met

на свету, при комнатной температуре, стабильность аддуктов и реактивов достаточная для проведения ВЭЖХ-хроматографии с предколоночной дериватизацией. Флуориметрическое детектирование, с одной стороны, обеспечивает высокую чувствительность метода; с другой стороны, удобно для выбора длин волн — возбуждение в пределах 330–360 нм, эмиссия 400–470 нм с полушириной полосы пропускания 10–15 нм. Экологичность метода (при использовании вытяжного шкафа в момент работы с 2-меркаптоэтанолом и ледяной уксусной кислотой) вполне удовлетворительная. Реактивы недорогие и доступные.

Метод позволяет определять общее содержание (свободные + связанные с белками формы) аминокислот (глутатиона, цистеина, гомоцистеина). При исключении из технологии обсуждаемого метода дитиотрейтола возможно определять свободные аминокислоты — цистеин и гомоцистеин, общий глутатион. Определение восстановленной и окисленной его формы не представляется возможным, так как в процессе дериватизации при pH 12 около 30% GSH окисляется до GSSG и 68% GSSG восстанавливается до GSH [19, 20]. Определение окисленного глутатиона (GSSG) интенсивно обсуждается в литературе [19, 20, 49, 52–54], предлагается большое количество методов определения, приводятся цифры от минимальных его концентраций в крови и тканях (с предположением представительства только GSH) до высоких концентраций при оксидантном стрессе, действии ксенобиотиков, разной патологии метаболизма при множестве заболеваний, несовершенстве методик определения [53]. Неопределенность связана как с энзиматической активностью (с момента забора материала исследования) и гемолизом, так и с методическими операциями, приводящими к окислению аминокислот — высокой щелочностью, кислородом воздуха, тяжелыми металлами, повышением температуры сред.

Энзиматическое расщепление GSH при pH выше 7 происходит при участии гамма-глутамилтранспептидазы, в результате чего остаток Glu (входящий в структуру GSH) конвертируется в цистин [49]. В это же время под влиянием оксигемоглобина и активных форм кислорода при участии глутатинпероксидазы (до момента кислотной денатурации белков плазмы) восстановленный глутатион окисляется до GSSG: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$. Одновременное восстановление GSSG происходит при участии глутатионредуктазы: $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADPH}^+ + 2\text{GSH}$ [25, 29, 55]. В процессе определения аминокислот необходимо остановить эти реакции, что достигается двумя способами — охлаждением образца (в частности венозной крови) до 0°С и кислотной денатурацией белков.

Стабилизация концентрации аминокислот и аминокислот достигается хранением плазмы при –70°С в микропробирках с минимальным количеством воздуха. Кроме того, плазма немедленно отделяется от эритроцитов центрифугированием при +4°С (гемолизирован-

ные образцы не исследуются). Забор крови осуществляется в вакутейнеры с EDTA. Этот хелатирующий металл антикоагулянт в значительной степени предотвращает реакции окисления аминокислот и аминокислот [19, 20, 52–54]. Цистеин более устойчив к неэнзиматическому окислению. Наибольший вклад в ошибки определения GSH, GSSG, HSCu привносит способ забора крови, сопровождающийся оксидацией, протеолизом, гемолизом эритроцитов (содержание GSH в них в 500 раз выше, чем в плазме) [25, 49, 53].

В связи с тем, что в процессе подготовки/дериватизации образца большая часть GSSG восстанавливается до GSH и частично GSH окисляется до GSSG, возможен расчет только tGSH. Флуоресценция одной молекулы GSSG равна флуоресценции двух молекул GSH (это связано с тем, что число аминокислотных групп одной молекулы GSSG, участвующих в дериватизации, равно числу аминокислотных групп в двух молекулах GSH). Поэтому общий глутатион рассчитывают как $\text{tGSH} = \text{GSH} + \text{GSSG}$, используя общую флуоресценцию добавленного в плазму стандарта GSH, суммируя увеличение площадей пиков GSH и GSSG.

Итак, для повышения надежности метода и уменьшения влияния артефактов нами используются: 1) стабилизирующие реагенты и антиоксиданты (EDTA, дитиотрейтол, йодоуксусная кислота, 2-меркаптоэтанол) на различных этапах метода; 2) кровь собирается в вакутейнеры, содержащие EDTA, быстро охлаждается до 0°С и немедленно центрифугируется при +4°С для удаления форменных элементов крови (затем плазма анализируется немедленно или хранится при –70°С); 3) в процессе дериватизации GSH, HSCu и Cys стабилизировались повышенной концентрацией 2-меркаптоэтанол; 4) перед введением пробы в ВЭЖХ систему щелочность пробы нейтрализовалась до pH 6–7 [19, 20].

Диагностика метаболических нарушений

Глутатион (гамма-L-глутамил-L-цистеинилглицин) — важнейший представитель эндогенных пептидов, функции которого в организме чрезвычайно широки. В большинстве клеток на его долю приходится 90% всех тиоловых соединений. Глутатион существует в двух основных формах: восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG). В здоровых клетках соотношение GSH/GSSG около 400 [25, 41, 51]. Благодаря наличию высокоактивной сульфгидрильной группы глутатион поддерживает функциональную активность биологических мембран, участвует в передаче нервных импульсов, синтезе белков и ДНК, транспорте аминокислот, регуляции активности ферментов [41, 51], детоксикации ксенобиотиков [25]. GSH обеспечивает защиту клеток от повреждающего действия органических перекисей, активных форм кислорода, сохраняя тиол-дисульфидное равновесие, являясь акцептором гидроксильного и супероксидного радикалов [42]. Благодаря обратимости реакции окисления сульфгидрильных групп глутатиона поддер-

живается гомеостаз тиоловых антиоксидантов в клетке [51]. GSH поддерживает в восстановленном состоянии цистеиновые остатки гемоглобина и других белков эритроцитов, сохраняет гемоглобин в ферроформе, защищает тиоловые ферменты (оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, лигазы) от окисления [55]. Для нормальной работы глутатионзависимых ферментов необходим восстановленный глутатион. Скорость восстановления GSSG под действием флавоэнзима глутатионредуктазы зависит от НАДФН, который образуется в результате пентозофосфатного пути метаболизма углеводов при участии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что и лимитирует редокс-циклирование GSH [41, 55].

Гомоцистеин (НСу) — серосодержащая аминокислота, образующаяся путем деметилирования незаменимой аминокислоты — метионина. Дефициты витаминов B6, B2, B12, фолиевой кислоты, бетаина, генетические нарушения метаболизма приводят к гипергомоцистеинемии, лежащей в основе нейродегенеративных (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменция), сердечно-сосудистых (атеросклероз, инсульты, инфаркты миокарда) заболеваний, инсулин-независимого сахарного диабета. На фоне гипергомоцистеинемии формируются дефицит α -1-антитрипсина, жировая дистрофия печени, нарастает тяжесть вирусных гепатитов, хронической почечной и печеночной недостаточности, злокачественной анемии (при отсутствии фактора Кастла), последствий резекции желудка и трансплантации внутренних органов, острых лимфобластных лейкозов [32, 38, 39, 43, 47].

Уровень НСу в плазме крови является интегральным диагностическим и прогностическим показателем течения этих заболеваний. Существует три основных гипотезы патогенеза заболеваний, вызванных гипергомоцистеинемией: оксидантный стресс, стресс эндоплазматического ретикула, активация провоспалительных цитокинов — NF- κ B, IL-1b, IL-6, IL-8 [32, 39]. Активация NF- κ B стимулирует продукцию цитокинов, хемокинов, интерферонов, лейкоцитарные молекулы адгезии, гемопоэтический фактор роста, главный комплекс гистосовместимости 1. Активация NF- κ B и JNK-протеинкиназы запускает программы апоптоза [23, 36, 40, 43]. Нейротоксичность НСу также связывают со сверхстимуляцией NMDA-рецепторов глутамата и повреждением ДНК [2, 24, 38, 44].

НСу в биологических системах проявляет очень высокую активность, поэтому метаболизируется в такие соединения как НСу-тиолактон, НСу-содержащие дисульфиды, гомоцистеиновую кислоту, S-нитрозо-НСу, играющие определенную роль при многих заболеваниях [9, 38–40, 43]. НСу-АМР присоединяется к t-РНК, формируется НСу-t-РНК. Затем посредством метионил-t-РНК-синтазы образуются НСу-белок-SH дисульфиды (включая НСу-тиолактон). Таким образом НСу вмешивается в структуру белков посредством образования N-связи с ϵ -аминогруппой лизина. В результате этого

физиологическая активность многих белков снижается, формируется аутоиммунный ответ на НСу-тиолактон-модифицированные белки. В крови НСу-тиолактон составляет 0,2–0,8% от общего НСу [31]. В эндотелиальных клетках человека содержание НСу-тиолактона прямо пропорционально концентрации НСу [38].

Генетические мутации ферментов и грубые нарушения в диете (алкоголизм, переедание белков, дефицит витаминов B6, B12, фолиевой кислоты, бетаина) являются основными факторами гипергомоцистеинемии. Мутация гена метилентетрагидрофолатредуктазы (677 нуклеотид не цитозинный, а тимидиновый) приводит к снижению активности этого фермента (угнетается реметилирование НСу в метионин), связанной с этим гипергомоцистеинемии средней тяжести, раннему атеросклерозу, тромбоваскулярной патологии [40].

Наиболее тяжелая гипергомоцистеинемия — до 400 мкМ — формируется при гомозиготной мутации цистатионин- β -синтазы (833 нуклеотид не тимидиновый, а цитозинный; 919 нуклеотид не гуанозиновый, а аденозиновый), вследствие чего грубо угнетается транссulfирование НСу в цистатионин. Эта патология (наследуемая по аутосомно-рецессивному механизму) помимо сердечно-сосудистых заболеваний сопровождается задержкой умственного развития, эктопией хрусталика, ранним остеохондрозом, гепатозом, дисгениями скелета. Такая гомозиготная мутация цистатионин- β -синтазы встречается редко. Мутации цистатионин- β -синтазы по гетерозиготному типу наблюдаются у 1% популяции людей и сопровождаются тяжелым атеросклерозом, тромбоваскулярной патологией [40, 47].

Гомоцистеин в крови человека связан, главным образом, с гемоглобином (0,6%), сывороточным альбумином (0,36%), гамма-глобулином (0,36%). Другие сывороточные белки — липопroteины высокой и низкой плотности, фибриноген, трансферрин, антитрипсин связывают от 0,04% до 0,1% общего гомоцистеина. НСу-N-гемоглобин в крови здорового человека присутствует в количестве 12,7 мкМ (НСу-N-альбумин в количестве 2,8 мкМ) и представляет главный резервуар НСу. Липопroteины высокой плотности в клетках эндотелия снижают содержание НСу-тиолактона посредством гидролизующего действия [38].

НСу образуется во всех органах и тканях, но детоксикация его (реметилирование и транссulfирование) происходит, главным образом, в печени и почках. В сосудистой системе и коже осуществляется только реметилирование НСу, ферменты для его транссulfирования в этих тканях отсутствуют. При очень высоких уровнях в крови НСу выводится из организма с мочой. Второй линией инактивации токсичности НСу является связывание его белками крови — альбумином, гемоглобином, липопroteинами высокой плотности [38]. Основной путь инактивации НСу в печени и почках с образованием Cys происходит в результате транссulfирования в ходе реакции НСу с серином [55]. Следо-

вательно, повышение уровня Cys может указывать на компенсаторный механизм детоксикации HСu при гипергомоцистеинемии. Однако при гепатите С этот механизм недостаточен, так как соотношение концентраций этих веществ — коэффициент tCys/tHСu в 1,9 раза меньше, чем у здоровых волонтеров [13, 19, 20].

Таким образом, инактивация токсического действия HСu (снижение его уровня в крови) в основном осуществляется, во-первых, путем реметилирования в метионин с помощью витамин-независимой бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазы, а также метионинсинтазы и метилентетрагидрофолатредуктазы (в присутствии витамина В12 и метилентетрагидрофолата); во-вторых, путем транссульфирования (кофактор витамин В6) в цистатионин, который превращается в цистеин.

Цистеин. Гомоцистеин, цистеин, глутатион метаболически тесно связаны друг с другом, тонко реагируют на изменение метаболического статуса организма, определяют окислительно-восстановительную систему крови и уровень свободных радикалов [2, 55, 56, 59]. Цистеина в плазме крови содержится 200–300 мкМ (то есть в 20–30 раз больше, чем HСu). Однако HСu химически более активен, чем цистеин, поэтому легко его замещает в белках. Цистеин в физиологических концентрациях не вытесняет HСu из белков [56].

Цистеин образуется в результате конденсации HСu с серином: вначале образуется цистатионин (реакцию катализирует пиридоксальный фермент цистатионин-бета-синтаза), затем цистатионин дезаминируется и расщепляется на Cys и оксобутират под действием еще одного пиридоксального фермента цистатиониназы [47, 55]. Благодаря образованию дисульфидных мостиков Cys стабилизирует пространственную структуру белков, участвует в синтезе глутатиона [55]. Гипергомоцистеинемия в сочетании с гиперцистеинемией производит нейротоксичное действие [13, 19, 20, 56]. Низкое содержание цистеина в крови приводит к нарушению функции почек, печени, мышечной системы и кожи, вызывает задержку развития, депигментацию волос и повышенную сонливость [59].

Таурин (Tau) — заменимая кислота, в ее синтезе принимают участие серосодержащие аминокислоты (метионин, цистеин, цистин). Наиболее мощный путь биосинтеза Тау: окисление цистеина в цистеиновую кислоту, которая декарбоксилируется в гипотаурин, окисляющийся до Тау. Декарбоксилаза цистеиновой и цистеинсульфиновой кислот использует пиридоксаль-5-фосфат в качестве кофермента [26, 60]. В ткани мозга человека декарбоксилирование этих кислот происходит более интенсивно, чем в ткани печени, что говорит о большой важности метаболизма Тау для функционирования нервной системы. При недостаточности витамина В6 формируется метаболическая цепь: цистамин-цистальдимин-тиостеамин-гипотаурин-Тау. Такое разнообразие путей синтеза подчеркивает особую необходимость Тау для органов и тканей. Гипотаурин и Тау катаболизируются

в изотионовую кислоту, тиотаурин, таурохолат [26, 37, 60].

Тау обладает радиопротекторным, антиоксидантным (активирует глутатионпероксидазу, предупреждает липопероксидацию), мембраностабилизирующим действием, является тормозным нейромодулятором, проявляет гепато- и кардиопротекторные, антиаритмические и нормотензивные свойства. 58% Тау поступает с пищей, 29% синтезируется *de novo*, а 13% представлено остаточным пулом тканей. Адаптивные механизмы поддержания уровня Тау в тканях реализуются за счет активации его синтеза и реабсорбции в почках [26, 27, 37]. Тау, наряду с глицином, участвует в образовании в печени парных желчных кислот (включая гепатопротектор — таурохолевую). Их присутствие способствует абсорбции липидов, липолизу, всасыванию жирных кислот в кишечнике, элиминации холестерина из организма [60]. Таурино-терапия гепатита привела к нормализации в плазме крови уровней пирувата, лактата, мочевины, орнитина (свидетельство активации цикла мочевинообразования); повышению концентраций валина, лейцина — активации глюконеогенеза [12, 26, 60]. Тау предупреждает осмотический стресс путем активации Ca^{++} -зависимой АТФ-азы, накопления K^+ , Mg^{++} в цитоплазме; предупреждает агрегацию тромбоцитов, снижает уровень сахара в крови. Хелатируя двухвалентные катионы (Zn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++}), Тау тем самым активирует глутаминсинтетазу [26, 27]. При введении *in vivo* в дозе 50 мг/кг массы тела Тау оказывает более сильный противосудорожный эффект, чем ГАМК [33], оказывает противоэпилептический эффект при различных моделях судорожных состояний, высоко эффективен при лечении больных эпилепсией, особенно в сочетании с пиридоксинами [12, 17, 58]. В печени таурин участвует в конъюгации желчных кислот и ксенобиотиков, осморегуляции, обмену кальция [12, 60].

Тау нормализует соотношение тормозных и возбуждающих аминокислот-трансмисмиттеров в ЦНС при печеночной энцефалопатии [28]. Наибольший лечебный эффект тауриновой терапии наблюдался у больных эпилепсией с пониженным уровнем Тау в цереброспинальной жидкости [17, 21]. Его дефицит обычно связан с дефицитом питания, гиповитаминозом В6, нарушением функции печени и почек [12, 26, 60].

Глутамат. Эксайтотоксичность. Реакции оксидантного стресса тесно связаны с глутаматной эксайтотоксичностью и процессами энергетического метаболизма, образуя порочные круги патологических превращений. Активные формы кислорода и продукты перекисного окисления липидов тормозят активность Na^+/K^+ -АТФаз (нарушая энергозависимый ионный транспорт); ингибируют глутаминсинтетазу в астроглии; нарушают обратный захват глутамата, тем самым способствуют его накоплению в синаптической щели; нарушают структуру и функцию рецепторных белков, особенно белка G. В результате — открытие потенциал-зависимых ионных каналов (связанных с NMDA-рецепторами) приводит

к быстрому входу ионов Ca^{++} и Na^+ в нейрон (усугубляя реакции глутамат-кальциевого каскада, активируя кальций-зависимую NO-синтазу), обуславливает избыточную продукцию радикала $\text{NO}^\bullet$ и пероксинитрита (ONOO^-). Эти процессы приводят к усилению образования активных форм кислорода (супероксид-аниона, гидроксил-радикала), наработке гипохлорид-аниона, модификации липидов клеточных мембран, индуцируют апоптоз [3, 5, 7, 30]. Ряд антиоксидантов (среди них альфа-токоферол) являются «ловушками» для активных форм кислорода [50].

При гиперактивации возбуждающих медиаторных систем в межклеточных пространствах головного мозга избыточно накапливаются глутамат и аспартат, формируется эксайтотоксичность — повреждение нейронов вследствие нарушения ионного гомеостаза, дисфункции митохондрий и активности клеточных систем. Основным механизмом глутаматной нейротоксичности, запускающей апоптоз, является вход Ca^{++} через NMDA-каналы, накопление его митохондриями, инактивация $\text{Ca}^{++}/\text{H}^+$ -АТФазы [3, 46]. Длительное воздействие глутамата приводит к деполяризации митохондрий, инактивации систем плазматической мембраны, удаляющих Ca^{++} из цитозоля. В цитозоле и митохондриальном матриксе повышается концентрация Na^+ , Ca^{++} , снижается содержание K^+ , снижается цитозольный pH, происходит набухание митохондрий. Снижение pH во время действия глутамата и в постглутаматный период является одной из основных причин торможения процесса выведения Ca^{++} из клетки [14]. Во внеклеточном пространстве накапливаются ионы K^+ — важнейший механизм вовлечения нейронов в эпилептический процесс. «Кальциевая перегрузка» нейронов, активация Ca^{++} -зависимых процессов (повышение активности протеаз, киназ, эндонуклеаз, липооксигеназ, фосфорилазы A2) ведет к изменениям в генетическом аппарате клетки, неконтролируемому действию свободных радикалов и клеточной гибели [3, 30, 46]. Эпилептическое гипервозбуждение, инициированное эксайтотоксичностью глутамата, ведет к избыточной наработке оксида азота. Оксид азота и его производные окисляют тиольные группы белков митохондриальной мембраны, что сопровождается высвобождением в цитозоль апоптогенных факторов — каспаз. Массивное поступление оксида азота в клетку парализует энергетический обмен (в частности, блокаду Ca^{++} -зависимой АТФазы), инициирует одновременно необратимую блокаду анаэробного и митохондриального синтеза АТФ и гибель нейронов (преимущественно ГАБА-ергических и пирамидных нейронов неокортекса). Наибольшая плотность поврежденных нейроцитов выявляется в слоях II, III, IV височной коры [10]. Во время судорог наблюдается максимальное повышение уровня $\text{NO}^\bullet$ в коре, гиппокампе и амигдале, значительное падение (на 45–60%) внутриклеточного уровня АТФ + АДФ + АМФ, фосфокреатинина, креатинина [5]. Также существует предположение, что низкие уровни

$\text{NO}^\bullet$ несут компенсаторную функцию: ингибируют обратный захват ГАБА, повышая ее концентрацию в окружающих синапсах [6]; ингибируют каспазы, предупреждая апоптоз.

После деполяризации постсинаптической мембраны инактивация глутамата происходит посредством: 1) обратного захвата в пресинаптические пузырьки и постсинаптическую терминаль; 2) катаболизма в синаптической щели; 3) и главным образом путем перемещения в астроциты, где глутамат амидируется, превращаясь в глутамин, не обладающий нейромедиаторной активностью. Это превращение катализируется глутаминсинтетазой в микросомах астроцитов, а также частично в олигодендроцитах. Уникальность амидирования глутамата для ЦНС (где нет орнитинового цикла) состоит еще и в том, что происходит обезвреживание потенциального нейротоксина — аммиака. Глутаминсинтаза играет ключевую роль в реакциях тканевого обезвреживания аммиака не только в ЦНС, но и в периферических тканях [7].

Эксайтотоксичность запускает «аберрантный» — эктопический нейрогенез в зубчатой фасции и поле СА4 гиппокампа у пациентов с височной эпилепсией. Параллельно с гибелью нейронов образуются гранулярные клетки и неосинапсы. В гиппокампе, амигдале, пириформной коре наблюдается усиленная пролиферация и гипертрофия астроцитов, избыточная аккумуляция в них Glu и повышенное его высвобождение. Выраженность этих проявлений зависит от частоты судорог и сохраняется в течение недель. «Судороги порождают судороги» и дальнейшую потерю нейронов [4]. ГАБА и оксид азота останавливают клеточную пролиферацию, ускоряют созревание нейронов, их интеграцию в гранулярный слой зубчатой фасции [1].

Печеночная энцефалопатия и гипергомоцистеинемия формируются вследствие хронической или острой печеночной недостаточности, как правило, сопровождаются медикаментозную противосудорожную терапию и в тяжелых случаях провоцируют эпилептогенез. Среди множества нейротоксических факторов следует выделить накопление гомоцистеина и аммиака в крови, которые свободно проходят гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). При печеночной недостаточности гипераммониемия возникает вследствие: 1) дефекта образования мочевины в орнитинном цикле в перипортальных гепатоцитах; 2) недостаточности энергезависимой глутаминсинтетазы; 3) вследствие чрезмерного образования аммиака и меркаптанов в кишечнике на фоне дисбактериоза. Под влиянием повышенной концентрации неионизированного аммиака в крови нарушается проницаемость ГЭБ, формируется аминокислотный дисбаланс в ЦНС [11]. Гомоцистеин — структурный аналог глутамата — запускает эксайтотоксические реакции (реализуя свое действие через ионотропные и метаболитные глутаматные рецепторы), повышает уровень цитоплазматического Ca^{++} , ингибирует Na^+/K^+ -АТФазы посред-

ством активных форм кислорода, приводит к массивной программируемой клеточной смерти [2, 9, 24]. Нами была обнаружена значительная гипергомоцистеинемия в плазме крови больных гепатитом С — концентрация гомоцистеина (15,9 мкМ) была в 2,5 раза выше по сравнению с таковой у здоровых волонтеров (6,2 мкМ); уровни Glu и Asp повышены в 2,7 и 1,7 раза, соответственно; концентрация Tau снижена в 1,4 раза [13, 19, 20]. Токсический гепатит сопровождается снижением содержания в стриатуме крыс глицина и ГАМК [12].

Эффекты ГАМК опосредуются через три типа рецепторов: ГАМКА и ГАМКС — ионотропные рецепторы контролируют вход в клетку ионов хлора; ГАМКВ — метаботропные, повышают электропроводность K^+ , уменьшают вход Ca^{++} в клетку, ингибируют высвобождение возбуждающих медиаторов. Через ГАМКА рецепторы реализуется быстрое ингибирование постсинаптических возбуждающих потенциалов, а через ГАМКВ — позднее ингибирование. Из синаптической щели ГАМК быстро удаляется посредством обратного захвата в глию и пресинаптические терминалы, где катаболизируется пиридоксальзависимой ГАМК-трансаминазой (ГАМК-Т). В головном мозге синтез ГАМК осуществляется путем descarboxилирования Glu также пиридоксальзависимым ферментом глутаматдекарбоксилазой [8, 33, 57, 58]. Не менее половины всех рецепторов в ЦНС являются ГАМК-ергическими. ГАМК — основной тормозный нейромедиатор в ЦНС, но и привносит существенный вклад в энергетику мозга посредством ГАМК-шунта (от 10 до 40%) в зависимости от концентрации в них ГАМК- и глутаматергических нейронов. Так, в коре больших полушарий, где высокое представительство глутаматергической системы [35], соотношение реакций ГАМК-шунта и цикла трикарбоновых кислот составляет около 1:1, что определяется представительством ГАМК- и глутаматергических нейронов [22]. Это способ получения энергии в условиях ее дефицита в ЦНС, защита от гипоксических повреждений при экстремальных состояниях [22]. Существует предположение о двух путях ГАМК: в «нейрональном» осуществляется синтез ГАМК-медиатора; во втором, «метаболическом» происходит катаболизм ГАМК. Нарушение функции какого-либо из путей провоцирует эпилептогенез [1, 4, 8, 57].

Литература

1. Аниол В.А., Степанович М.Ю. Оксид азота(II) и гамма-аминомасляная кислота как регуляторы нейрогенеза в мозге взрослых млекопитающих при моделировании судорожной активности // *Нейрохимия*. — 2007. — Т. 24, № 4. — С. 279–289.
2. Болдырев А.А. Почему гомоцистеин является фактором риска нейродегенеративных заболеваний (мини-обзор) // *Нейрохимия*. — 2006. — Т. 23, № 3. — С. 165–172.
3. Большаков А.П. Глутаматная нейротоксичность: нарушение ионного гомеостаза, дисфункция митохондрий, изменение активности клеточных систем // *Нейрохимия*. — 2008. — Т. 25, № 3. — С. 157–169.
4. Гуляева Н.В. «Аберрантный» нейрогенез во взрослом мозге при эпилепсии: компенсаторный или патологический? // *Нейрохимия*. — 2010. — Т. 27, № 2. — С. 102–108.
5. Зозуля Ю.А., Лапоногов О.А., Сенько Л.Н. Роль оксида азота в эпилептогенезе (обзор литературы) // *Журн. АМН Украины*. — 2007. — Т. 13, № 2. — С. 201–215.
6. Калиниченко С.Г., Дудина Ю.В., Дюйзен И.В., Мотавкин П.А. Индукция NO-синтазы и глияльного кислого фибриллярного белка в астроцитах височной коры крыс с аудиогенной эпилептической реакцией // *Морфология*. — 2004. — Т. 125, № 3. — С. 68–73.
7. Курбат М.Н. L-Глутамат: современный взгляд на известную аминокислоту // *Нейрохимия*. — 2009. — Т. 26, № 3. — С. 202–207.
8. Лелевич В.В., Виницкая А.Г., Лелевич С.В. Современные представления об обмене гамма-аминомасляной кислоты в головном мозге // *Нейрохимия*. — 2009. — Т. 26, № 4. — С. 275–281.
9. Махро А.В., Булыгина Е.Р., Болдырев А.А. Влияние гомоцистеина и гомоцистеиновой кислоты на гранулярные клетки мозжечка // *Нейрохимия*. — 2006. — Т. 23, № 3. — С. 179–184.
10. Мотавкин П.А., Дудина Ю.В. Морфологические и биохимические аспекты апоптоза при височной эпилепсии у человека и животных // *Тихоокеанск. медицинский ж.* — 2010. — № 1. — С. 8–12.
11. Надинская М.Ю. Печеночная энцефалопатия // *Росс. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопрокт.* — 1998. — № 2. — С. 25–32.
12. Нефедов Л.И. Метаболизм таурина у млекопитающих // *Весці АН Беларусі, сер. биол. наук*. — 1990. — № 5. — С. 99–106.
13. Никитина О.Е., Поздеев В.К. Гомоцистеин и цистеин в плазме крови больных хроническим гепатитом С // *Гастроэнтерол. С.-Петербурга*. — 2009. — № 2–3, М 60.
14. Пинелис В.Г., Ходоров Б.И., Фаюк Д.А. и др. Стойкое кальцийзависимое снижение цитоплазматического pH в культивируемых нервных клетках после токсического воздействия глутамата // *Биол. мембраны*. — 1992. — Т. 9. — С. 1049–1051.
15. Поздеев В.К., Ильин А.П. Свободные аминокислоты ликвора и эпилептогенез // *Физиология человека*. — 1978. — Т. 4, № 1. — С. 147–157.
16. Pozdeev V.K. Levels of functioning of transmitter systems and epileptogenesis // *Psychophysiology, Today and Tomorrow* / Ed. N.P. Bechtereva. — Oxford, New-York: Pergamon Press, 1981. — P. 227–235.
17. Поздеев В.К. Медиаторные процессы и эпилепсия — Л.: Наука, 1983. — 112 с.
18. Pozdeev V.K. Neurochemical heterogeneity of the pathogenesis of epilepsy // *Acta neurologica Napoli (Italy)*, 1985. — Vol. 7, N 3/4. — P. 186–190.
19. Pozdeev V.K., Pozdeyev N.V. Determination of total aminothiols and neuroactive amino acids in plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. — 2010. — Vol. 4, N 3. — P. 288–295.
20. Поздеев В.К., Поздеев Н.В. Определение общих аминотиолов и нейроактивных аминокислот в плазме крови при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием // *Биомедицинская химия*. — 2010. — Т. 56, вып. 6. — С. 726–738.
21. Поздеев В.К. Нейрохимические основы метаболической терапии эпилепсии // *Российский нейрохирург. ж. им. проф. А.Л. Поленова, спец. выпуск 19–22 апреля 2011*. — 2011. — Т. 3. — С. 97–101.
22. Розанов В.А. Механизмы регуляции ГАМК-шунта в головном мозгу // *Нейрохимия*. — 1988. — Т. 7, № 4. — С. 611–628.
23. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др. Роль NF- κ B, P53 и P21 в регуляции ФНО- α -опосредованного апоптоза лимфоцитов // *Бюл. эксперим. биол. медиц.* — 2010. — Т. 149, № 1. — С. 56–59.
24. Сергеева И.А., Махро А.В., Пегова А.Н., Булыгина Е.Р. Влияние гомоцистеина и гомоцистеиновой кислоты на метаболиты

ные глутаматные рецепторы нейронов мозжечка // Нейрохимия. — 2010. — Т. 27, № 2. — С. 138–143.

25. Тиунов Л.А., Иванова В.А. Роль глутатиона в механизмах детоксикации // Вестн. АМН СССР. — 1988. — № 1. — С. 62–69.

26. Ярцев Е.И., Гольдберг Е.Д., Коменников Ю.А. Таурин (фармакологические и противолучевые свойства). — М.: Медицина, 1975. — 158 с.

27. Aзуома I., Halliwell B., Haey B.M. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their precursors // Biochem. J. — 1988. — Vol. 256, N 1. — P. 251–255.

28. Bernardini P., Fisher E. Amino acid imbalance and hepatic encephalopathy // Ann. Rev. Nutr. — 1982. — Vol. 2. — P. 419–454.

29. Camera E., Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes // J. Chromatography B. — 2002. — Vol. 781. — P. 181–206.

30. Choi D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent // Neurosci. Lett. — 1985. — Vol. 58, N 3. — P. 293–297.

31. Chwatko G., Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma // Anal. Biochem. — 2005. — N 337. — P. 271–277.

32. Collins T., Cybulsky M.I. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 107. — P. 255–264.

33. Davidson N. Neurotransmitter amino acids. — London-N.Y., 1976. — 179 p.

34. Deyl Z. Profiling of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography // J. Chromatogr. — 1986. — Vol. 379. — P. 177–250.

35. Feudis De F.V., Madtes P., Ojeda A., Gadea C.M. Binding of glutamate and aspartate to synaptosomal fractions of six regions of the Feline brain // Exper. — 1976. — Vol. 32, N 8. — P. 1014–1015.

36. Fowler B. Disorders of homocysteine metabolism // J. Inherited Metab. Dis. — 1997. — N 20. — P. 270–285.

37. Huxtable R.J. Physiological action of taurine // Physiol. Rev. — 1992. — Vol. 72. — P. 101–163.

38. Jacobowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans // CMLS, Cell. Mol. Life Sci. — 2004. — N 61. — P. 470–487.

39. Ji C., Karlowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury // World J. gastroenterol. — 2004. — Vol. 10, N 12. — P. 1669–1708.

40. Karla D.K. Homocysteine and cardiovascular disease // Curr. Atheroscler. Rep. — 2004. — Vol. 6. — P. 101–106.

41. Lang C.A., Narishkin S., Schneider DL, et al. Low blood glutathione levels in healthy aging adults // J. Lab. Clin. Med. — 1992. — Vol. 120. — P. 720–725.

42. Link E.M. Why is H2O2 cytotoxicity pH-dependent? // Free Radicals, methodology and concepts. — London: Richelieu Press, 1988. — P. 539–550.

43. Medina M., Urdiales J.L., Amores-Sanchez M.I. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions // Eur. J. Biochem. — 2001. — Vol. 268. — P. 3871–3882.

44. McBain C.J., Mayer M.L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function // Physiol. Rev. — 1994. — Vol. 74, N 3. — P. 723–760.

45. McMenamin M.E., Himmelfarb J., Nolin T.D. Simultaneous analysis of multiple amino thiols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatography B. — 2009. — Vol. 877, issue 28. — P. 3274–3281.

46. Meldrum B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology // Journal of Nutrition. — 2000. — Vol. 130. — P. 1007–1015.

47. Moat S.J., Bao L., Fowler B. The molecular basis of cystathionine-beta-synthase (CBS) deficiency in UK and US patients with homocystinuria // Hum. Mutat. — 2004. — Vol. 23. — P. 206–210.

48. Moir A., Ashcroft G., Crawford T. et al. Cerebral metabolites in cerebrospinal fluid as a biochemical approach to the brain // Brain. — 1970. — Vol. 93. — P. 357–368.

49. Monostori P., Wittmann G., Karg E., Turi S. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review // J. Chromatography B. — 2009. — Vol. 877, issue 28. — P. 3331–3346.

50. Nemmiche S., Chabane-Sari D., Guiraud P. Role of α -tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain // Chemico-Biological Interaction. — 2007. — Vol. 170. — P. 221–230.

51. Orrenius S., Moldeus P. The multiple roles of glutathione in drug metabolism // Trends Pharmacol Sci. — 1984. — Vol. 5. — P. 432–435.

52. Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification // Clinica Chimica Acta. — 2003. — Vol. 333. — P. 19–39.

53. Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I., Giustarini D., Lusini L., Colombo R., DiSimplicio P. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? // Clinical Chemistry. — 2002. — Vol. 48, N 5. — P. 742–753.

54. Sakhi A.K., Blomhoff R., Gundersen E. Simultaneous and trace determination of reduced and oxidized glutathione in minute plasma samples using dual mode fluorescence detection and column switching performance liquid chromatography // J. Chromatography A. — 2007. — Vol. 1142, issue 2. — P. 178–184.

55. Страйер Л. (Stryer L.) Биохимия: в 3 т. Т.2 — М.: Мир, 1985. — 312 с.

56. Tagawa Tadayasu, Sengupta Shantanu, Chen Hong. Mechanisms for the formation of protein-bound homocysteine in human plasma // Biochem. Biophys. Res. Communications. — 2000. — Vol. 277. — P. 668–674.

57. Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy // Epilepsia 2001. — Vol. 42, Suppl. 3. — P. 8–12.

58. Van Gelder N.M., Courtois A. Close correlation between changing content of specific amino acids in epileptogenic cortex of cats, and severity of epilepsy // Brain Res. — 1972. — Vol. 43. — P. 477–484.

59. Wang W., Rusin O., Xu X., Kim K.K., Escobedo J.O., Fakayode S.O., Fletcher K.A., Lowry M., Schowalter C.M., Lawrence C.M., Fronczek F.R., Warner I.M., Strongin R.M. Detection of homocysteine and cysteine // J. Am. Chem. Soc. — 2005. — Vol. 127. — P. 15949–15958.

60. Wright C.E., Tallan H.H., Lin Y.Y. Taurine: biological update // Ann. Rev. Biochem. — 1986. — Vol. 55. — P. 427–453.

61. Zhloba A.A., Blashko E.L. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection // J. Chromatography B. — 2004. — Vol. 800. — P. 275–280.

Принятые сокращения:

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, HPLC — высокоэффективная жидкостная хроматография; GSH — восстановленный глутатион; GSSG — окисленный глутатион; tGSH — общий глутатион; Cys — цистеин; tCys — общий цистеин; HCy — гомоцистеин; tHCy — общий гомоцистеин; HCysA — гомоцистеиновая кислота; GABA — гамма-аминомасляная кислота.

ОСОБЕННОСТИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЭНЕРГООБМЕНА ПОДРОСТКОВ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

К.С. РОЖНОВА

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Резюме. Проведено исследование особенностей церебрального энергообмена у подростков мужского пола с различным уровнем физической активности, находящихся в состоянии спокойного бодрствования и при выполнении ими функциональных проб, с использованием метода нейроэргометрии. Подростки разделены на 3 группы в зависимости от уровня активности: первая — с низким уровнем физической активности; вторая — с умеренным (факультативные занятия физкультурой); третья — с высоким (занятия профессиональным спортом). Выявлено, что в покое подростки первой группы имеют наиболее приближенные к норме показатели межполушарной асимметрии и уровень постоянного потенциала мозга, однако при нагрузке они оказались менее адаптированными к стрессовым нагрузкам, чем подростки с умеренной физической активностью. Более оптимальное функциональное состояние наблюдается у подростков с умеренным уровнем физической активности (по результатам нейроэргометрии во время выполнения функциональных проб и динамики восстановления ЧСС). Группа подростков с низким уровнем активности и группа спортсменов имеют признаки незавершенности адаптационных процессов.

Ключевые слова: нейроэргометрия, УПП, подростки, физическая активность, функциональные пробы.

SPECIFIC FEATURES OF BRAIN ENERGY METABOLISM IN ADOLESCENTS WITH DIFFERENT LEVELS OF PHYSICAL ACTIVITY

K.S. ROZHNOVA

State Educational Institution of Higher Professional Education

«First Moscow I.M. Sechenov State Medical University», Moscow, Russia

Summary. The characteristics of brain energy metabolism in male adolescents with different levels of physical activity in the calm wakeful state and on performing functional tests made a study using neuroergometry. The teenagers were divided into 3 groups depending on the level of their physical activity: the first one with low activity, the second — with moderate (optional lessons of physical education), and the third — with high activity (going in for professional sports). It was revealed that at rest the interhemispheric asymmetry indices and the rate of brain constant potential are most close to the norm among the teenagers of the first group. However they were less adapted to stress load than adolescents with moderate physical activity. More optimal functional status was observed in adolescents with moderate level of physical activity (based on the results of neuroergometry during the performance of functional tests and the dynamics of heart rate recovery). The group of teenagers with low level of physical activity and the group of sportsmen have signs of incompleteness of adaptation processes.

Key words: neuroergometry, rate of brain constant potential, adolescents, physical activity, functional tests.

Данные для корреспонденции:

Рожнова Ксения Сергеевна, аспирант кафедры семейной медицины,
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, г. Москва, ул. Барышиха, 40-1-355,
тел. +7 (916)107-43-01; e-mail: k_doc@pochta.ru

Введение

Здоровье подростков, особенно в современных социально-экономических условиях, является серьезной комплексной проблемой. Состояние здоровья и развитие общества во многом определяются уровнем популяционного здоровья детей и подростков, которые составляют значительную часть в структуре населения, определяют здоровье нации в целом и представляют её культурный, интеллектуальный, производственный и репродуктивный потенциал. Вызывают тревогу состоя-

ние здоровья, низкий уровень физического развития и резервов адаптации у школьников, студентов и лиц призывного возраста [9, 17, 21].

По мере роста требований к подросткам со стороны общества на фоне ухудшения их соматического и психологического здоровья происходит возрастание интенсивности нагрузки на центральную нервную систему, что способствует нарушению условий стабильного функционирования мозга. В связи с этим в последнее время значительно возрос интерес к проблеме цере-

брального энергетического обмена, особенно к неинвазивным методам его оценки. Кроме широко распространенных методов оценки электрофизиологических показателей головного мозга (электроэнцефалография и метод вызванных потенциалов), различными исследователями были предприняты попытки изучить особенности функционального состояния путем изучения сверхмедленных электрофизиологических потенциалов (СМЭП) мозга, в частности омега-потенциала [8, 11, 12, 25] или квазиустойчивых потенциалов [13, 20, 22], их взаимосвязи с заболеваниями [5, 6, 15], а также с уровнем успеваемости и одаренности подростков [3, 13, 14].

Однако эти методики имеют ряд недостатков, к которым относятся регистрация потенциалов только в области вертекса, отсутствие надежного референтного электрода и др., что не позволяет оценивать картину их распределения в пространстве, учитывать естественную вариабельность значений потенциалов, характеризующих функциональное состояние и их возрастную изменчивость. **Нейроэргометрия**, с помощью которой производится регистрация уровня постоянного потенциала мозга (УПП), для этой цели обладает рядом преимуществ по сравнению с указанными методами. УПП менее чувствителен к информационной составляющей поступающих извне сигналов, чем ЭЭГ, вызванные потенциалы и омегаметрия. При этом УПП четко отражает энергетические характеристики различных областей головного мозга, проявляя в этом сходство с позитронно-эмиссионной томографией, по сравнению с которой он более приспособлен к условиям физиологического исследования.

В основе нейроэргометрии лежит определение кислотно-щелочного равновесия по показателям *уровня постоянного потенциала* (УПП) головного мозга. УПП — это медленно меняющийся потенциал милливольтного диапазона, интегрально отражающий мембранные потенциалы нейронов, глии и гематоэнцефалического барьера и зависящий от разности концентрации водородных ионов по обе стороны этой мембраны. Величина УПП позволяет оценивать интенсивность энергетических процессов в мозге, поскольку интенсификация церебрального энергетического обмена сопровождается изменением кислотно-щелочного равновесия, что отражается в повышении УПП. Таким образом, изменение значений УПП в какой-либо области головного мозга отражает изменение интенсивности энергетического обмена в этой области. В силу своего происхождения УПП коррелирует с множеством биохимических и иммунологических параметров, зависящих от уровня церебрального энергетического обмена и функционального состояния адаптивных систем организма. Таким образом, УПП головного мозга представляет одну из информативных характеристик церебральных энергетических процессов.

Регистрация и обработка результатов нейроэргометрии производилась по методу, разработанному в лабо-

ратории возрастной физиологии мозга НИИ мозга РАМН д. б. н. В.Ф. Фокиным и д. м. н. Н.В. Пономаревой мозга в 1982 г. [24].

В последнее время появляется все большее количество исследований нейрофизиологической организации мозга с использованием метода нейроэргометрии, в том числе изучения энергетического обмена головного мозга детей и подростков [2, 4, 16, 24, 26].

Изучение состояния здоровья подростков тесно связано с изучением образа жизни и проблемой здорового образа жизни, под которым понимается соблюдение физиологически оптимального режима труда и отдыха, рациональное питание, достаточный уровень физической активности, соблюдение принципов психогигиены и многие другие факторы [7].

Физическая активность подростков отражает социально мотивированное отношение к физической культуре. Под «физической активностью» понимается деятельность индивида, направленная на достижение физического совершенства и характеризующаяся конкретными качественными и количественными показателями [23]. По данным различных авторов, для мальчиков и юношей характерен более высокий уровень физической активности, чем для девочек и девушек соответствующего возраста; по мере взросления подростков отмечается снижение уровня физической активности у подростков обоих полов. Тем не менее, уровень физической активности юношей [10, 23] остается более высоким, чем девушек того же возраста, что согласуется с самооценкой и акцентом валеологических установок подростков.

Цель исследования

Изучение состояния энергетического обмена мозга подростков с различным уровнем физической активности на основании измерения УПП и его динамики при выполнении функциональных проб.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 120 подростков мужского пола и молодых мужчин в возрасте от 16 до 21 года, давших добровольное информированное согласие на участие в исследовании, которые были разделены на 3 равные группы в зависимости от уровня физической активности. В **первую группу** вошли подростки с *низким уровнем физической активности*, не имеющие регулярной физической активности вне уроков физкультуры; во **вторую** — лица с *умеренным уровнем физической активности*, регулярно посещающие занятия физической культурой и дополнительно занимающиеся в секциях или индивидуально; в **третью** — подростки с *высоким уровнем физической активности*, профессионально занимающиеся мини-футболом. Средний возраст обследованных подростков составил 17,61 года и не имел статистически значимых различий в изученных группах. Студенты обследовались в период отсутствия экзамена-

ционного стресса (середина семестра), а спортсмены перед тренировкой.

Изучение интенсивности церебрального энергообмена производилось посредством **нейроэнергометрии** по методу, разработанному в лаборатории возрастной физиологии мозга НИИ мозга РАМН д. б. н. В.Ф. Фокиным и д. м. н. Н.В. Пономаревой (Патент РФ № 2135077, 1999). Регистрация уровня постоянного потенциала (УПП) мозга производилась с помощью аппаратно-программного комплекса «Нейроэнергокартограф» в лобной, центральной, затылочной областях по сагиттальной линии и височной области левого и правого полушария мозга по стандартной схеме 10–20%. Запись УПП осуществлялась непрерывно в состоянии спокойного бодрствования (фоновый уровень) и во время выполнения функциональных проб. Одновременно производилась регистрация ЧСС. Функциональное тестирование включало в себя стандартную пробу с приседаниями (20 приседаний за 30 с) и трехминутную гипервентиляцию [18].

Статистическая обработка материала производилась при помощи критерия хи-квадрат, дисперсионного и корреляционного анализа. Достоверность различия частот определяли при помощи критерия хи-квадрат. Достоверность различий средних по группам оценивали посредством дисперсионного анализа по значению критерия F. Для анализа связи непрерывных переменных использовали корреляционный анализ. Статистически значимыми считали различия средних величин при $p < 0,05$. Выраженной тенденцией считали различия средних величин при $0,05 < p < 0,1$ (вероятность ошибки не более 10%). Доверительные границы для выборочного среднего рассчитывали на основании критерия Стьюдента; доверительные границы для выборочных частот рассчитывали на основании биномиального распределения.

Результаты и обсуждение

Общая характеристика подростков из исследованных групп

Исследованные группы помимо пола и возраста были сопоставимы по ведущей руке: количество левшей по результатам самоопределения составило 6 в первой, 4 во второй и 6 человек в третьей (15, 10 и 15% соответственно), а амбидекстров — 2, 7 и 4 подростка (5, 17,5 и 10%) в каждой из исследуемых групп соответственно. По данным [1], количество лиц с установленной леворукостью среди не занимающихся спортом составляет 3%, амбидекстров — 8%, что совпадает с результатами других исследований: 3,4% левшей и 8,8% амбидекстров среди обследованных без разделения по полу, при этом доля синистральных лиц среди мужчин выше и составляет 4,7 и 7% соответственно [26]. Среди футболистов отмечается увеличение количества леворуких до 9% [1]. Более высокие показатели синистральности при сохранении тенденции к её преобладанию в группе мини-

футболистов (25%), которые были получены в представленном исследовании, вероятно, связаны с субъективной оценкой ведущей руки обследованными, что говорит о необходимости более точной комплексной оценки ведущих конечностей. В то же время можно предположить, что подростки, занимающиеся физкультурой и спортом, более точно оценивают свою ведущую руку. В связи с отсутствием достоверных различий между группами, более подробное исследованиерукости подростков не производилось.

При изучении уровня травматизма в первой группе было выявлено 20% подростков с незначительными травмами и 7,5% с ЧМТ в анамнезе; во второй группе эти показатели составили 40% и 20%; в третьей — 67,5% и 27,5% соответственно. Поскольку частота травм у подростков в исследованных группах достоверно различалась и была ассоциирована с уровнем физической активности, для исключения влияния данного фактора на показатели энергетического обмена мозга дополнительно был проведен анализ частных коэффициентов корреляции числовых показателей с группой физической активности под контролем травм.

Кроме того, в связи с тем, что в первой и второй исследованных группах количество курящих подростков было достоверно выше [19], для исключения влияния курения на показатели нейроэнергометрии был проведен анализ частных коэффициентов корреляции числовых показателей с группой физической активности под контролем курения.

Особенности церебрального нейроэнергообмена подростков исследованных групп

При изучении энергетического обмена мозга у каждого обследуемого производилось непрерывное измерение УПП в лобном (Fz), центральном (Cz), затылочном (Oz) отведении по сагиттальной линии, в правом (Td) и левом височном (Ts) отведении, а также локальных потенциалов в данных отведениях: Fz', Cz', Oz', Td', Ts'. Регистрировались усредненные значения УПП для этих областей (Хср) и разности УПП между правой и левой височной областью (Td–Ts) во время выполнения проб с нагрузкой (приседания и гипервентиляция) и после её окончания. В связи с тем, что во многих случаях уровень постоянного потенциала у подростков не имел нормальный характер распределения, а изменялся волнообразно, изучение динамики УПП производилось как после окончания каждого вида нагрузки, так и в конце восстановительного периода. Дополнительно регистрировалось время достижения максимальных значений УПП, которые измерялись на основании Хср. Уровень постоянного потенциала, измеренный на фоне максимальных значений Хср, обозначен как *пиковый потенциал*.

По результатам статистической обработки была выявлена достоверная связь ($p < 0,05$) между исследованными группами и уровнем постоянного потенциала (УПП) головного мозга, а также показателями функ-

Таблица 1

Сводная таблица динамики церебрального энергообмена при функциональном тестировании подростков исследуемых групп

Отведение	Исследуемая группа	Покой, абс. значения, мВ	Во время физической нагрузки на фоне пикового УПП		Сразу после окончания физической нагрузки		После физической нагрузки в течение 3 минут на фоне пикового УПП		Через 3 минуты после окончания физической нагрузки		Во время гипервентиляции на фоне пикового УПП		Сразу после окончания гипервентиляции		Через 3 минуты после окончания гипервентиляции	
			УПП, мВ	к УПП покоя, в %	УПП, мВ	к УПП покоя, в %	УПП, мВ	к УПП покоя, в %	УПП, мВ	к УПП покоя, в %	УПП, мВ	к УПП покоя, в %	УПП, мВ	к УПП покоя, в %	УПП, мВ	к УПП покоя, в %
Fz	1	10,12	16,53**	163	15,63	154	Нет достоверных различий		12,6	125	18,45*	182	Нет достоверных различий между группами			
	2	8,88**	14,57**	164	13,6**	153			10,0*	113	14,49*	163				
	3	12,45**	20,79**	167	18,38**	148			13,3*	107	17,19	138				
Fz'	1	-3,1	-0,63*	-20	Нет достоверных различий между группами						0,91*	-29	0,73*	-24	Нет достоверных различий	
	2	-4,04	-3,34*	83							-1,28*	32	-1,13*	28		
	3	-3,01	-2,22	74							-1,33*	44	-1,46*	49		
Cz	1	18,82	22,62*	120	Нет достоверных различий между группами											
	2	17,81	23,38	131												
	3	18,79	27,14*	144												
Cz'	1	5,6**	Нет достоверных различий		5,44*	97	5,48	98	5,44*	97	Нет достоверных различий между группами					
	2	4,9*			5,59*	114	5,75*	117	5,59*	114						
	3	3,32**			3,66*	110	3,66*	110	3,61*	109						
Oz	1	12,9	16,35**	127	15,6**	121	18,87*	141	Нет достоверных различий между группами							
	2	13,77	19,03**	138	17,83	129	20,03*	145								
	3	16,39	23,64**	144	20,89**	127	23,35*	142								
Oz'	1	-0,27	-0,81**	300	-0,91**	337	-1,09**	404	-0,53**	196	-0,75**	178	-0,53**	196	-0,2*	74
	2	0,85	1,12**	132	0,97**	114	0,47**	55	0,16**	19	0,7**	82	0,39	46	0,7*	82
	3	0,92	1,35**	147	1,27**	138	1,21**	132	1,27**	138	1,4**	152	1,54**	167	1,13*	123
Td	1	12,53	15,46**	123	14,86**	119	Нет достоверных различий		10,4*	83	Нет достоверных различий между группами					
	2	12,13	16,69**	138	15,61	129			11,12	92						
	3	15,29	22,05**	144	19,43**	127			13,79*	90						
Td'	1	-0,68	Нет достоверных различий между группами													
	2	-0,47														
	3	-0,17														
Ts	1	11,67*	14,8**	127	Нет достоверных различий между группами										11,24	96
	2	11,42**	15,87**	139											8,88**	78
	3	14,42**	20,78**	144											13,33**	92
Ts'	1	-1,55	Нет достоверных различий между группами													
	2	-1,23														
	3	-1,05														
Xcp	1	13,22**	17,15**	130	16,51*	125	Нет достоверных различий между группами								14,04*	106
	2	12,92**	17,91**	139	16,86	130									12,4*	96
	3	5,47**	22,91**	148	20,36*	132									15,45*	99

Примечание:

* — выраженная тенденция к наличию достоверных различий ($0,05 < p < 0,1$; вероятность ошибки не более 10%).

** — достоверные различия ($p < 0,05$).

циональной межполушарной асимметрии (ФМА) (табл. 1).

В покое достоверно более высокие показатели локального УПП, приближенные к возрастной норме, ре-

гистрировались в группе подростков, имеющих низкий уровень физической активности, и уменьшались с возрастом её степени от первой к третьей группе (рис. 1). Снижение уровня локального потенциала в централь-

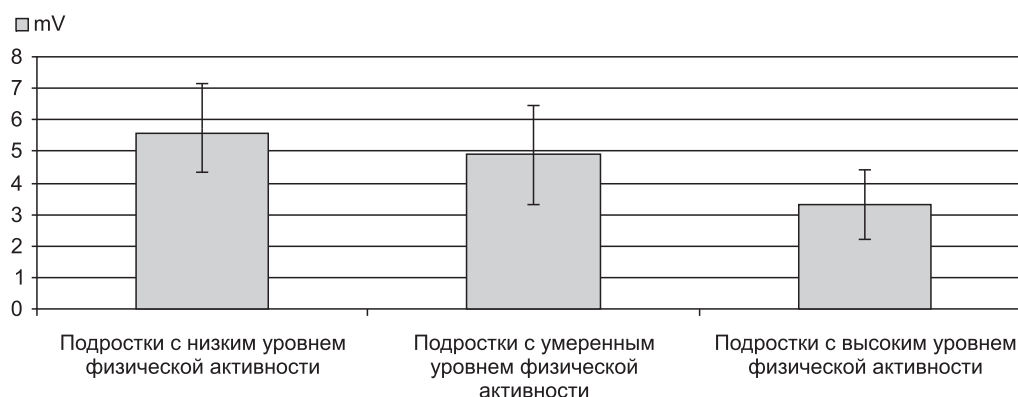


Рис. 1. Средние показатели локального УПП в центральном отведении (Cz') в покое у подростков
Примечание: I — доверительные границы

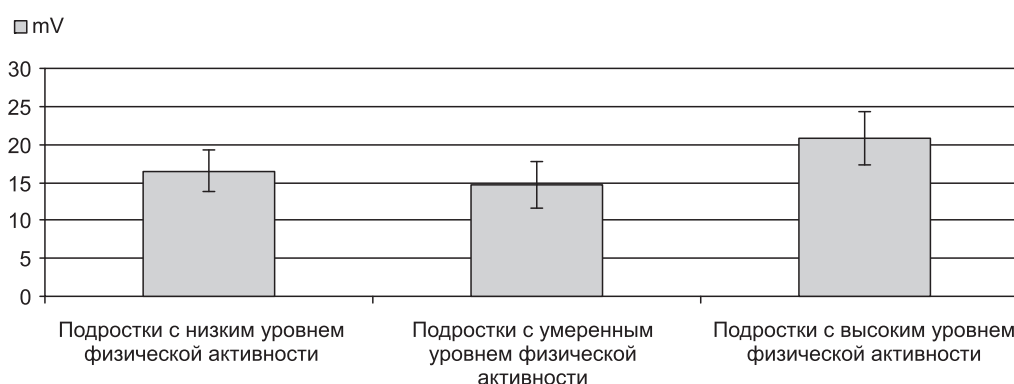


Рис. 2. Средние пиковые показатели УПП в лобном отведении (Fz) у подростков при выполнении физической нагрузки
Примечание: I — доверительные границы

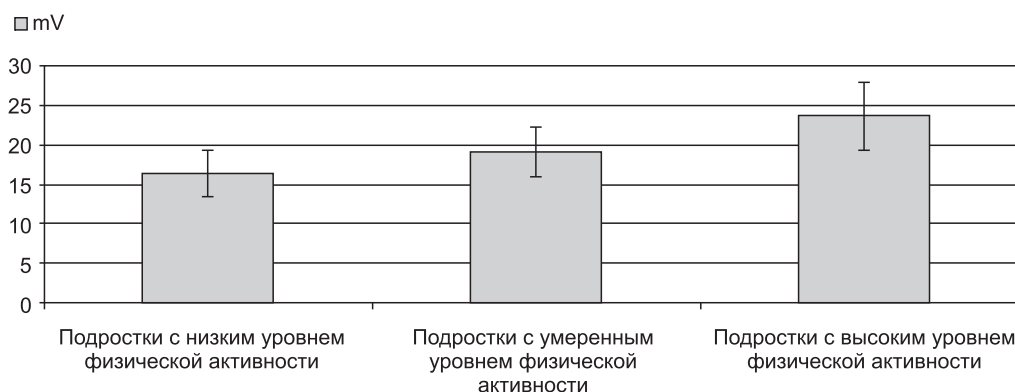


Рис. 3. Средние пиковые показатели УПП в затылочном отделе (Oz) у подростков во время выполнения физической нагрузки
Примечание: I — доверительные границы

ном отведении (Cz'), наиболее выраженное у представителей третьей группы, указывает на недостаточность корково-подкорковой активации у подростков, занимающихся профессиональным спортом.

Как в покое, так и при физической нагрузке в лобном отведении (Fz) максимальные значения УПП наблюдались в группе подростков, занимающихся спортом профессионально, меньшие — у подростков с низким уровнем физической активности и минимальный УПП регистрировался в группе подростков с умеренным уровнем физической активности (рис. 2). В данном отведении были выявлены достоверные различия показателей

энергетического обмена мозга у подростков первой и третьей групп, а также в некоторых случаях регистрировались различия между УПП у подростков с умеренным и высоким уровнем физической активности. Между показателями энергообмена у подростков первой и второй групп значимых различий выявлено не было.

Во время физической нагрузки и после её окончания в затылочном (Oz) отведении, а также в ряде случаев в височных отведениях (Td и Ts) достоверно более высокие значения УПП регистрировались в группе подростков, профессионально занимающихся спортом, менее высокие — у подростков с умеренным уровнем актив-

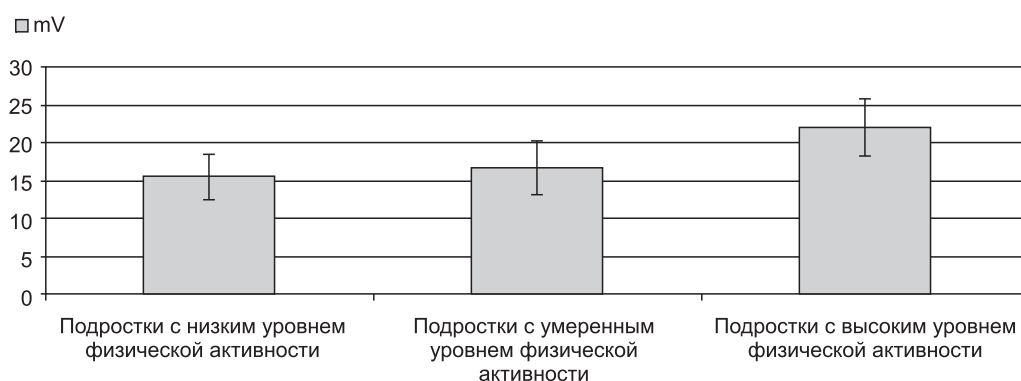


Рис. 4. Средние пиковые показатели УПП в правом височном отведении (Td) у подростков при выполнении физической нагрузки
Примечание: I — доверительные границы

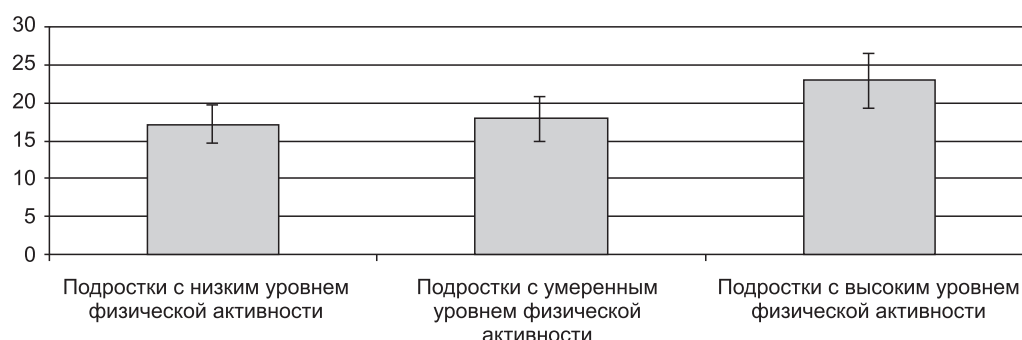


Рис. 5. Пиковые показатели среднего УПП (Xcp) у подростков во время физической нагрузки
Примечание: I — доверительные границы

ности и наименьшие — у подростков, не имеющих регулярной физической активности (рис. 3, 4).

Во время физической нагрузки и после её окончания достоверно более высокие значения среднего УПП (Xcp) регистрировались в группе подростков, профессионально занимающихся спортом, значительно меньшие — у подростков с низким и умеренным уровнем активности (рис. 5).

При изучении временных характеристик достижения пиковых показателей УПП при выполнении физической нагрузки было выявлено, что наиболее рано максимальные показатели УПП регистрировались у подростков второй группы, несколько позже в третьей группе и наиболее поздно они наблюдались в первой группе у подростков с низким уровнем физической активности (табл. 2).

Таким образом, во время выполнения пробы с физической нагрузкой для подростков первой группы были характерны, в целом, более низкие значения пикового УПП и более позднее время его достижения, а с возрастанием уровня физической активности обследованных наблюдалось увеличение УПП, которое достигало максимальных значений в группе профессиональных спортсменов. Полученные результаты говорят о более выраженном увеличении интенсивности церебральных энергозатрат во время физической нагрузки у представ

вителей этой группы, что указывает на снижение их резервных возможностей. У подростков с умеренным уровнем физической активности в большинстве отведений отмечаются сходные изменения, однако в лобном отведении у представителей данной группы регистрируются минимальные значения пикового УПП. Такой характер динамики изменений энергетического обмена головного мозга позволяет говорить о более оптимальном функциональном состоянии подростков, занимающихся факультативно физкультурой. Подростки с низким уровнем физической активности характеризуются наименьшей динамикой нейроэнергообмена в большинстве изученных областей и её умеренным изменением в лобном отделе. Это говорит о близком к оптимальному состоянии подростков данной группы, однако для них данная нагрузка является более стрессовой, чем для подростков второй группы.

При изучении временных характеристик достижения пиковых значений УПП после окончания физической нагрузки выявлено, что наиболее рано он регистрировался у подростков третьей группы, затем увеличение происходило в первой группе и позднее всего наблюдалось во второй исследованной группе (табл. 2).

В результате проведения пробы с дозированной физической нагрузкой было выявлено, что подростки с низким уровнем физической активности характеризу-

Таблица 2

**Сравнительная таблица времени достижения пиковых значений УПП
при функциональном тестировании подростков с различным уровнем физической активности**

Исследуемая группа	Во время физической нагрузки, с	После физической нагрузки в течение 3 минут, с	Во время гипервентиляции, с
1 группа	25,3**	40,1**	102,7
2 группа	20,4**	65,2**	127,7**
3 группа	21,2*	26,6**	92,9**

Примечание:

* — выраженная тенденция к наличию достоверных различий ($0,05 < p < 0,1$; вероятность ошибки не более 10%).

** — достоверные различия ($p < 0,05$).

Таблица 3

Распределение частот доминирования полушарий в группах подростков с различным уровнем физической активности

		Доминантное полушарие (%)			Всего
		правое	МПА не выражена	левое	
Уровень физической активности	Подростки с низким уровнем физической активности	45	7,5	47,5	100
	Подростки с умеренным уровнем физической активности	45	12,5	42,5	100
	Подростки с высоким уровнем физической активности	52,5	10	37,5	100

Примечание:

уменьшение разности между правым (Td) и левым (Ts) височными отведениями менее 0,5 мВ рассматривалось как сглаживание межполушарной асимметрии.

ются, в целом, меньшим уровнем интенсивности нейроэнергообмена во время и после физической нагрузки. Максимальное увеличение интенсивности обменных процессов было зафиксировано в группе лиц, профессионально занимающихся спортом. Для подростков, занимающихся физкультурой факультативно, характерны промежуточные показатели, более близкие к полученным для первой группы, при тенденции к минимальному уровню интенсификации церебрального энергообмена в лобном отведении и максимальному — в центральном. Характер полученных изменений позволяет говорить, в целом, о лучшем функциональном состоянии подростков с умеренным уровнем физической активности и меньшем резерве адаптационных возможностей у представителей первой и третьей групп. **При изучении особенностей энергетического обмена мозга подростков во время гипервентиляции** и после её окончания достоверные различия были выявлены в затылочном отведении (Oz'). Наиболее высокие показатели локального УПП регистрировались в группе

профессиональных спортсменов. Снижение УПП наблюдалось с уменьшением уровня физической активности подростков от третьей к первой группе (рис. 6). Кроме того, выявлена тенденция к наличию достоверной связи между уровнем физической активности и УПП в лобном отведении (Fz и Fz').

При изучении временных характеристик достижения пиковых значений УПП во время проведения пробы с гипервентиляцией наиболее раннее время достижения пиковых значений УПП было зафиксировано в группе подростков, профессионально занимающихся спортом. Самое позднее время регистрации пикового УПП было отмечено в группе лиц, занимающихся физкультурой факультативно (табл. 2).

При анализе результатов изменения интенсивности церебрального энергообмена **во время гипервентиляции** выявлены, в целом, более низкие показатели в группах лиц с низким и умеренным уровнем физической активности и их увеличение в группе профессиональных спортсменов. Динамика изменений УПП в изученных

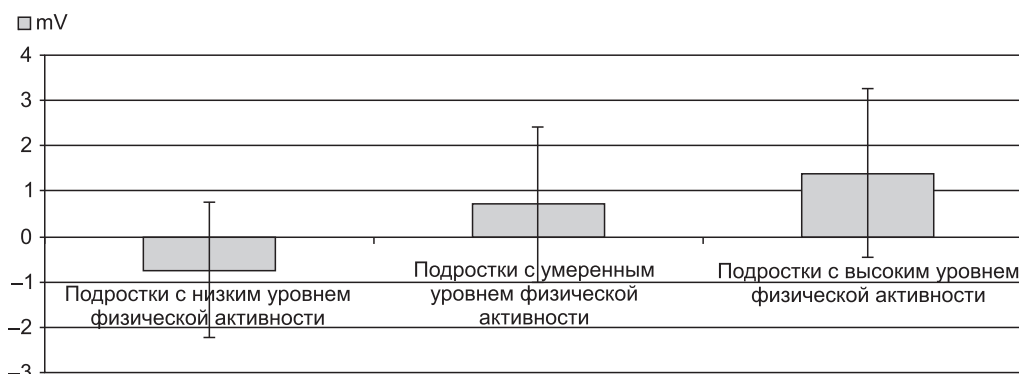


Рис. 6. Средние пиковые показатели локального УПП в затылочном отведении (Oz') у подростков при гипервентиляции
Примечание: I — доверительные границы

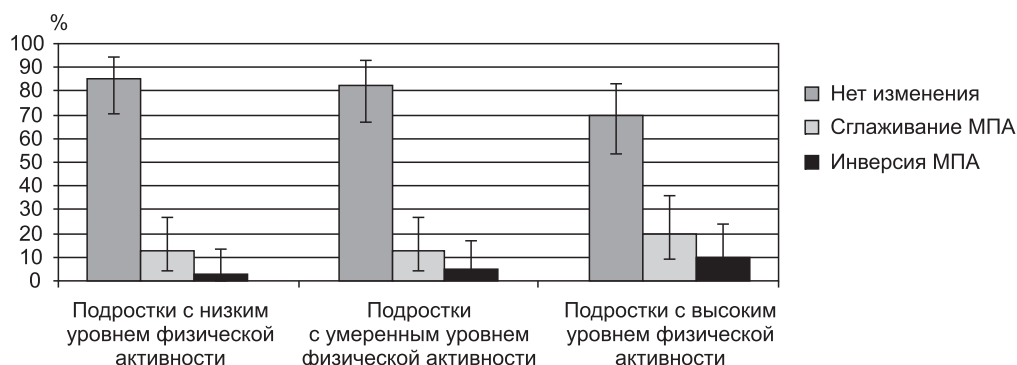


Рис. 7. Распределение частот изменения МПА при пиковых значениях УПП во время выполнения пробы с физической нагрузкой по сравнению с асимметрией в покое у подростков с различным уровнем физической активности
Примечание: I — доверительные границы

отведениях (табл. 1), а также временные характеристики достижения пикового потенциала (табл. 2) позволяют говорить о более оптимальном функциональном состоянии второй группы, подростки из которой факультативно занимаются физкультурой. Это проявляется в лучшей переносимости ими функциональных проб, которые являются стрессовыми и вызывают активизацию резервных возможностей организма.

При изучении функциональной межполушарной асимметрии (ФМА) было выявлено, что в покое у подростков наблюдается некоторая тенденция к преобладанию частоты доминирования левого полушария в первой и правого — в третьей группе. Во второй группе отмечалось незначительное преобладание правого полушария (табл. 3).

Достоверных различий между уровнем физической активности подростков и функциональной межполушарной асимметрией (ФМА) в покое не обнаружено, однако отмечается некоторая тенденция к преобладанию левого доминантного полушария (47,5%) в группе подростков с низким уровнем физической активности и правого субдоминантного в норме полушария в группе спортсменов (52,5%). В группе подростков с умеренным уровнем физической активности по сравнению с первой группой несколько снижается частота доминирования левого полушария (с 47,5% до 42,5%) за счет увеличения доли лиц без выраженной ФМА (с 7,5% до

12,5%), при этом частота доминирования правого полушария не изменяется и сохраняется у 45% обследованных. Полученные результаты указывают на преобладание симпатической активации в группе подростков с высоким уровнем физической активности.

Изучение динамики функциональной межполушарной асимметрии во время функционального тестирования подростков позволило выявить наличие достоверной связи ($p < 0,05$) между уровнем физической активности подростков и инверсией ФМА при пиковых значениях УПП во время выполнения пробы с физической нагрузкой, также ФМА по окончании пробы по сравнению с показателями асимметрии в покое и группой физической активности подростков.

При физической нагрузке инверсия межполушарной асимметрии по сравнению с покоем достоверно чаще наблюдалась в группе подростков, занимающихся профессиональным спортом (рис. 7), что, вероятнее всего, связано со снижением их резервных возможностей.

Во время гипервентиляции изменение ФМА наиболее часто происходило в группе подростков, не имеющих регулярной физической нагрузки (рис. 8). Кроме того, у них достоверно чаще наблюдалось изменение асимметрии после завершения нагрузки.

Сразу после завершения гипервентиляции наиболее выраженные различия в частоте инверсии МПА наблюдались между подростками первой и третьей,

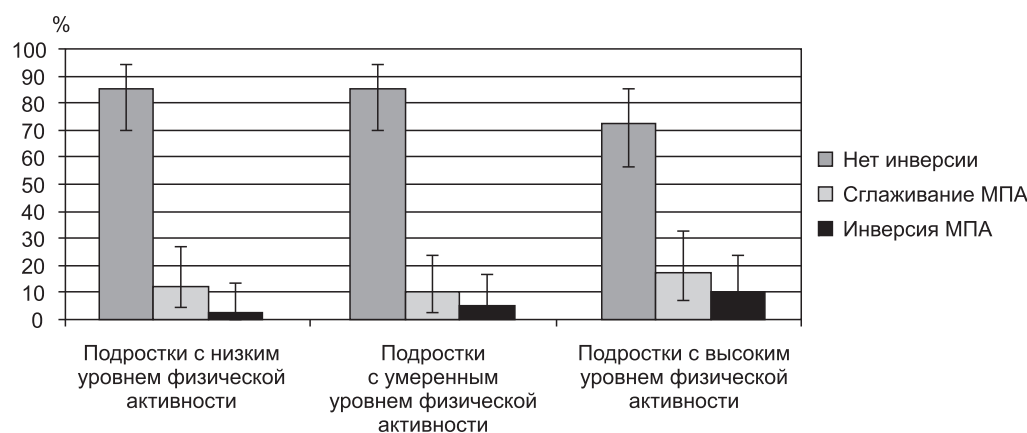


Рисунок 8. Распределение частот изменения МПА после выполнения пробы с физической нагрузкой по сравнению с асимметрией в покое у подростков с различным уровнем физической активности

Примечание: I — доверительные границы

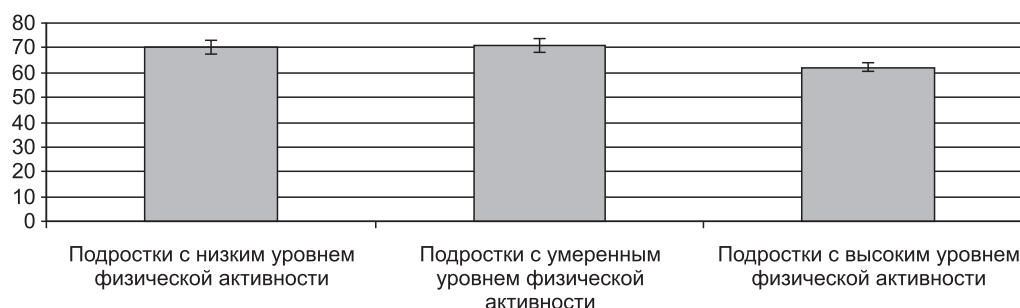


Рис. 9. Средняя ЧСС в покое у подростков с различным уровнем физической активности

Примечание: I — доверительные границы

а через 3 минуты после окончания нагрузки регистрируются также между представителями первой и второй групп. Между показателями асимметрии у подростков с умеренным и высоким уровнями физической нагрузки статистически достоверных различий выявлено не было.

Таким образом, по результатам изучения особенностей ФМА у подростков с различным уровнем физической активности выявлена тенденция к преобладанию в покое левого полушария в первой и, в меньшей степени, во второй исследованной группе; в третьей группе выявлено доминирование правого полушария.

По результатам изучения динамики ФМА во время функционального тестирования подростков выявлено, что изменение доминирующего в покое полушария также наиболее часто наблюдается у подростков с высоким уровнем активности. Инверсия МПА по сравнению с таковой во время выполнения проб с нагрузкой чаще наблюдается у подростков с умеренным и низким уровнем физической активности.

Анализ полученных результатов позволяет говорить об изначально более высоком уровне стрессированности подростков, которые занимаются спортом профессионально, а также о более выраженном напряжении адаптационных механизмов во время нагрузки, особенно при гипервентиляции. Подростки с низким и умеренным уровнем физической активности характеризуются

наименьшими изменениями ФМА во время функционального тестирования.

Во время проведения пробы с гипервентиляцией часть подростков испытывала **головокружение**. В первой группе доля таких обследованных составила 15%, во второй — 2,5%, в третьей группе на этот симптом указали 30% подростков. Таким образом, головокружение достоверно чаще наблюдалось у представителей третьей группы при минимальной частоте её распространенности во второй исследованной группе. Полученные результаты можно объяснить, с одной стороны, нетренированностью кардиореспираторной системы подростков, не имеющих регулярной физической нагрузки, с другой стороны, — повышенной чувствительностью к стрессу и чрезмерной гипервентиляцией у спортсменов.

Во время проведения функционального тестирования подростков одновременно с нейроэргометрией проводилось изучение **динамики частоты сердечных сокращений (ЧСС) у подростков**. Было выявлено, что частота пульса в покое и её увеличение при нагрузке зависят от исходного уровня физической активности, но не связаны напрямую со степенью тренированности подростков. Минимальные значения ЧСС в покое, при физической нагрузке и гипервентиляции наблюдаются в группе подростков с высоким уровнем физической активности ($62,08, \sigma \pm 5,44$), значительно более высокие показатели — в группах подростков с низким и умерен-

ным уровнем физической активности ($70,2, \sigma \pm 9,27$ и $71,25, \sigma \pm 8,64$ соответственно) (рис. 9). Кроме того, было выявлено, что после нагрузки во второй группе регистрируется больший диапазон частот сердечных сокращений, что позволяет говорить о несколько больших резервных возможностях подростков с умеренным уровнем физической активности.

Выводы

В покое УПП и показатели межполушарной асимметрии мозга наиболее приближены к норме у подростков с низким уровнем физической активности. Однако при нагрузке они оказываются менее адаптированными к стрессу, чем подростки других групп. Полученные результаты указывают на более оптимальное функциональное состояние мозга подростков с умеренным уровнем физической активности. Подростки с низким уровнем активности и профессиональные спортсмены имеют признаки незавершенности адаптационных процессов.

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили выявить особенности церебрального энергообмена подростков с различным уровнем физической активности и с нейрофизиологических позиций обосновать необходимость регулярных факультативных занятий подростков физической культурой.

Рекомендации

Подросткам и молодым мужчинам можно рекомендовать регулярные факультативные занятия физкультурой, как в спортивных секциях, так и индивидуально, в течение не менее 2,5 часов в неделю при умеренной интенсивности физических упражнений и не менее 1 часа в неделю при интенсивных физических упражнениях для поддержания оптимального функционального состояния подростков.

К *умеренным физическим нагрузкам* относятся такие виды физической активности, как быстрая ходьба, работа в саду или на огороде, медленная езда на велосипеде, танцы, настольный теннис или тяжелая работа по дому, а также любые виды физической активности, интенсивность которых приближается к быстрой ходьбе и продолжительность составляет не менее 30 минут. *Интенсивными физическими упражнениями* являются такие виды физической активности, как бег трусцой, бег, быстрая езда на велосипеде, занятия аэробикой, плавание на дистанцию, большой теннис, бадминтон, а также любые виды физической активности, интенсивность которых приближается к бегу трусцой и продолжительность составляет не менее 20 минут.

Список литературы

1. Бердичевская Е.М., Гронская А.С. Функциональные асимметрии и спорт // Руководство по функциональной межполушарной асимметрии. — М.: Научный мир, 2009. — С. 647–691.

2. Боровова А.И., Галкина Н.С., Фокин В.Ф. Взаимосвязь эмоционально-личностных особенностей школьников первого класса с характером межполушарной асимметрии и уровнем постоянного потенциала головного мозга // Асимметрия. — 2009. — Т. 3, № 3. — С. 38–44.

3. Витель Е.Б. Содержание и методы подготовки студентов к развитию музыкального слуха школьников: дис. ... канд. пед. наук. — М., 2002. — 185 с.

4. Городенский Н.Г. Динамика межполушарных отношений и мотивация целенаправленного поведения у детей старшего дошкольного возраста: дис. ... канд. биол. наук. — М., 2005. — 179 с.

5. Жаров М.А., Горницина М.И., Долинный С.В. Омегаметрия как метод диагностики и оценки компенсаторно-приспособительных реакций при роже // Современные наукоемкие технологии. — 2006. — № 2. — С. 91–93.

6. Жукова Т.П. Использование омегаметрии при обследовании беременных с эндемическим зобом // Физиология человека. — 2005. — Т. 31, № 4. — С. 88–91.

7. Ивахненко Г.А. Здоровье московских студентов: анализ самосохранительного поведения // Социологические исследования. — 2006. — № 5. — С. 78–81.

8. Илюхина В.А., Сычев А.Г., Щербакова Н.И. и др. Омега-потенциал — количественный показатель состояния структуры мозга и организма. Сообщение II. Возможности и ограничения использования омега-потенциала для экспресс-диагностики состояний организма человека // Физиология человека. — 1982. — Т. 8, № 5. — С. 721.

9. Кожухова А.А., Турок Т.А. Проблемы здоровья школьников // Мужское здоровье и долголетие: Сборник материалов 8-го российского научно-образовательного форума. Москва, 17–18 февраля 2010 г. — М., 2010. — С. 66.

10. Костомарова Л.Г. Остеопороз у подростков: факторы риска, подходы к профилактике / Информационное письмо (№ 18). Правительство Москвы. Комитет здравоохранения. Утв. И.А. Лешкевич. — М., 2000. — 13 с.

11. Малышев Ю.П., Заболотских И.Б. Омегаметрия в оценке эффективности и коррекции премедикации // Методические рекомендации № 98/ 244 РЦФХГ КГМА. — Краснодар, 1999. — 9 с.

12. Московченко О.Н. Комплексное исследование и коррекция адаптивных возможностей, здоровья индивида с помощью автоматизированной интегральной системы: автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Р-н-Д, 2003. — 34 с.

13. Назарова А.В. Рабочее приращение квазиустойчивого электрического потенциала головного мозга как показатель умственной работоспособности детей и подростков: дис. ... канд. биол. наук. — Кострома, 1999.

14. Нидерштрат Б.М. Способ определения умственной работоспособности человека // Патент РФ. 1995. № 2154405.

15. Орлов О.В. Клинические аспекты использования омега-потенциала в комплексном обследовании и лечении детей с бронхиальной астмой: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Л., 1988. — 16 с.

16. Подоплекин А.Н. Энергетическое состояние головного мозга у подростков-северян при употреблении психоактивных веществ: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Архангельск, 2009. — 18 с.

17. Разумов А.Н. Медико-социальные и экономические аспекты охраны здоровья здорового человека // Мужское здоровье и долголетие. Сборник материалов 8-го российского научно-образовательного форума, Москва, 17–18 февраля 2010 г. — М., 2010. — С. 85–86.

18. Рожнова К.С. Особенности энергетического обмена мозга у подростков с различным уровнем физической активности в покое

и при выполнении функциональных проб // Асимметрия. — 2010. — Т. 4, № 1. — С. 13–61.

19. Рожнова К.С. Употребление психоактивных веществ подростками с различным уровнем физической активности // Вопросы наркологии. — 2010. — № 4.

20. Сандомирский М.Е., Хамитов Г.Х. Индукция измененных состояний сознания (ИСС) с учетом юнговской типологии личности в психологической коррекции постстрессовых состояний // Психопедагогика в правоохранительных органах. — 1996. — № 2 (4). — С. 44.

21. Смышляева Е.А., Егорова С.В., Власова Т.В. и др. Принципы и задачи здоровьесберегающего образования школьников // Мужское здоровье и долголетие. Сборник материалов 8-го российского научно-образовательного форума. Москва, 17–18 февраля 2010 г. — М., 2010. — С. 96–97.

22. Сычев А.Г., Щербакова Н.И., Барышев Г.И. и др. Методика регистрации квазиустойчивой разности потенциалов с головы человека // Физиология человека. — 1980. — Т. 5, № 1. — С. 178.

23. Федоров А.И. Поведенческие факторы здоровья и физической активности подростков: гендерный аспект. Интернет-конфе-

ренция «Охрана здоровья: проблемы организации, управления и уровни ответственности». 16.04.07 — 15.06.07. <http://ecsocman.edu.ru/db/msg/307730.html>

24. Фокин В.Ф., Боровова А.И., Галкина Н.С., Пономарева Н.В., Шимко И.А. Стационарная и динамическая организация функциональной межполушарной асимметрии // Руководство по функциональной межполушарной асимметрии. — М.: Научный мир, 2009. — С. 389–428.

25. Черный В.И., Костенко В.С., Ермолаева Е.И., Абрамченко С.В., Стасюк В.Н., Беренфус В.Я. Омегаметрия. Некоторые аспекты применения в практике анестезиологии и интенсивной терапии (обоснование, оборудование, методика, интерпретация) // Аналитическая анестезиология и интенсивная терапия. — 2000. — № 2. — С. 14–17.

26. Чуприков А.П., Гурова Б.В., Власова Н.Ю., Краснова Н.Н. Распределение рукости и некоторых латеральных антропологических признаков среди практически здорового населения Москвы / Депонированная рукопись ВНИИМИ, 1979, д №2766-79 // Асимметрия. — 2010. — Т. 4, № 1. — С. 51–71.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗАВИСИМОСТИ

Т.М. РОЖНОВА

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Резюме. Впервые с помощью двух генетических методов — клинико-генеалогического и молекулярно-генетического — проведено комплексное исследование расстройства поведения, обозначенного термином «созависимость». Результаты проведенного исследования позволяют приблизиться к пониманию этиопатогенетических механизмов данной патологии и внести вклад в обоснование нозологической принадлежности аддиктивного расстройства в форме созависимости. Анализ результатов генетического исследования и данных научной литературы позволяет предложить следующую дефиницию деструктивного расстройства, определенного термином созависимость. Созависимость — это комплексное психосоматическое расстройство, включающее наследственную отягощенность алкоголизмом и наличие специфического генотипа, детерминирующего функционирование дофаминэргической системы головного мозга человека. Результаты проведенного исследования целесообразно использовать для скрининг-диагностики аддиктивных расстройств, определения индивидуальной предрасположенности к расстройствам поведения зависимого характера, а также в терапевтическом процессе и реабилитационно-профилактической работе.

Ключевые слова: молекулярная генетика, генеалогия, аддикция, алкоголизм, созависимость.

THE GENETIC FUNDAMENTALS OF CO-DEPENDENCY

T.M. ROZHNOVA

State Educational Institution of Higher Professional Education

«First Moscow I.M. Sechenov State Medical University», Moscow, Russia

Summary. A complex study of behavior disturbance designated as «co-dependency» has been for the first time conducted with the help of two genetic methods: clinico-genealogical and moleculogenetic. The results of the study allow to near the understanding of etiopathogenetic mechanisms of the given pathology and to contribute to the substantiation of the entity of the addictive disturbance in the form of co-dependency. The analysis of the genetic study results and scientific literature data enable to suggest the following definition of the destructive disturbance defined by the term co-dependency. Co-dependency is a complex psychosomatic disturbance including a genetic burden due to alcoholism and the presence of a specific genotype which determines the functioning of the dopaminergic system of the human brain. It is appropriate to use the results of the study for screening diagnosis of addictive disturbances, the determination of individual predisposition to behavior disturbances of the dependence character, as well as in the process of therapy, and in rehabilitation and prevention efforts.

Key words: molecular genetics, genealogy, addiction, alcoholism, co-dependency.

Данные для корреспонденции:

Рожнова Татьяна Михайловна, к. м. н., преподаватель кафедры наркологии,
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, г. Москва, ул. Барышиха, 40-1-355,
тел. +7 (916) 801-63-07, e-mail: stm-i@yandex.ru

Актуальность изучения расстройств поведения зависимого характера обусловлена увеличением частоты этой патологии и расширением спектра её проявлений [2, 13]. Психические и поведенческие нарушения, характеризующиеся доминантой зависимости, составляют наименее разработанную в теоретическом плане и резистентную к терапии группу. Типология нехимических зависимостей и сложность изучения этого вида расстройств обусловлена отсутствием теоретических основ их возникновения. Так называемые «социально приемлемые» аддикции: трудового, спортивные ад-

дикции, аддикции отношений (созависимость), шопинг-аддикции и др. — требуют специального изучения, так как именно эти варианты зависимостей выступают в качестве заместительных при формировании ремиссии у больных с химическими и тяжелыми нехимическими (например, гемблинг) формами зависимости [11]. Расстройство поведения, обозначенное термином созависимость, в настоящее время не имеет единой и точной дефиниции. В.Д. Москаленко «в качестве рабочего инструмента» предлагает следующее определение: «созависимый человек — это тот, кто полностью поглощен

тем, чтобы управлять поведением другого человека, и совершенно не заботится об удовлетворении собственных жизненно важных потребностей» [15]. В.Д. Менделевич считает, что «созависимостью можно назвать зависимость от зависимого и полный отказ от самого себя» [12]. В.В. Чирко с соавт. рассматривают феномен созависимости как особый вид реактивного психоза [21]. М. Beattie определяет это «нарушение» следующим образом: «созависимый — это человек, который позволил, чтобы поведение другого человека повлияло на него, и полностью поглощен тем, что контролирует действия этого человека (другой человек может быть ребенком, мужем, женой, родителем, другом, клиентом, бабушкой, дедушкой)» [24]. М.А. Сараев трактует это явление следующим образом: «созависимость — это комплекс психических и соматических расстройств, а также социальные последствия, возникающие у близких родственников (родители, жены/мужья, дети) вследствие длительного совместного проживания с членом семьи, страдающим каким-либо наркологическим заболеванием» [20]. Е. Young определяет созависимость как «плохое здоровье, нарушение адаптации и проблемы поведения, связанные с совместным проживанием с больным алкоголизмом» [44]. Обобщая представленные выше определения, можно сказать, что расстройство физического и психического уровней, регистрируемое у созависимых личностей, является следствием воздействия среды, характеризующейся наличием в ней лиц с аддиктивными расстройствами. Однако при изучении литературы по данной теме нами не найдено ни одного исследования, посвященного изучению генетических аспектов этого явления. При этом высокая степень наследуемости основных форм психических заболеваний (75–95%), включая расстройства аддиктивного характера, свидетельствует о существенном вкладе генетических факторов в их развитие [1]. Так, например, основные результаты изучения алкоголизма традиционными методами генетики (генеалогический, близнецовый, метод приемных детей и полусибсов) свидетельствуют о значительном вкладе генетических факторов в индивидуальную вариабельность по подверженности заболеванию [16, 29–32, 33, 34, 42, 43]. Всё шире используемый молекулярно-генетический метод исследования также свидетельствует о вовлеченности нейромедиаторных систем мозга, в частности, дофаминэргической, холинэргической, системы глутамат и др., в патогенетические механизмы психических расстройств различной нозологии, в том числе аддиктивных [1, 3–5, 6–10, 24–26, 37, 38]. Поскольку расстройства, определяемые как созависимость, изучаются преимущественно в контексте аддикций, чаще алкоголизма, то представляется неоправданным отсутствие исследований генетического характера этого явления, когда акцент изучения этого расстройства делается на условия среды. Вместе с тем, давно известен тот факт, что дихотомическое разделение факторов, значимых для формирования индивиду-

умов, в т. ч. их психического и соматического здоровья, на средовые и генетические является искусственным и упрощенным. Помимо двух названных выше главных составляющих фенотипической дисперсии существует несколько факторов, возникающих в результате взаимодействия среды и генов. Средовые влияния, переживаемые человеком, часто неслучайны, а, напротив, коррелируют с особенностями его генотипа или даже вызываются им. Если среда многообразна и общество предоставляет человеку возможность выбора, то каждый выбирает и получает среду, коррелирующую с его генетически обусловленной индивидуальностью.

При описании гено-средовых эффектов выделяют три разных типа явлений: генотип-средовые корреляции или ковариации, генотип-средовые взаимодействия и ассортативность.

Ассортативностью называется неслучайное заключение браков на основе сходства по любым факторам [17]. Изучение закономерностей ассортативного подбора супружеских пар составляет важную линию психогенетических исследований, поскольку ассортативность может изменять оценки наследуемости признаков, влияя на их вариабельность в популяции.

Генетическое значение ассортативности заключается в том, что при постоянной высокой в течение многих поколений гомогамии в популяции постепенно формируются субпопуляции, в пределах которых заключаются браки, которые внутри себя более однородны и менее схожи с другими субпопуляциями [14].

Феномен (фенотипической) ассортативности браков, под которым подразумевается отклонение от панмиксии (равновероятного вступления в брак) [35], в области психиатрии и наркологии рассматривается в контексте более частого совпадения диагнозов в супружеских парах, чем этого можно было бы ожидать, если исходить из частоты этих заболеваний в общей популяции. Это явление отмечено при изучении ряда психических заболеваний: алкоголизм, шизофрения, неврозы, аффективные нарушения, а также при изучении личностных черт [22, 23, 28, 36–38, 39].

При алкоголизме феномен (фенотипической) ассортативности браков близко соприкасается с феноменом созависимости, или сочетанной зависимости (co-dependency).

Необходимость типирования генетически контролируемых механизмов поведения чрезвычайно актуальна. Знание генетических факторов риска обеспечивает не только возможность выявления лиц, предрасположенных к аддиктивному поведению в форме алкоголизма и наркомании, но и выявление индивидуумов, предрасположенных к зависимому поведению в форме созависимости, что имеет большое значение в понимании законов и принципов формирования субпопуляции алкогольного поведения.

В связи с вышеперечисленным предпринято комплексное мультидисциплинарное исследование рас-

стройства поведения, обозначенного термином «созависимость».

Моделью феномена выбраны семьи больных алкоголизмом мужчин.

Цель данной работы заключается в поиске доказательств существования этиопатогенетического единства механизмов зависимого поведения путем изучения вовлеченности генов дофаминовой системы мозга человека в развитие алкогольной зависимости и созависимости, а также в решении задач повышения эффективности определения предрасположенности к алкоголизму и созависимости.

Молекулярно-генетическое исследование созависимости, выполненное в данной работе, проведено впервые. Также впервые при исследовании этой патологии применено сочетание двух методов генетического исследования: клинико-генеалогического и молекулярно-генетического. В доступной нам литературе нет сведений об аналогичном исследовании. Впервые ген DRD2 исследовался в качестве гена-кандидата в связи с формой отклонения поведения, именуемой созависимостью, а также на предмет установления возможной генетической детерминанты в ассортативности брака, в частности «алкогольного типа», лежащего в основе формирования субпопуляции аддиктивного поведения. Брак «алкогольного типа» или «алкогольная созависимая семья» характеризуется, в числе прочих особенностей, наличием в семье больного алкоголизмом и созависимого, а также дисфункциональностью внутрисемейных отношений [12, 19].

Материалом исследования послужили генеалогии 300 человек из 150 семей и образцы ДНК 270 человек из 135 семей обследованных групп (исследуемая, клинико-генеалогической нормы и популяции). Средний возраст обследованных был более 38 лет, в выборку включались не родственные семьи.

В работе использовались следующие **методы исследования**: клинико-психопатологический, клинико-генеалогический, молекулярно-генетический (ПЦР), статистический.

Основные результаты исследования

Клинико-генеалогические характеристики пробандов, больных алкоголизмом, свидетельствуют о высокой степени наследственной отягощенности родословных алкогольной зависимостью с преимущественным поражением родственников мужского пола (табл. 1). Среди родственников I степени родства 72,5% отцов пробандов больны алкоголизмом и 0,8% злоупотребляют алкоголем. Братья пробандов в 58,0% случаев страдают алкоголизмом и 4,2% их злоупотребляют алкоголем. По 1,7% отцов и сибсов пробандов абстинентны в отношении алкоголя, т.е. по разным причинам с момента рождения и на период исследования алкогольные напитки не употребляли. В итоге только 15,0% отцов и 36,2% сибсов мужского пола здоровы и употребляют

алкоголь умеренно, в социально допустимых количествах. Среди родственников I степени родства женского пола алкоголизм встречается достоверно реже ($p < 0,05$), чем среди родственников мужского пола этой степени родства: 4,2% матерей и 7,0% сестер пробандов больны алкоголизмом и 4,2% и 5,6% их соответственно злоупотребляют алкоголем. Соответственно здоровыми в отношении алкоголизма являются 90,0% матерей и 86,0% сестер пробандов. Таким образом, среди родственников I степени родства больных алкоголизмом мужчин, без учета половых различий, 40,7% имеют проблемы, связанные с чрезмерным употреблением алкоголя, 1,9% абстинентны и 57,4% здоровы в отношении изучаемой патологии.

Среди родственников пробандов II степени родства алкогольная зависимость встречается достоверно реже, чем среди родственников I степени родства: 19,9% страдают алкоголизмом, 3,8% злоупотребляют алкоголем, 0,9% абстинентны и 75,4% всех родственников этой степени родства без учета пола здоровы в отношении алкоголизма.

Таким образом, родословные больных алкоголизмом мужчин характеризуются преобладанием алкогольной зависимости среди родственников мужского пола, возрастанием количества больных в нисходящих поколениях и с увеличением степени родства, а также однотипностью распределения изучаемой патологии среди родственников по линии отца и по линии матери.

Генеалогическим характеристикам жен пробандов (табл. 1) свойственна высокая степень наследственной отягощенности алкогольной зависимостью, которая также преимущественно встречается среди лиц мужского пола: 66,7% отцов больны алкоголизмом, 9,25% их злоупотребляют алкоголем. Количество братьев, больных алкоголизмом, составляет 60,5%, а количество злоупотребляющих алкоголем — 3,1%. Здоровы в отношении изучаемой патологии на момент обследования 20,8% отцов и 35,6% сибсов мужского пола. Среди матерей жен пробандов алкоголизм (4,2%) и злоупотребление алкоголем (4,2%) встречаются с такой же частотой, как и у матерей пробандов. Среди сестер жен пробандов 6,1% больны алкоголизмом, 1,5% злоупотребляют алкоголем. Общее количество лиц с наличием проблем алкогольного характера среди родственников I степени родства супруг больных алкоголизмом мужчин без учета половых различий составляет 38,5%, абстинентами являются 1,6% и 59,9% здоровы в отношении алкоголизма.

Среди родственников II степени родства жен пробандов 20,3% обследованных лиц, без учета половых различий, больны алкоголизмом, 3,3% злоупотребляют алкоголем. Как и во всех исследованных группах, количество абстинентных в отношении алкоголя родственников невелико и соответствует 1,3%; количество лиц, употребляющих алкоголь умеренно, составляет 75,1% всех родственников этой степени родства.

Таблица 1

Формы потребления алкоголя среди родственников I степени родства пробандов-мужчин, больных алкоголизмом, и супруг пробандов

Вид родства	Зависимость от алкоголя среди родственников							
	пробанда				супруги пробанда			
	алк., %	злоупотребление, %	абстиненция, %	здоровы, %	алк., %	злоупотребление, %	абстиненция, %	здоровы, %
Отец	72,5	10,8	1,7	15,0	66,7	9,2	3,3	20,8
Мать	4,2	4,2	1,7	90,0	4,2	4,2	0,8	90,8
Братья	58,0	2,9	2,9	36,2	60,5	3,1	0,8	35,6
Сёстры	7,0	5,6	1,4	86,0	6,0	1,5	1,5	91,0

Таким образом, данные клинико-генеалогического исследования жен пробандов характеризуются преобладанием алкоголизма среди лиц мужского пола, увеличением числа больных алкоголизмом в нисходящих поколениях и с увеличением степени родства, а также наследственной отягощенностью алкогольной зависимостью родословных обоих родителей.

Сравнение родословных мужчин, больных алкоголизмом, и их жен, не злоупотребляющих алкоголем, но страдающих созависимостью, свидетельствует о том, что все изученные и описанные выше клинико-генеалогические характеристики обоих супругов отличаются однотипностью распределения алкогольной зависимости, не имеют статистически значимых отличий; характеризуются преобладанием изученной патологии среди лиц мужского пола, увеличением количества больных алкоголизмом обоюбого пола в нисходящих поколениях и с увеличением степени родства, а также наличием наследственной отягощенности алкоголизмом по обоим родительским линиям.

Семьи контрольной группы, в которых оба супруга не имели аддиктивных расстройств, отличались низкой частотой вторичного алкоголизма — 92,0% родственников I и II степеней родства супругов здоровы в отношении указанной патологии.

Данные, полученные в результате клинико-генеалогического исследования, свидетельствуют:

Во-первых, о гомотипии генеалогических характеристик обоих супругов как в семьях больных алкоголизмом мужчин, так и в семьях контрольной группы, где проблемы алкогольной зависимости отсутствуют. Под гомотипией в данном случае понимается тождественная частота вторичного алкоголизма и одинаковый характер (тип) распределения алкогольной зависимости в родословных обоих супругов.

Во-вторых, о том, что в семьях больных алкоголизмом мужчин и семьях контрольной группы выявлена **положительная ассортативность браков по генеалогическим характеристикам супругов** (в семьях исследуемой группы — высокая степень наследственной отягощенности родословных алкогольной зависимостью, в семьях контрольной группы — низкая).

В-третьих, результаты данной части исследования подтверждают мультифакториальный характер наследования алкоголизма, свидетельствующий о том, что для реализации наследственной предрасположенности заболевания (признака) у наименее поражаемого пола, которым при алкоголизме является женский, необходима большая степень наследственной отягощенности его родословной изучаемой патологией. В данном исследовании при наличии одинаковой степени и типа распределения (гомотипии) наследственной отягощенности алкогольной зависимостью родословных обоих супругов представители мужского пола исследуемой группы заболевают алкоголизмом, а у лиц женского пола алкогольная зависимость не регистрируется, но наблюдается расстройство поведения, именуемое термином созависимость. Таким образом, результаты клинико-генеалогического исследования свидетельствуют о том, что **созависимость составляет фенотипическую дисперсию наследственной отягощенности алкоголизмом**.

Поскольку генеалогические данные позволяют судить, хотя бы косвенно, о генотипических характеристиках, большой интерес представляет молекулярно-генетический анализ мужчин, больных алкоголизмом, и их жен, не злоупотребляющих алкоголем, но страдающих созависимостью. В связи с этим было проведено исследование полиморфизма гена DRD2 в локусе Taq IA в супружеских парах, состоящих из больных алкоголизмом мужчин и созависимых женщин, в группе супругов клинико-генеалогической нормы и семьях популяционной выборки (табл. 2).

Анализ частот генотипов в каждой из исследованных групп и сравнение их друг с другом выявили наличие значимых различий между выборкой из семей супругов больных алкоголизмом мужчин и нормативной группой. Частота генотипа A1/A2 у больных алкоголизмом (0,367) и их созависимых жен (0,433) достоверно выше, чем у супругов (по 0,100) нормативной группы ($p = 0,015$ для мужчин, достоверно при $p < 0,05$, и $p = 0,004$ для женщин, достоверно при $p < 0,01$). Сравнение результатов исследования полиморфизма гена DRD2 у супругов из семей изучаемой группы и популяционной выборки (муж. — 0,267, жен. — 0,253) показывает, что различия

Таблица 2

Частоты генотипов полиморфного маркера Taq I A гена DRD2 в группах супружеских пар из семей больных алкоголизмом мужчин, больных алкоголизмом женщин, нормативной выборки и в популяционной группе

Генотип	Мужчины-алк. (N = 60)		Норма (N = 60)		Популяция (N = 150)	
	Муж. (N = 30)	Жен. (N = 30)	Муж. (N = 30)	Жен. (N = 30)	Муж. (N = 75)	Жен. (N = 75)
	Количество наблюдений / частота встречаемости					
A1/A1	—	—	—	—	—	—
A1/A2	11/0,367	13/0,433	3/0,100	3/0,100	20/0,267	19/0,253
A2/A2	19/0,633	17/0,567	27/0,900	27/0,900	55/0,733	56/0,747

Примечание: N — объем выборки (человек).

не достигают степени статистической значимости ($p = 0,31$ у мужчин и $p = 0,07$ у женщин достоверно при $p < 0,05$), однако отмечается тенденция увеличения частоты генотипа A1/A2 локуса Taq I A гена DRD2 у лиц, страдающих алкоголизмом (0,367; 0,267) и особенно со-зависимостью (0,433; 0,253).

Таким образом, результаты оценки распределения частот генотипов гена DRD2 указывают на наличие связи между генотипом A1/A2 локуса Taq I A гена дофаминового рецептора (DRD2) с алкогольной зависимостью и созависимостью. Ассоциация гена DRD2 с созависимостью выявлена впервые.

*Полиморфизм гена DRD2 в локусе Tag IA супругов всех изученных групп свидетельствует о наличии **положительной ассортативности браков по изученным молекулярно-генетическим характеристикам.***

Полученные в результате статистического анализа данные об отсутствии неслучайных различий ($p = 0,59$) в частоте генотипов гена DRD2 у мужчин, больных алкоголизмом (0,367), и женщин, страдающих созависимостью (0,433), могут свидетельствовать о наличии единых этиопатогенетических механизмов аддиктивных расстройств, в частности алкоголизма и созависимости.

Полученные результаты подтверждают высказанную нами ранее гипотезу о единстве генотипических характеристик лиц, страдающих алкоголизмом и созависимостью, на основании клинико-генеалогических исследований [18], а также раскрывают определение созависимости, данное A. Schaef: «созависимость — это болезнь, имеющая множество форм и выражений и происходящая из основного процесса, который я называю процессом развития зависимости» [41], в той её части, которая указывает на общность процесса развития зависимости.

Результаты проведенного комплексного генетического исследования и анализ литературных данных позволяют внести вклад в обоснование нозологической принадлежности изученных расстройств зависимого поведения в форме алкоголизма и созависимости и предложить следующую дефиницию расстройства, обозначенного термином созависимость. **Созависимость** —

это комплексное психосоматическое расстройство, включающее наследственную отягощенность алкоголизмом и наличие специфического генотипа, детерминирующего функционирование дофаминэргической системы головного мозга человека.

Полученные данные указывают на необходимость дальнейших исследований, которые позволят расширить сведения о механизмах расстройств аддиктивного характера.

Результаты генетического анализа целесообразно использовать для скрининг-диагностики расстройств поведения зависимого характера, определения индивидуальной предрасположенности к возникновению указанной патологии и для выделения групп риска развития аддиктивных расстройств, а также в терапевтическом процессе и реабилитационно-профилактической работе, в том числе в рамках прегравидарной профилактики.

Список литературы

1. Аксенова М.Г. Полиморфизм маркеров генов дофаминовой системы мозга и ассоциация с психическими заболеваниями: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2001. — 23 с.
2. Александровский Ю.А. Предложения по внесению изменений в классификацию психических и поведенческих расстройств при подготовке МКБ-11: Материалы общероссийской конфер. «Реализация подпрограммы «Психические расстройства» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально-значимыми заболеваниями (2007–2011 гг.)». О классификации психических и поведенческих расстройств. — М., 2008. — С. 31–33.
3. Алфимова М.В., Ляшенко Г.Л., Голибмет В.Е. Генетический анализ неврологических симптомов в семьях больных шизофренией // Журн. невроп. и психиатр. — 2006. — № 1. — С. 49–52.
4. Анохина И.П., Иванец Н.Н., Шамакина И.Ю., Кибитов А.И., Воскобоева Е.Ю., Хуснутдинова Э.К. Современные проблемы зависимости от психоактивных веществ // Наркология. — 2004. — № 6. — С. 71–77.
5. Бочков Н.П., Асанов А.Ю., Аксенова М.Г., Новиков А.В., Демикован С. Генетические факторы в этиологии и патогенезе наркоманий (обзор литературы) // Наркология. — 2003. — № 1. — С. 7–14.
6. Галеева А.Р., Юрьев Е.Б., Валинурова И.Р., Хуснутдинова Э.К. Изучение полиморфизма гена D2-рецептора дофамина у мужчин разной этнической принадлежности с острым алкогольным психозом // Журн. невроп. и психиатр. — 2000. — № 7. — С. 37–40.

7. Галеева А.Р., Юрьев Е.Б., Хуснутдинова Э.К. Оценка VNTR-полиморфизма в гене переносчика дофамина у мужчин разной этнической принадлежности с острым алкогольным психозом // Журн. невроп. и психиатр. — 2001. — № 5. — С. 43–45.
8. Галеева А.Р., Юрьев Е.Б., Валинурова И.Р., Хуснутдинова Э.К. Анализ полиморфизма гена 2A рецептора серотонина у больных с острым алкогольным психозом разной этнической принадлежности // Журн. невроп. и психиатр. — 2002. — № 1. — С. 53–55.
9. Гарева А.Е. Исследование ассоциаций полиморфных вариантов генов переносчиков и рецепторов серотонина и дофамина с опийной наркоманией: дисс. ... канд. мед. наук. — Уфа, 2002. — 169 с.
10. Голибмет В.Е., Лебедева И.С., Гриценко И.К., Коровайцева Г.И., Алфимова М.В., Лежайко Т.В., Абрамова Л.И., Каледа В.Г., Эбштейн Р.П., Рогаев Е.И. Связь полиморфизма генов серотонинергической и дофаминергической систем с вызванными потенциалами (компонент Р300) у больных шизофренией и их родственников // Журн. невроп. и психиатр. — 2005. — № 10. — С. 35–41.
11. Егоров А.Ю., Петрова Н.Н. О месте нехимических зависимостей в новой классификации МКБ-11: Материалы общероссийской конфер. «Реализация подпрограммы «Психические расстройства» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально-значимыми заболеваниями (2007–2011 гг.)». О классификации психических и поведенческих расстройств. — М., 2008. — С. 42–43.
12. Менделевич В.Д. Наркозависимость и коморбидные расстройства поведения. — М.: МЕДпресс-информ, 2003. — 327 с.
13. Менделевич В.Д. Место аддиктивных расстройств в современной классификации: Мат. общероссийской конфер. «Реализация подпрограммы «Психические расстройства» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально-значимыми заболеваниями (2007–2011 гг.)». О классификации психических и поведенческих расстройств. — М., 2008. — С. 48–49.
14. Москаленко В.Д., Ванюков М.М. Алкоголизм и генетика / Под ред. чл.-корр. РАМН, проф. И.П. Анохиной, проф. Е.Т. Лильина. — М.: Медицина и здравоохранение, 1984. — 74 с.
15. Москаленко В.Д. Зависимость: семейная болезнь. — М.: Per Se, 2002. — 335 с.
16. Полтавец В.И. Наследственные и средовые факторы в возникновении алкоголизма: автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Днепропетровск, 1987. — 33 с.
17. Равич-Щербо И.В., Марютина Т.М., Григоренко Е.Л. Психогенетика / Под ред. И.В. Равич-Щербо. — М.: Аспент Пресс, 2002. — 447 с.
18. Рожнова Т.М. Исследование семьи больного алкоголизмом с позиций системного анализа. Часть I. Генотипические характеристики семьи больного алкоголизмом как системы // Новости науки и техн. Сер. Мед. Вып. Алкогольная болезнь; ВИНТИ. — 2003. — № 8. — С. 1–6.
19. Рожнова Т.М. Исследование семьи больного алкоголизмом с позиций системного анализа. Часть II. Фенотипические характеристики: структура семьи больного алкоголизмом // Новости науки и техн. Сер. Мед. Вып. Алкогольная болезнь; ВИНТИ. — 2003. — № 9. — С. 1–8.
20. Сараев М.А. Аутоагрессивное поведение женщин, мужа которых зависимы от опиатов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2009. — 21 с.
21. Чирко В.В., Демина М.В., Винникова М.А., Баринев М.А. Психопатологические проявления созависимости в клинике наркомании // Методические указания для врачей. — М., 2005. — 16 с.
22. Шайдукова Л.А. Алкоголизм супругов и стабильность семьи // Казанский мед. журнал. — 1993. — № 5. — С. 360–362.
23. Шайдукова Л.А. Зависимость — выбор и преодоление. — Казань: Центр инновационных технологий, 2005. — 216 с.
24. Beattie M. Codependent no more. Hazeiden [Пер. с англ.] Битти М. Алкоголик в семье, или Преодоление созависимости. — М.: Физкультура и спорт, 1997. — 331 с.
25. Bloom K., Noble E.P., Sheridan P.J., Montgomery A., Ritctie T., Jagadeeswaran P., Nogami H., Briggs A., Cohn J.B. Allelic association of human dopamine receptor gene in alcoholism // J. Am. Med. Assoc. — 1990. — Vol. 263. — P. 2055–2060.
26. Bloom K., Braverman E., Holder J. Reward deficiency syndrome: a biogenic model for diagnosis and treatment of impulsive, addictive and compulsive behaviors // J. Psychoactive Drags. — 2000. — Vol. 32. — P. 1–112.
27. Blum et al.; United States Patent; 5,550,021 August 27, 1996.
28. Eagles J.M., Walker L.G., Blackwood G.W. et al. The mental health of elderly couples. II. Concordance for psychiatric morbidity in spouses // Brit. J. Psychiatry. — 1987. — Vol. 150. — P. 303–308.
29. Goodwin D.W., Schulsinger F., Hermanser L. et al. Alcohol problem in adopted raised apart from alcoholic parents // Arch. gener. Psychiatry. — 1973. — Vol. 28. — P. 238–243.
30. Goodwin D.W., Schulsinger F., Moller N. et al. Drinking problems in adopted and non-adopted sons of alcoholics // Arch. gener. Psychiatry. — 1974. — Vol. 31. — P. 164–169.
31. Goodwin D.W., Schulsinger F., Knop J. et al. Alcoholism and depression in adopted-out daughters of alcoholics // Arch. gener. Psychiatry. — 1977. — Vol. 34. — P. 751–755.
32. Goodwin D.W., Schulsinger F., Knop J. et al. Psychopathology in adopted and non-adopted daughters of alcoholics // Arch. gener. Psychiatry. — 1977. — Vol. 34. — P. 1005–1009.
33. Hesselbrock V.M., Stabenau J.R., Hesselbrock M. et al. The nature of alcoholism in patients with different family histories for alcoholism // Progr. neuro-psychopharm. biol. Psychiat. — 1983. — Vol. 6. — P. 607–614.
34. Hrubec Z., Omenn G.S. Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: Twin concordances for alcoholism and its biological and points by zygoty among male veterans // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 1981. — Vol. 50. — P. 207–215.
35. Lenz W. Ленц В. Медицинская генетика: пер. с нем. — М.: Медицина, 1984. — 447 с.
36. Leonard K.E., Das Eiden R. Husband's and wif's drinking: unilateral or bilateral influences among newlyweds in a general population sample // J. Stud. Alcohol. Suppl. — 1999 Mar. — Vol. 13. — P. 130–138.
37. Merikangas K.R. Assortative mating for psychiatric disorders and psychological traits // Arch. gener. Psychiatry. — 1982. — Vol. 39. — P. 1173–1180.
38. Merikangas K.R. Divorce and assortative mating among depressed patients // Amer. J. Psychiatry. — 1984. — Vol. 141. — P. 74–76.
39. Negri F., Melica A.M., Zuliana R. et al. Genetic implications in assortative mating of affective disorders // Brit. J. Psychiatry. — 1982. — Vol. 138. — P. 236–239.
40. Noble E.P. Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review // Eur. Psychiatry. — 2000. — Vol. 15, N 2 — P. 79–89.
41. Schaefer A.W. Co-dependence: misunderstood-mistreated. — San Francisco: Harper & Row, Publishers, 1986. — 105 p.
42. Schuckit M.A. Alcoholic men with no alcoholic first-degree relatives // Amer. J. Psychiatry. — 1983. — Vol. 140. — P. 439–443.
43. Schuckit M.A., Goodwin D.W., Winokur G. A study of alcoholism in half-siblings // Amer. J. Psychiatry. — 1972. — Vol. 128. — P. 122–125.
44. Young E. Co-alcoholism as a disease: implications for psychotherapy // J. Psychoactive Drags. — 1987. — Vol. 19, N 3. — P. 257–268.

НОВЫЙ ЭКСПРЕСС-ТЕСТ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ ОЖГОВОЙ ТРАВМЕ

О.А. САНИНА, Т.А. ЯХНО, А.Г. САНИН

Учреждение Российской академии наук «Институт прикладной физики РАН»

Резюме. Разработан новый способ определения тяжести состояния больных и степени интоксикации при термической травме. Одним из важных звеньев развития синдрома эндогенной интоксикации является снижение агрегативной устойчивости биологических жидкостей, ведущее к нарушению их физиологических функций. Предлагаемый метод основан на регистрации динамики структуризации капли биожидкости в процессе высыхания на поверхности кварцевого сенсора. Исходные физико-химические параметры раствора влияют на динамику таких процессов как коацервация, преципитация, седиментация, гелеобразование и кристаллизация, сопровождающие процесс высыхания многокомпонентной жидкости. В результате меняются физические свойства капли, динамика которых может быть зарегистрирована. При одинаковых внешних условиях эта динамика определяется только составом и структурой жидкости. Если капля высыхает на поверхности сенсора, то динамика отвердевания капли может быть зарегистрирована и охарактеризована количественно.

Показано, что динамика фазовых переходов в капле сыворотки крови и мочи, зарегистрированная с помощью акустической импедансометрии, может служить информативным параметром для мониторинга больных ожоговой травмой в процессе лечения.

Ключевые слова: эндогенная интоксикация, биологические жидкости, высыхающая капля, динамика структуризации, новый метод диагностики.

NEW EXPRESS-TEST FOR EVALUATION OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN THERMAL INJURY

O.A. SANINA, T.A. YACHNO, A.G. SANIN

Institution of Russian Academy of Sciences "Institute of applied physics of Russian Sciences Academy"

Summary. A new method is proposed for evaluation of the severity of thermal injury and degree of intoxication syndrome in these patients. Aggregative instability of biological fluids plays the important role in endogenous intoxication development, and leads to pathological aggregates formation. The proposed method is based on recording the dynamics of the structurization of the drop of biological liquid while drying on the surface of the quartz sensor. Initial physical-chemical parameters of the solution influence the dynamics of such processes as precipitation, sedimentation, gelation, and crystallization, accompanying drying process of multicomponent liquid. As a result, physical properties of the drop exchange and their dynamics may be registered. In case of the same environment, this dynamics is determined only by content and structure of the liquid. If a drop is drying on the sensor's surface, its solidification can be registered and give quantitative analysis of the parameters. It was shown that dynamics of phase transitions in a drop of blood serum and urine were registered by means of the acoustical impedance could be the informative parameter for monitoring patients with burn injury during treatment.

Key words: endogenous intoxication, biological fluids, drying drop, dynamics of solidification, novel diagnostic method.

Данные для корреспонденции:

Яхно Татьяна Анатольевна, кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник Учреждения Российской академии наук «Институт прикладной физики РАН»,
603950, Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46 ГСП-120;
тел.: (831) 436-85-80; e-mail: tanya-yakhno@rambler.ru

Введение

Важными задачами клинической диагностики при ожоговой травме являются раннее определение степени тяжести ожоговой болезни, своевременное выявление пациентов с риском развития неблагоприятного течения заболевания, а также оценка эффективности прово-

димой терапии. Одним из основных критериев степени тяжести ожоговых больных является выраженность эндогенной интоксикации (ЭИ).

Синдром ЭИ является неспецифическим и одним из наиболее распространенных в клинической практике; он сопровождает многие заболевания различной

этиологии: сепсис, ожоговую и травматическую болезни, уремию, онкологические заболевания, хирургические заболевания, такие как панкреонекроз, острый панкреатит, перитонит и др. [11, 27].

Адекватная фармакологическая коррекция ЭИ в значительной степени зависит от своевременной лабораторной диагностики.

Современная медицина обладает достаточно широким набором лабораторных методов исследования ЭИ, которые включают в себя гематологические, биохимические, биофизические, микробиологические, иммунологические, методы биологического тестирования. Используются показатели не только крови, но и мочи [3, 4, 6, 23].

Ведущим лабораторным маркером ЭИ принято считать среднемолекулярные пептиды (СМП) [6, 7, 20]. Однако по мнению других авторов, определение СМП отражает в основном уровень токсемии, а не сам процесс эндогенной интоксикации [14]. Другими общепризнанными методами оценки ЭИ являются: определение ЦИК, креатинина, мочевины, общего белка, билирубина, холестерина, трансаминаз, СОЭ, а также определение продуктов ПОЛ и активности антиоксидантной системы (АОС), хемилюминесценция биологических жидкостей [1, 9, 15].

Для оценки степени тяжести ЭИ применяют различные расчетные критерии, такие как лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) [10], клинические и лабораторные индексы (Марчука, Шугаева, Габриэлян, Малаховой, Гринева и др.) [5, 16, 19].

Ряд авторов предлагают экспресс-методы диагностики ЭИ. А.А. Тогойбаев и соавт. предлагают использовать в качестве способа диагностики показатель сорбционной активности эритроцитов, основанный на способности эритроцитов поглощать красители под воздействием эндогенных токсинов [24]. Другой способ основан на подсчете кристаллических микротипов в предварительно высушенных образцах сыворотки крови [22]. Существует рефрактометрический способ диагностики ЭИ у детей [12].

Вместе с тем, исследователями было показано, что развитие практически любого патологического процесса в организме, включая психические расстройства, сопровождается изменениями конформации молекул альбумина, реагирующего даже на минимальные метаболические перестройки в организме, в том числе при развитии ЭИ [8, 25].

Изменения состояния молекул альбумина выявляют с помощью специальных флуоресцентных зондов, в частности используют зонд-35, который избирательно связывается с альбумином и изменяет свою светимость при изменении структуры молекулы альбумина. В настоящее время метод активно внедряется в клиническую практику [17]. Метод позволяет оценивать общую (ОКА) и эффективную концентрацию альбумина (ЭКА), характеризующую связывающую способность альбумина.

Снижение ЭКА свидетельствует о нагрузке альбумина метаболитами. По соотношению ЭКА и ОКА можно оценивать степень эндотоксикоза. В норме ЭКА совпадает с ОКА. При патологии эта величина существенно снижается, даже в тех случаях, когда общее количество альбумина находится в пределах нормы. Информативность данного метода в оценке ЭИ показана при различных патологических процессах в токсикологии, реаниматологии, хирургии, онкологии [26]. Это позволило исследователям заявить об открытии новой неспецифической реакции крови на патологический процесс [13].

С другой стороны, методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) установлено, что развитие самых разнообразных патологических процессов в организме отражается на характере комплексообразования компонентов сыворотки крови. Метод ЛКС позволяет осуществлять диагностику на основе анализа распределения коллоидных частиц по размерам в растворах биожидкостей [2].

Таким образом, развитие любого патологического процесса в организме находит отражение в закономерных неспецифических изменениях физико-химического статуса периферической крови. Одним из важных звеньев развития ЭИ, по нашему мнению, является снижение агрегативной устойчивости биологических жидкостей, ведущее к нарушению их физиологических функций.

Следует отметить, что большинство методик являются дорогостоящими и трудоемкими или, как правило, требуют наличия дополнительных реагентов.

Новый безреагентный метод, используемый нами в рамках данной работы, основан на выявлении изменения физико-химического состояния биологических жидкостей методом акустической импедансометрии их высыхающих капель (АМИ). Он технически прост, экономичен, отличается экспрессностью и объективностью благодаря получению количественных данных.

Целью работы являлось изучение возможностей метода в лабораторной практике для оценки степени ЭИ при ожоговой травме и в динамике ожоговой болезни. В задачи работы входило:

1. Сбор базы данных по морфологии и динамическим характеристикам высыхающих капель методом АМИ сыворотки крови и мочи у практически здоровых доноров и лиц с ожоговой травмой в разные сроки после начала лечения;
2. Анализ морфологических особенностей капель и формы кривых АМИ; выбор наиболее информативных параметров для отражения физико-химических изменений биологических жидкостей у пациентов с ожоговой травмой;
3. Проверка диагностической информативности выбранных показателей при анализе среднестатистических и мониторинге индивидуальных изменений качества биологических жидкостей в процессе лечения ожоговой болезни.

Описание метода

Капля жидкости объемом 3 мкл высыхает на полированной поверхности кварцевого резонатора, колеблющегося с принудительной частотой, равной резонансной частоте ненагруженного кварца (60 кГц). При этом в капле возникает сдвиговая волна, чрезвычайно чувствительная к возникновению и росту новой фазы на границе «жидкость–кварц». Регистрируется электрическая проводимость резонатора, нагруженного каплей. Сигнал автоматически пересчитывается в условные единицы, эквивалентные акустомеханическому импедансу (АМИ) капли, и результат динамики отражается на экране в виде кривой (рис. 1). Наши исследования показали, что форма кривой АМИ является паспортной характеристикой жидкости [28].

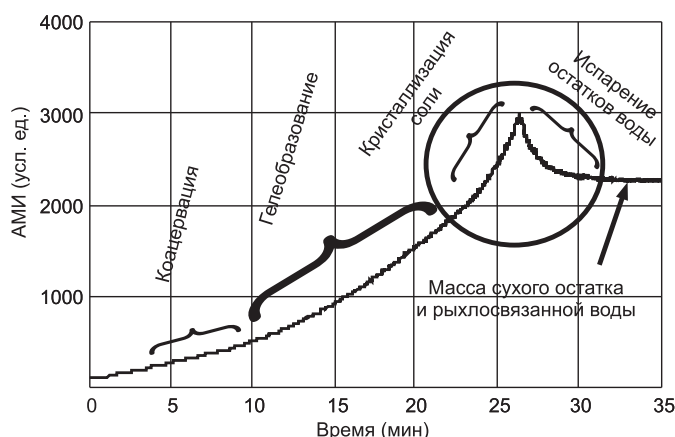


Рис. 1. Схематическое представление соответствия участков кривой АМИ процессам, происходящим в высыхающих каплях биологических жидкостей и модельных альбумино-солевых растворов. Кругом обозначен пик, связанный с кристаллизацией соли

Капля жидкости, высыхающая на твердой смачиваемой подложке, представляет собой естественную модель самоорганизующейся системы с бесконечно большим разнообразием вариантов динамики процессов молекулярной самосборки, в зависимости от состава и структуры жидкости. Исходные физико-химические параметры раствора влияют на динамику таких процессов как коацервация, преципитация, седиментация, гелеобразование и кристаллизация, сопровождающих процесс высыхания многокомпонентной жидкости. В результате изменяются физические свойства капли, динамика которых может быть зарегистрирована и оценена количественно. При одинаковых внешних условиях (включая подложку) эта динамика определяется только составом и структурой жидкости.

Каждому участку кривой соответствует определенный процесс в высыхающей капле (рис. 1). В работе [29] более подробно описана динамика кривой АМИ в соответствии с процессами в высыхающей капле.

Форма кривой может быть параметризована и представлена в виде числа на плоскости признаков в координатах специальных параметров — индексов формы (ИФ). Программное обеспечение автоматически производит расчет ИФ (рис. 2) и представляет результат статистических различий между сравниваемыми массивами данных в графической и числовой формах. Время расчета не превышает трех секунд. Подробное описание алгоритмов параметризации приведено в работе [32].

Материалы и методы

Объектами исследования служили сыворотка крови и моча. Всего было исследовано 74 человека, из них 17 — больные, находившиеся на лечении в ожоговом отделении ФГУ «ННИИТО» Нижнего Новгорода; 57 — контрольная группа. Среди обследованных были 23 женщины и 51 мужчина.

Основная группа (средний возраст $39,8 \pm 15$ лет) — больные с диагнозом ожоговой травмы разной степени тяжести. Наличие синдрома ЭИ, согласно литературным данным [1, 2, 30, 33], является неперенным звеном ожоговой болезни. Дополнительно критериями наличия ЭИ у исследуемых больных были следующие клиничко-лабораторные показатели: 1) гипоальбуминемия < 35 г/л; 2) лейкоцитоз $> 9 \times 10^9$ /л; 3) СОЭ > 15 мм/час.

Контрольная группа (средний возраст $35,4 \pm 9$ лет) — относительно здоровые доноры-добровольцы.

Все больные основной группы были разделены на две подгруппы: по срокам после получения травмы и по площади (S) ожога (табл. 1).

Было исследовано 70 образцов сыворотки крови и 22 образца мочи, из них сыворотка здоровых — 50 проб, сыворотка больных — 17 проб; моча здоровых — 7 проб, моча больных — 13 проб.

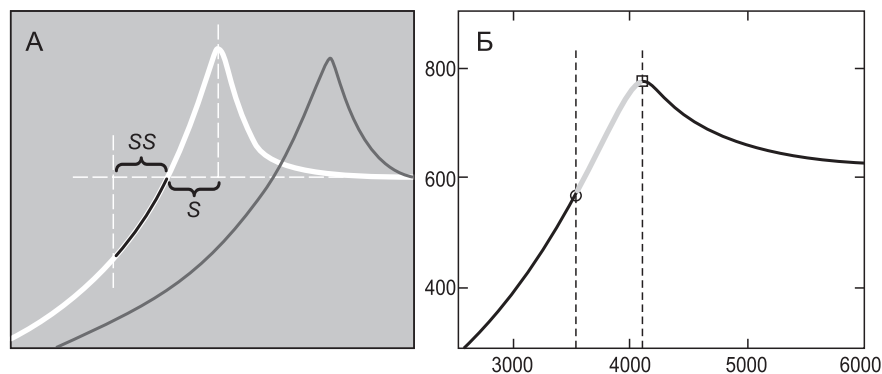


Рис. 2. Участки кривых, взятых за основу для расчета ИФ_1 (А) и ИФ_2 (Б). Отрезок S соответствует времени кристаллизации соли. Длина этого отрезка отложена влево (SS). ИФ_1 численно равен усредненной производной выделенного участка кривой АМИ. ИФ_2 численно равен усредненной производной участка кривой АМИ, соответствующего процессу кристаллизации соли

Таблица 1

Распределение больных основной группы

Подгруппа			
по срокам ожога		по площади ожога (S)	
Сутки после ожога	Количество проб	% поверхности тела	Количество проб
1–12	12	0,5–7	11
21–28	3	12–15	2
30–48	5	35–50	4

Работа проводилась без термостатирования при естественных колебаниях температуры, влажности и давления в условиях лаборатории. Объем капель составлял 3 мкл.

Кроме того, исследуемые жидкости наносили на предметные стекла (по 6–8 капель каждой пробы), высушивали при комнатной температуре в течение 2 суток, а затем исследовали под оптическим микроскопом обычным способом и в поляризованном свете. Полученные морфологические данные (фото капель) сопоставляли с результатами динамических характеристик капель, высохших на поверхности сенсора.

Результаты и обсуждение

Воспроизводимость методики проверена в повторных измерениях каждого образца исследуемой жидкости (по 2–3 капли). Принципиальных различий между повторностями внутри одной пробы не обнаружено.

При сравнении результатов измерений основной и контрольной групп (рис. 3) были получены достоверные различия ($p < 0,05$). При параметризации кривых АМИ использовали индексы формы ИФ_1 и ИФ_2. В соответствии со схемой, представленной на рисунке 1 и рисунке 2, ИФ_1 отражает особенности процессов гелеобразования и кристаллизации соли, а ИФ_2 — процесса кристаллизации соли. Это дает основание полагать, что у ожоговых больных и доноров процессы гелеобразования и кристаллизации протекают по-разному.

Это различие обусловлено тем, что развитие ЭИ приводит к снижению агрегативной устойчивости альбумина крови и его коацервации [31]. При высыхании капель сыворотки крови таких больных происходит пептизация коацерватных структур и образование гелеобразной гидрофобной массы коацервата, которая, располагаясь на поверхности ка-

пель, лимитирует испарение воды. Поэтому капли пациентов основной группы при прочих равных условиях сохнут дольше капель доноров.

Морфологические особенности капель основной и контрольной групп представлены на рисунке 4 и рисунке 5. На поверхности капель больных присутствуют структуры различной формы и размеров (коацерваты), которых нет в каплях доноров.

Для оценки физико-химических изменений сыворотки больных в процессе лечения все больные основной группы были разделены по срокам на 2 подгруппы: 5–12 суток ($n = 11$) и 13–48 суток ($n = 6$).

На рисунке 6 показано распределение результатов динамики АМИ высыхающих капель сыворотки по группам больных (суммарно) в зависимости от времени лечения, в координатах ИФ_1.

Все больные достоверно различаются с донорами ($p < 0,05$), но различия по срокам недостоверны. Вероятно, это связано с индивидуальными особенностями течения процесса выздоровления. Для проверки этого предположения были проанализированы показатели динамики у трех разных больных.

1. Больной Б. — ожог верхней конечности; (S) — 3%, II–III А ст.; сахарный диабет 2-го типа, ИБС; 6 и 20 суток после травмы.

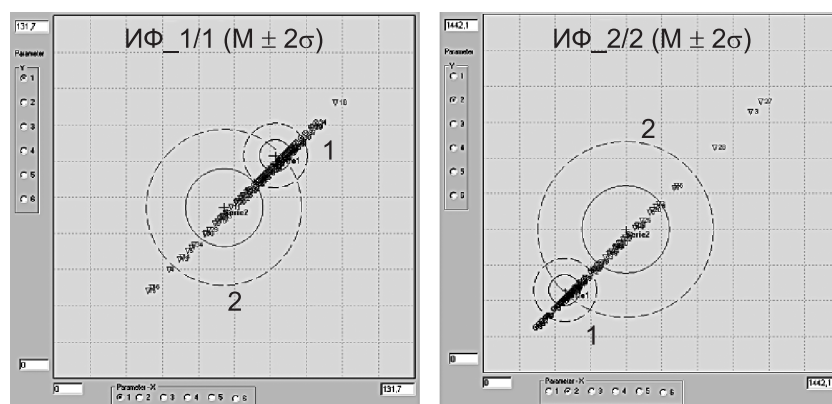


Рис. 3. Распределение данных по динамике АМИ высыхающих капель сыворотки крови доноров (1) и больных с ожоговой травмой (2) в координатах ИФ_1 и ИФ_2

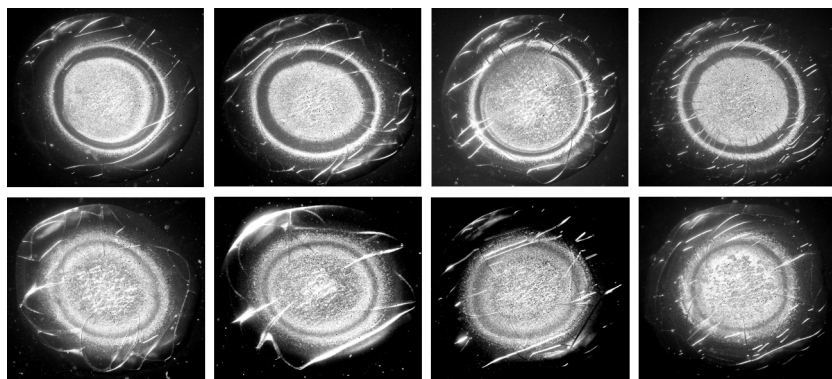


Рис. 4. Высыхшие капли сыворотки крови доноров. Фото под микроскопом. Ув. $\times 28$

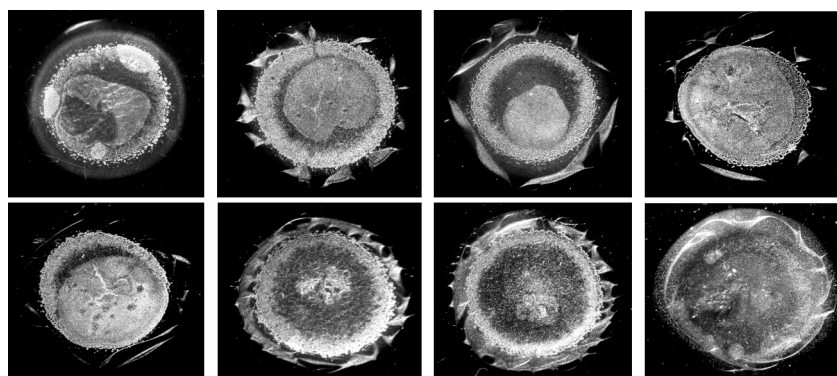


Рис. 5. Высохшие капли сыворотки крови ожоговых больных. Фото под микроскопом. Ув. $\times 28$

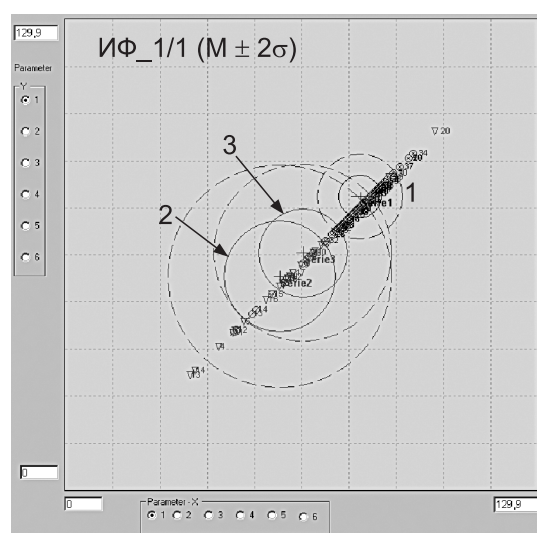


Рис. 6. Распределение результатов динамики АМИ высыхающих капель плазмы по группам больных (суммарно) в зависимости от времени лечения, в координатах ИФ_1: 1 — доноры; 2 — 5–12 суток после травмы; 3 — 12–48 суток после травмы

2. Больной В. — ожог ягодиц и нижней конечности; (S) — 30%, II–III АБ — IV ст.; 9 и 28 суток после травмы.

3. Больной С. — ожог нижней конечности; (S) — 15%, III АБ — IV ст.; гепатит С; 8 и 21 сутки после травмы.

В соответствии с рисунком 7, показатели больного Б. по данным ИФ_1 на 6-е сутки после ожоговой травмы достоверно отличались от показателей доноров ($p < 0,01$), а на 20-е сутки соответствовали им. По данным ИФ_2 достоверные отличия ($p < 0,05$) от показателей доноров наблюдали лишь на 20-е сутки заболевания.

У больного В. по данным ИФ_1 положительная динамика отсутствует, а по данным ИФ_2 к 28 суткам заболевания показатели еще более отдаляются от нормы.

По данным ИФ_1 и ИФ_2 показатели плазмы больного С. на 21 сутки после ожога достоверно более близки к норме, чем на 8 сутки после получения травмы, но еще не соответствуют ей.

Таким образом, динамика физико-химических показателей плазмы крови больных с ожоговой травмой в процессе лечения индивидуальна для каждого больного. Метод акустомеханической импедансометрии высыхающих капель дает возможность контролировать эту динамику.

Морфологические особенности высохших капель мочи как в норме, так и после ожоговой травмы были весьма разнообразны. Это наблюдалось как при обычной микроскопии, так и при микроскопии в поляризованном свете (рис. 8, 9).

Особенностью высохших капель образцов мочи больных было снижение количества двулучепреломляющих (кристаллических) структур, выявляемых по интенсивности свечения в поляризованном свете, примерно в половине исследованных проб.

Несмотря на то, что параметры кривых АМИ высыхающих капель мочи сильно различались между собой как в группе доноров, так и в группе больных с терми-

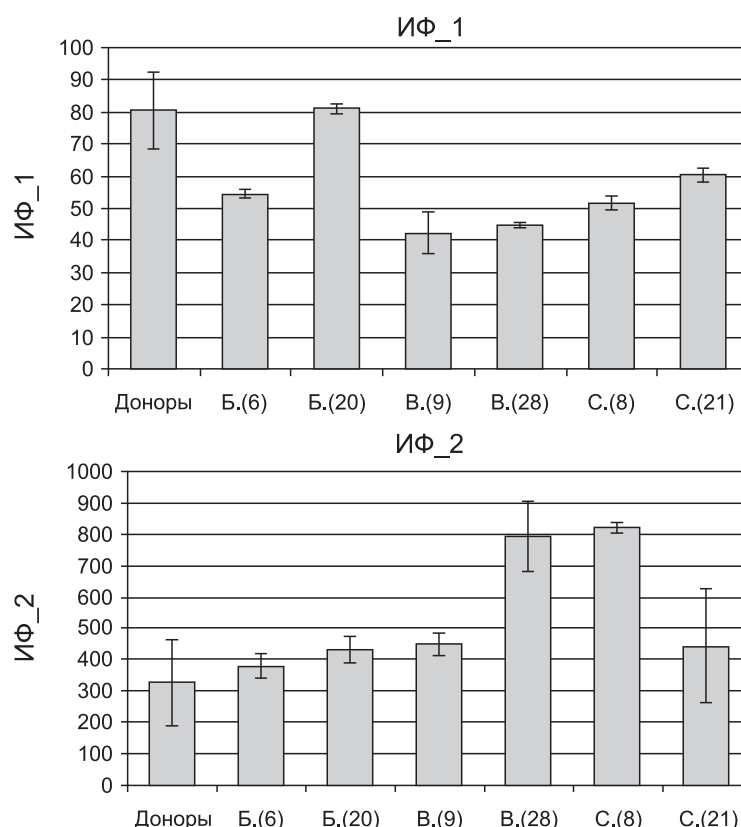


Рис. 7. Значения ИФ_1 и ИФ_2 по результатам динамики АМИ высыхающих капель сыворотки крови доноров и больных Б., В., С. в процессе лечения

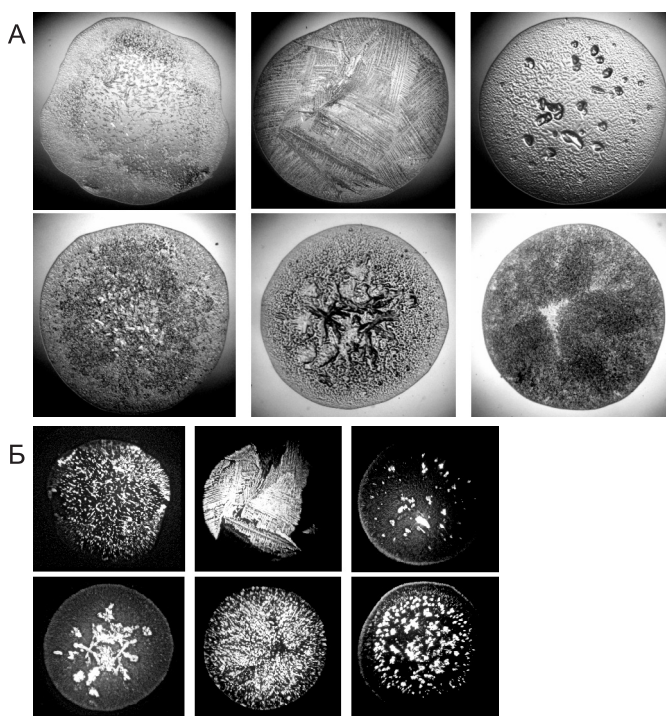


Рис. 8. Высохшие капли мочи доноров в обычном (А) и поляризованном (Б) свете. Ув. $\times 28$

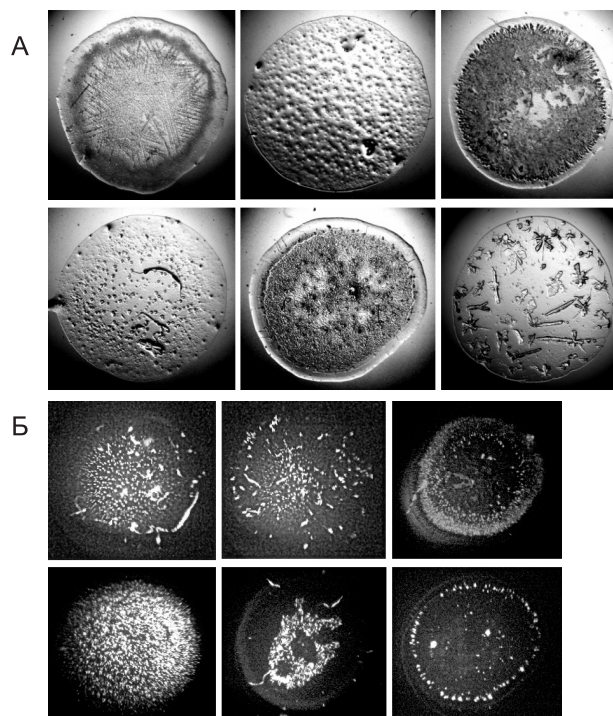


Рис. 9. Высохшие капли мочи больных с ожоговой травмой в обычном (А) и поляризованном (Б) свете. Ув. $\times 28$

ческой травмой, расчет ИФ_1 позволил достоверно разделить их на отдельные группы (рис. 10). Интересно отметить, что направленность изменений мочи по этому параметру соответствовала направленности изменений сыворотки крови у данных больных (рис. 3).

Для выявления изменений физико-химических параметров мочи в процессе лечения все образцы были разделены на 2 группы по срокам: 1–9 суток и 21–48 суток после получения ожоговой травмы. Результаты анализа представлены на рисунке 11. В процессе лечения больных ожоговой болезнью в физико-химических параметрах мочи пациентов, оцениваемых по ИФ_1, происходят сдвиги той же направленности, что и в сыворотке крови (рис. 10 и рис. 3).

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы.

1. У больных ожоговой болезнью с синдромом ЭИ изменяется физико-химическое состояние биологических жидкостей. Это проявляется в изменении характера кристаллизации высыхающих капель этих жидкостей, а также в динамических параметрах структуризации их капель, регистрируемых с помощью акустомеханической импедансометрии.
2. В ранние сроки после ожоговой травмы (6–9 сутки) отмечается

максимальное среднестатистическое отклонение расчетного параметра ИФ_1 высыхающих капель плазмы крови и мочи пациентов от соответствующих показателей доноров. В процессе лечения данный показатель постепенно приближается к норме (донорам). При этом в сыворотке крови и моче эти изменения однонаправлены. Динамика ИФ_1 у разных больных индивидуальна.

3. Высокая чувствительность предлагаемого метода позволяет проводить мониторинг морфофункционального состояния организма и допускает применение полученных диагностических показателей для оценки тяжести состояния при ожоговой травме. Соче-

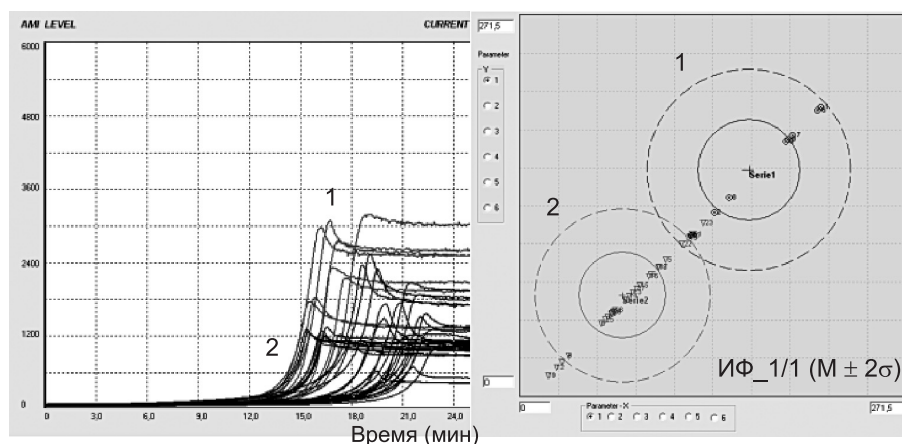


Рис. 10. Кривые АМИ (слева) и распределение данных на плоскости признаков в координатах ИФ_1 (справа) высыхающих капель мочи доноров (1) и больных с ожоговой травмой (2)

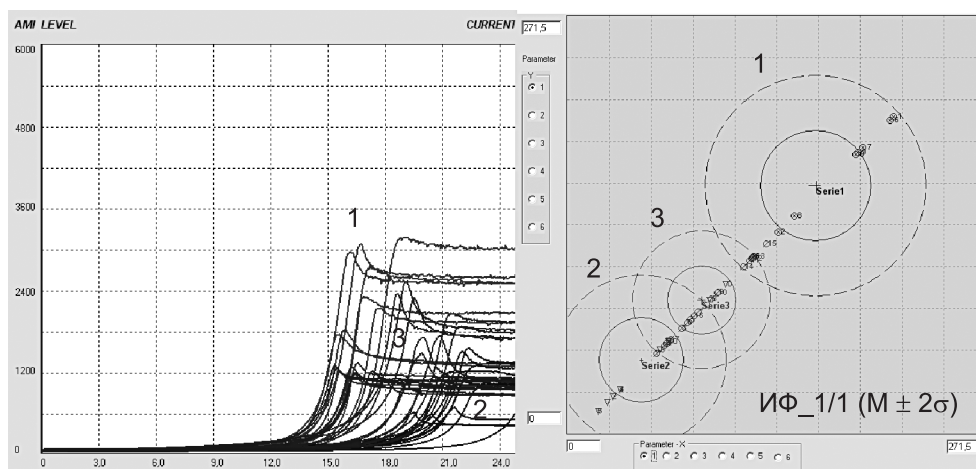


Рис. 11. Кривые АМИ (слева) и распределение данных на плоскости признаков в координатах ИФ_1 (справа) высушающих капель мочи доноров (1) и больных с ожоговой травмой: 2 — 1–9 сутки после травмы; 3 — 21–48 сутки после травмы

тание информативности и экспрессности предлагаемого метода позволяет использовать его показатели в клинической экспресс-диагностике, а также в оценке эффективности лечебных мероприятий.

4. Для разработки критериев оценки степени ЭИ методом АМИ необходимы дальнейшие поверочные исследования общепринятыми методами лабораторной и клинической экспертизы.

Авторы выражают благодарность профессору ФГУ «ННИИТО» Нижнего Новгорода С.П. Перетягину, к.м.н. А.К. Мартусевичу и м.н.с. А.А. Мартусевич за сотрудничество.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ 09-04097077p_поволжье-а «Агрегативная устойчивость биокolloидов в диагностике, механизме развития и лечении синдрома эндогенной интоксикации».

Список литературы

1. Андрейчин М.А., Бех М.Д., Демьяненко В.В. и др. Исследовательские приемы эндогенной интоксикации организма: Методические рекомендации МЗ Украины. — Киев, 1998. — С. 1–31.
2. Биленко А.А. Диагностические возможности лазерной корреляционной спектроскопии в клинической медицине // Вестн. проблем биологии и медицины. — 1997. — № 30. — С. 20–32.
3. Бурмистров С.О., Габелова К.А., Андреева А.А., Опарина Т.И., Арутюнян А.В. Значение определения средних молекул в моче при нормальной и осложненной беременности и у новорожденных с гипоксией // Клин. лаб. диаг. — 2001. — № 6. — С. 10–12.
4. Габриэлян Н.И., Дмитриев А.А., Кулаков Г.П. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях // Клин. мед. — 1981. — № 10. — С. 38–42.
5. Габриэлян Н.И., Дмитриев А.А., Севастьянова О.А., Кижяева Е.С. Средние молекулы и уровень эндогенной интоксикации у реанимационных больных // Анест. и реаниматол. — 1985. — № 1. — С. 36–38.
6. Габриэлян Н.И., Левицкий Э.Р., Дмитриев А.А. и др. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: Методические рекомендации. — М., 1985.
7. Громашевская Л.Л. «Средние молекулы» как один из показателей метаболической интоксикации в организме // Лабораторная диагностика. — 1997. — № 1. — С. 11–16.
8. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. — М.: ГЭОТАР, 1998.
9. Данилова Л.А. Справочник по лабораторным методам исследования. — СПб.: Питер, 2003. — 736 с.
10. Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении // Врачебное дело. — 1941. — № 1. — С. 31–33.
11. Карякина Е.В., Белова С.В. Особенности патогенетических механизмов эндогенной интоксикации у больных ревматоидным артритом // Научно-практическая ревматология. — 2001. — № 1.
12. Кузнецов Н.Н., Скопинов С.А., Вершинина Г.А., Аболина Т.Б. Рефрактометрический способ диагностики эндогенной интоксикации у детей. Патент РФ № 2158929 от 10.11.2000.
13. Лопухин Ю.М., Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А. Конформационные изменения молекулы альбумина: новый тип реакции на патологический процесс // Бюлл. эксп. биол. мед. — 2000. — Т. 130, № 7. — С. 4–9.
14. Матвеев С.Б., Давыдов Б.В., Тихомирова Н.И., Клычкова Е.В., Шахова О.Б. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 7. — С. 11–13.
15. Малахова М.Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации: Пособие для врачей. — СПб., 1995. — С. 33–50.
16. Малахова М.Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации: Пособие для врачей. — СПб., 1995. — С. 33–50.
17. Миллер Ю.И., Добрецов Г.Е. Молекулярные основы флуоресцентного метода определения связывающей емкости альбумина сыворотки крови // Клин. лаб. диагностика. — 1994. — № 5. — С. 20–23.
18. Николайчик В.В., Моин В.М., Кирковский В.В. и др. Способ определения «средних молекул» // Лаб. дело. — 1991. — № 10. — С. 13–15.
19. Николайчик В.В., Моин В.М., Кирковский В.В. Способ определения средних молекул // Лабораторное дело. — 1997. — № 2. — С. 13–18.
20. Пестряева Л.А., Юрченко Л.Н., Шипицына Е.А. и др. Лабораторная оценка тяжести аутоиммунного эндотоксикоза при беременности, осложненной гестозом // Клин. лаб. диагностика. — 2000. — № 10. — С. 7.

21. Рябинин В.Е., Палимов А.Г., Лифшиц Р.И. Влияние термической травмы и средне-молекулярных пептидов на хемолюминисценцию плазмы крови // *Вопр. мед. химии*. — 1988. — № 43, вып. 6. — С. 60–64.
22. Савина Л.В., Яковенко М.С. Способ экспресс-диагностики эндогенной интоксикации. Патент РФ № 2280865 от 27.12.2004.
23. Сафаров Р.М., Яненко Э.К., Никитинская Л.П., Голованов С.А., Дрожжева В.В. и др. Динамика уровня В2-микрोगлобулина, основных показателей перекисного окисления липидов, средних молекул в крови и моче у больных острым калькулезным пиелонефритом на фоне эндоваскулярной гелий-неоновой лазерной терапии // *Урология и нефрология*. — 1997. — № 1. — С. 11–13.
24. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В. и др. // *Лабораторное дело*. — 1988. — № 9. — С. 22–24.
25. Узбекиев М.Г., Смолина Н.В., Мисионжик Э.Ю., Молодецких А.В., Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А. Нарушение конформации связывающих центров сывороточного альбумина при шизофрении // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. — 2008. — № 5.
26. Хохлова Н.И., Пупышев А.Б., Толоконская Н.П., Лапцкая Е.А., Губарева Н.М. Показатели эффективной концентрации альбумина сыворотки крови в клинической оценке эндогенной интоксикации при острых вирусных гепатитах // *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2007. — № 8. — С. 35–39.
27. Чаленко В.В., Кутушев Ф.Х. Эндогенная интоксикация в хирургии // *Вестн. хир. им. И.И. Грекова*. — 1990. — № 4. — С. 3–8.
28. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Пелюшенко А.С., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. Феномен высыхающей капли и возможности его практического использования // *Нелинейный мир*. — 2007. — № 1–2. — С. 47–54.
29. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. Белок и соль: пространственно-временные события в высыхающей капле // *ЖТФ*. — 2004. — Т. 74, вып. 8. — С. 100–108.
30. Nathens A.B., Marshall J.C. Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name? // *World J. Surg.* — 1996. — Vol. 20, N 4. — P. 386–391.
31. Yakhno T. Protein phase instability developed in plasma of sick patients: clinical observations and model experiments // *Natural Science*. — 2010. — N 3. — P. 220–227. DOI: 10.4236/ns.2010.23034; also available: <http://www.scrip.org/journal/NS>
32. Yakhno T., Sanin A., Pelyushenko A., Kazakov V., Shaposhnikova O., Chernov A., Yakhno V., Vacca C., Falcone F., Johnson B. Uncoated quartz resonator as a universal biosensor // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2007. — Vol. 22, № 9–10. — P. 2127–2131.
33. Wang Y., Kimura K., Huang Q., Dubin P.L. Effects of salt on polyelectrolyte-micelle coacervation // *Macromolecules*. — 1999. — Vol. 32. — P. 7128–7134.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МЕТОД КЛИНОВИДНОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ФИЗИКИ

Ю.Ю. ТАРАСЕВИЧ, И.В. ВОДОЛАЗСКАЯ, О.П. ИСАКОВА

ГОУ ВПО «Астраханский государственный университет», г. Астрахань, Россия

Резюме. Дается описание основных физических процессов, протекающих при высыхании капель биологических жидкостей в диагностическом методе клиновидной дегидратации. Приводятся результаты численного расчета динамики формы капли биологической жидкости при ее высыхании на твердой горизонтальной поверхности, проведенные в рамках предложенной авторами модели, с учетом зависимости вязкости раствора и плотности потока пара над поверхностью капли от концентрации коллоидных частиц. Полученный в результате моделирования профиль высохшей капли сыворотки крови человека вполне соответствует экспериментальным наблюдениям.

Работа выполнена при поддержке РФФИ грант 09-08-97010-р_поволжье_a «Моделирование процессов переноса, фазовых переходов и самоорганизации в системах нано- и микрочастиц».

Ключевые слова: метод клиновидной дегидратации, математическое моделирование, процессы массопереноса, фазовый переход.

DIAGNOSTIC METHOD OF WEDGE-SHAPED DEHYDRATION OF BIOLOGICAL FLUIDS FROM POINT OF VIEW OF PHYSICAL PROCESSES

JU.JU. TARASEVICH, I.V. VODOLAZSKAYA, O.P. ISAKOVA

State Educational Institution of Higher Professional Education "Astrahan State University",
Astrahan, Russia

Summary. The main processes which take a place during desiccation of biological fluids at the time of wedge shaped dehydration are described. Results of the shape dynamics simulations for the drop drying on a horizontal solid substrate are presented. The computations are performed using the model proposed by the authors which takes into account concentration dependence of the viscosity and the evaporative mass flux. The results of the simulations of the final shape for the drops of aqueous solution of human serum albumin are in a reasonable agreement with the experiment.

The work is supported by Russian Foundation for Basic Research under grant 09-08-97010-r_povolzhie_a "Modeling of the transfer processes, phase transitions and self-organisation in the systems of nano- and microparticle".

Key words: wedge-shaped dehydration, mathematical modeling, mass transfer, phase transition.

Данные для корреспонденции:

Тарасевич Юрий Юрьевич, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой прикладной математики и информатики, Астраханский государственный университет, 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20а; тел. +7 (8512) 610-925, e-mail: tarasevich@aspu.ru

Структуры, образующиеся при высыхании биологических жидкостей, привлекли внимание исследователей по крайней мере полвека назад [3, 4, 8]. В последнее десятилетие структуры, наблюдаемые при высыхании капель биологических жидкостей, стали широко применяться в нашей стране для диагностики широкого круга заболеваний [14, 18], в частности, в методе клиновидной дегидратации. Метод основан на визуальном сопоставлении наблюдаемых образцов с эталонными. До сегодняшнего дня метод не подкреплен серьезным анализом изменений физико-химических свойств биологических жидкостей, связанных с развитием тех или иных заболеваний и определяющих формирование разнообразных структур. Предлагаемые некоторыми исследователями

объяснения процессов формирования структур при высыхании биологических жидкостей можно назвать умозрительными [13, 18, 19]. На основании имеющегося в настоящее время большого количества экспериментальных данных можно утверждать, что основные физические процессы, протекающие при высыхании биологических жидкостей и приводящие к формированию структур, типичны для коллоидов как органического, так и неорганического происхождения [15, 20]. Понимание основных механизмов этих процессов позволяет строить физически обоснованные математические модели высыхания капель биологических жидкостей. В частности, за последние годы удалось построить несколько моделей для описания процессов массопереноса



Рис. 1. Изменение формы капли биологической жидкости, высыхающей на твердом горизонтальном основании. Расчеты проведены с использованием нашей модели, описанной в работе [9]. Рисунки сильно растянуты по вертикальной оси для большей информативности. На последнем рисунке хорошо виден валик на краю высохшей капли

са внутри высыхающей капли биологической жидкости. Модели позволяют предсказать как пространственно-временную динамику веществ внутри капли, так и конечную форму капли [9–12, 16, 17]. Например, модель [9] позволяет объяснить формирование валика на периферии высыхающей капли биологической жидкости (рис. 1) без привлечения гипотезы о «борьбе осмотических и онкотических сил» [19].

Капля биологической жидкости высыхает на горизонтальной подложке при неизменной площади своего основания; по мере высыхания капли краевой угол уменьшается; внутри капли возникают горизонтальные течения, выносящие на край капли растворенные вещества и взвешенные частицы [2]. Появление внутри капли направленных к краю течений является универсальным явлением, находящем широкое применение, например, при производстве наноструктурированных поверхностей.

Потеря растворителя (воды) в результате его испарения приводит к увеличению концентрации коллоидных частиц (белка) и переходу биологической жидкости (золя) в твердоподобное состояние (гель). Затвердение обычно начинается с периферии, капля становится двухфазной, фазовый фронт золь–гель движется к центру капли. Потеря связанной воды гелем приводит к его растрескиванию. Было показано экспериментально, что характер растрескивания определяется двумя характерными временами — временем испарения и временем гелеобразования [7]. Если время гелеобразования много больше времени испарения, то формируется регулярный рисунок радиальных трещин, характерный для здорового человека. Если время гелеобразования и время испарения одного порядка, то формируется характерный для больных хаотический рисунок трещин. Если же время гелеобразования много меньше времени испарения, то формируется кольцевая трещина, типичная

для крайне тяжелых состояний больного. В связи с тем, что ионная сила биологической жидкости меняется крайне незначительно, время гелеобразования определяется как процентным содержанием белка в биологической жидкости, так и его способностью образовывать агрегаты. Поскольку основным белком в биологических жидкостях — альбумин, выполняющий транспортную функцию, понятно, что его способность к агрегации зависит от метаболических процессов.

Дальнейшая потеря воды гелем происходит преимущественно вблизи трещин. Возникающие в результате уменьшения объема геля механические напряжения приводят к отрыву от подложки краев участков геля (называемых в методе клиновидной дегидратации «отдельностями»); при этом центральная часть участков геля остается прикрепленной к подложке и выглядит более светлой (это пятно в методе клиновидной дегидратации называют «конкрецией» и ошибочно связывают с процессом накопления соли)¹. В образовавшемся между гелем и подложкой клиновидном воздушном зазоре может происходить интерференция света, что приводит к образованию колец Ньютона [6]. Наблюдаемые в некоторых случаях спиральные трещины также вполне физически объяснимы [5].

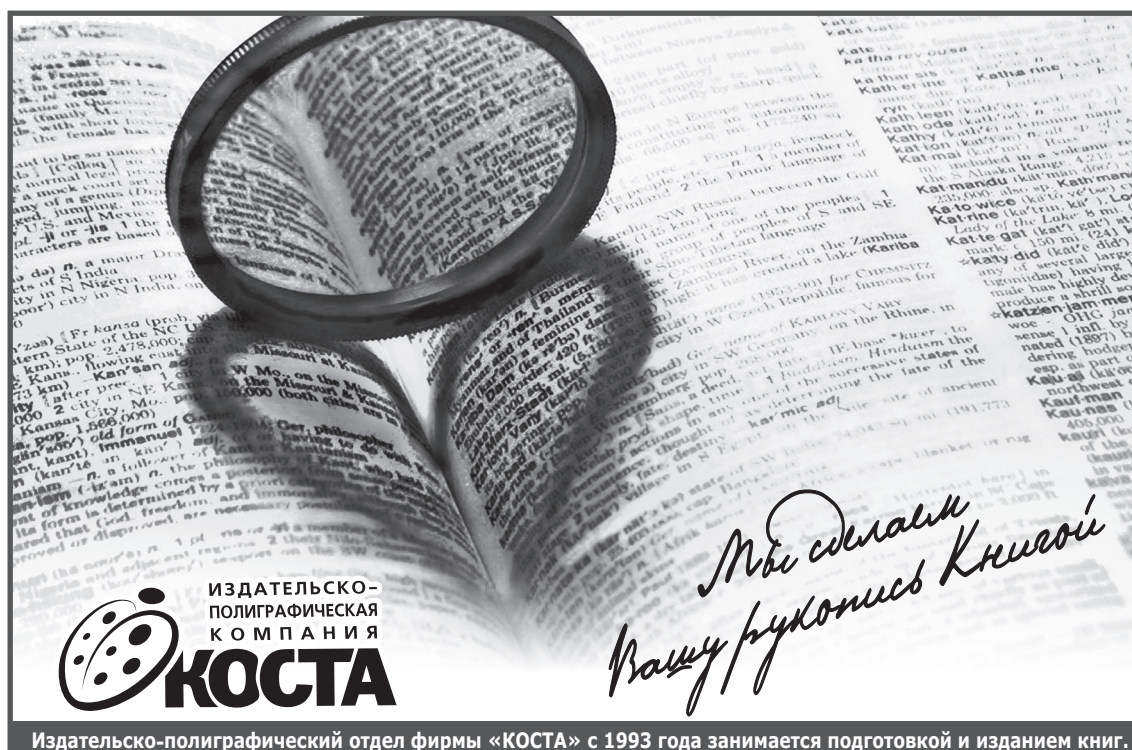
На сегодняшний день нет полной ясности лишь с мелкомасштабными структурами («морщины», «бляшки», «языки» и т. п.). Однако их сходство со структурами, наблюдаемыми при высыхании капель, содержащих взвешенные частицы, когда линия трехфазной границы время от времени перемещается к новому положению закрепления [1], позволяет предположить, что механизмы образования структур в обоих случаях одинаковы.

Литература

1. Deegan R.D. Pattern formation in drying drops // *Physical Review E*. — 2000. — Vol. 61, N 1. — P. 475–485.
2. Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F., Huber G., Nagel S.R., Witten T.A. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops // *Nature*. — 1997. — Vol. 389, N 6653. — P. 827–829.
3. Koch C. Feinbau und Entstehungsweise von Kristallstrukturen in getrockneten Tropfen hochmolekularsalzhaltiger Flüssigkeiten // *Colloid & Polymer Science*. — 1954. — Vol. 138. — P. 81–86.
4. Koch C. Über Austrocknungssprünge. // *Colloid & Polymer Science*. — 1956. — Vol. 145. — P. 7–14.
5. Nédá Z., Leung K.-T., Józsa L., Ravasz M. Spiral Cracks in Drying Precipitates // *Physical Review Letters*. — 2002. — Vol. 88, 095502.
6. Pauchard L. Patterns caused by buckle-driven delamination in desiccated colloidal gels // *Europhys. Lett.* — 2006. — Vol. 74 (1). — P. 188–194.
7. Pauchard L., Parisse F., Allain C. Influence of salt content on crack patterns formed through colloidal suspension desiccation // *Physical Review E*. — 1999. — Vol. 59, N 3. — P. 3737–3740.

¹ Аналогичное явление можно наблюдать при высыхании грязи: верхний слой грязи высыхает и растрескивается, края отдельных кусочков твердой грязи заворачиваются вверх, в то время как центральная часть остается закрепленной.

8. Sole A. Die rhythmischen Kristallisationen im Influenzstago-gramm // Colloid & Polymer Science. — 1954. — Vol. 137. — P. 15–19.
9. Tarasevich Yu.Yu., Isakova O.P., Vodolazskaya I.V. Desiccating colloidal sessile drop: dynamics of shape and concentration // Colloid & Polymer Science. — 2011. — Vol. 289, N 9. — P. 1015–1023.
10. Tarasevich Yu.Yu., Pravoslavnova D.M. Segregation in desiccated sessile drops of biological fluids // European Physical Journal E. — 2007. — Vol. 22(4). — P. 311–314.
11. Vodolazskaya I.V., Tarasevich Yu.Yu. The model of drying sessile drop of colloidal solution // Modern Physics Letters B (MPLB). — 2011. — Vol. 25, N 15. — P. 1303–1310.
12. Водолазская И.В., Тарасевич Ю.Ю., Исакова О.П. Моделирование эволюции фазового фронта в высыхающей на горизонтальной подложке капле коллоидного раствора // Нелинейный мир. — 2010. — Т. 8, № 3. — С. 142–150.
13. Рапис Е. Белок и жизнь (самосборка и симметрия наноструктур белка). — Иерусалим: Филобиблион, М.: ЗЛ. Милта-ПКП ГИТ, 2002.
14. Савина Л.В. Кристаллоскопические структуры сыворотки крови здорового и больного человека. — Краснодар: Советская Кубань, 1999.
15. Тарасевич Ю.Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей // Успехи физических наук. — 2004. — Т. 174, № 7. — С. 779–790.
16. Тарасевич Ю.Ю., Исакова О.П., Кондухов В.В., Савицкая А.В. Влияние режима испарения на пространственное перераспределение компонентов в испаряющейся капле жидкости на твердой горизонтальной подложке // Журнал технической физики. — 2010. — Т. 80, № 5. — С. 45–53.
17. Тарасевич Ю.Ю., Православнова Д.М. Качественный анализ закономерностей высыхания капли многокомпонентного раствора на твердой подложке // Журнал технической физики. — 2007. — Т. 77, № 2. — С. 17–21.
18. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. — М.: Хризостом, 2001.
19. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Принципы аутоволновой самоорганизации биологических жидкостей // Вестник РАМН. — 2000. — № 3. — С. 45–49.
20. Яхно Т.А., Яхно В.Г. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей // Журнал технической физики. — 2009. — Т. 79, № 8. — С. 133–141.



ИЗДАТЕЛЬСКО-ПОЛИГРАФИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ **КОСТА**

Мы сделаем Вашу рукопись Книгой

Издательско-полиграфический отдел фирмы «КОСТА» с 1993 года занимается подготовкой и изданием книг.

За эти годы мы приобрели большой опыт подготовки специальной, и в частности, медицинской литературы. Среди подготовленных нами книг — работы в области кардиологии, неврологии, хирургии, генетики и других областях медицины.

Мы будем рады помочь Вам подготовить к печати юбилейный сборник, монографию, брошюру, методические рекомендации, автореферат.

Собственная полиграфическая база позволяет оперативно отпечатать любую полиграфическую продукцию. Кроме того, наши дизайнеры разработают для Вас визитки, наклейки, рекламные листовки, обложки книг. Не тратьте драгоценное время Ваших специалистов — приходите к нам.

Сделать Вашу рукопись книгой — наша специальность.

**Издательско-полиграфическая компания «КОСТА»
(812) 445-10-02 www.kostaprint.ru**

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ У ЛЮДЕЙ, ПОДВЕРГШИХСЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОМУ ОБЛУЧЕНИЮ: РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ

В.И. ТЕЛЬНОВ, З.Б. ТОКАРСКАЯ

Южно-Уральский институт биофизики, г. Озерск, Россия

Резюме. В работе подведены итоги многолетнего изучения широкого комплекса биохимических и молекулярно-генетических показателей у работников широкопрофильного предприятия атомной промышленности ПО «Маяк» и их потомков. Представлены данные об информативности отдельных биохимических тестов в радиационной медицине. Рассмотрены особенности биохимических и молекулярно-генетических сдвигов при различных видах и уровнях радиационного воздействия, а также вклад радиационных и нерадикационных факторов в обменные нарушения у облученных людей. Рекомендована схема применения наиболее эффективных биохимических исследований при выявлении ближайших и отдаленных эффектов облучения. На основании собственных и литературных данных оценена генетическая предрасположенность людей к детерминированным и стохастическим эффектам облучения. У работников атомного предприятия выявлено учащение мутаций NO типа в гене гликофорина А при внешнем гамма-облучении в дозе более 200 сГр и аномальное метилирование в генах p16, MGMT, RASSF1A, а также повышение частоты множественного аномального метилирования (в 3 и более генах одновременно) в тканях аденокарциномы легкого при поглощенной дозе на легкое от плутония-239 более 15 сГр. У потомков 1-го поколения работников ПО «Маяк», родители которых получили прекоцептивные дозы гамма-облучения более 200 сГр, установлено повышение средней приспособленности и снижение среднего коэффициента отбора по генетической системе гаптоглобина (Hp) за счет достоверного повышения частоты генотипа Hp 2-2. Не обнаружено достоверного учащения частоты мутаций в минисателлитной ДНК половых клеток работников.

Ключевые слова: работники атомной промышленности, потомки, внешнее и внутреннее облучение, биохимические и молекулярно-генетические эффекты, генетическая предрасположенность, детерминированные и стохастические эффекты, радиационный мутагенез, аномальное метилирование, селективный отбор.

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR-GENETIC INVESTIGATION IN PEOPLE EXPOSED TO IONIZING RADIATION: RETROSPECTIVE ANALYSIS

V.I. TELNOV, Z.B. TOKARSKAYA

South-Ural Institute of Biophysics, Ozersk, Russia

Summary. The work sums up results of long study of a wide range of complex of biochemical and molecular-genetic indicators in workers of nuclear enterprise Mayak PA and their offsprings. Results concerning the informativity of certain biochemical tests in radiation medicine are presented. Characteristics of biochemical and molecular-genetic shifts at different types and levels of radiation impact as well as contribution of radiation and non-radiation factors in metabolic disorders in exposed people are analyzed. Application pattern for the most effective biochemical analyses for recent and late exposure effects is recommended. Genetic susceptibility of humans to deterministic and stochastic effects of exposure was estimated based on own and literature data. Nuclear workers demonstrated more frequent mutations of NO type in glycophorin A gene at external gamma-radiation, dose over 200 cGy, and abnormal methylation in genes p16, MGMT, RASSF1A, as well as increase of multiple abnormal methylation (in 3 and more genes simultaneously) in lung adenocarcinoma tissues at lung accumulated dose from Pu-239 more than 15 cGy. Offsprings of the 1st generation of Mayak workers, whose parents obtained preconception gamma doses greater than 200 cGy, revealed increase of average adaptation and decrease of average selection coefficient by haptoglobin (Hp) genetic system due to significant increase of Hp 2-2 genotype frequency. Significant increase of mutation frequency was not found in minisatellite DNA of workers germ cells.

Key words: nuclear workers, offsprings, internal and external exposure, biochemical and molecular-genetic effects, genetic susceptibility, deterministic and stochastic effects, radiation mutagenesis, abnormal methylation, selection, expected lifespan.

Данные для корреспонденции:

Тельнов Виталий Иванович, к. м. н., с. н. с., заместитель директора по научной работе,
Южно-Уральский институт биофизики, 456780, г. Озерск Челябинской области, Озерское шоссе, 19;
тел.: (35-130) 7-54-06, 7-58-52, e-mail: telvit@rambler.ru

Одной из важнейших тенденций развития клинической медицины в последние десятилетия явилось широкое использование инструментальных и лабораторных методов исследования. Среди последних интенсивно развиваются биохимические и молекулярно-генетические методы, что обусловлено большими достижениями в этих областях знаний.

Отмеченная тенденция не могла не коснуться радиационной медицины, в которой вообще с момента ее возникновения широко применялись научные разработки. Кроме того, низкие уровни ионизирующей радиации, ставшие обычными после 50-х годов прошлого века для большинства работников ПО «Маяк», не вызывали в организме изменений, выявляемых общеклиническими и гематологическими методами, что приводило к необходимости использования функциональных, в том числе биохимических тестов.

Биохимические исследования, разнообразие и сложность которых увеличивались с течением времени, проводились у лиц, госпитализированных для обследования и лечения профессиональной патологии, для проведения регулярных профилактических осмотров, а также для диагностики и лечения ряда соматических заболеваний. Кроме этого, биохимические исследования проводились и в ходе выездных осмотров на здравпунктах. Помимо работников основных производств ПО «Маяк» обследовались также лица, не подвергавшиеся профессиональному радиационному воздействию, в качестве контрольного контингента.

Были проанализированы результаты биохимического обследования 1914 работников различных производств: атомных реакторов, уранового радиохимического завода, завода по переработке и получению плутония, производства радиоизотопов и источников ионизирующих излучений, у которых было проведено 5000 биохимических исследований, и 990 человек контрольной группы (1120 исследований). В ходе этой работы использовалось 48 различных биохимических тестов.

Полученные результаты свидетельствовали о следующем:

Ряд традиционных тестов клинической биохимии (определение общего белка сыворотки крови, билирубина, эфиров холестерина, пробы Квика и т.д.) не выявили отклонений от нормы у лиц, подвергавшихся радиационному воздействию в широком диапазоне доз (от менее предельно допустимых до превышающих их в десятки раз). Эти тесты для применения в области радиационной медицины оказались непригодными.

При использовании относительно более тонких биохимических методов (электрофоретического разделения белков, определения гликопротеинов, ферментов, изоферментов, гормонов) сдвиги обнаруживались не только при дозах, приводящих к развитию хронической лучевой болезни, но и при воздействии более низких уровней радиации, близких к предельно допустимым. Но наблюдаемые отклонения были обычно невелики и

не достигали значений, наблюдаемых при выраженных формах соматических заболеваний. Как правило, они выявлялись при групповом анализе. В частности, при исследовании белковых фракций и гликопротеинов сыворотки крови у лиц с плутониевым пневмосклерозом были выявлены изменения, свидетельствовавшие о наличии слабой воспалительной реакции (в более раннем периоде заболевания) и развитии фибропластической реакции (в более позднем периоде). Эти сдвиги обнаружили дозовую зависимость и имели разную динамику в случае контакта с растворимыми и нерастворимыми соединениями плутония [1, 2].

Важное значение имело исследование органоспецифических ферментов и изоферментов. Обладая высокой чувствительностью, эти тесты свидетельствовали о незначительных изменениях обмена и функционирования отдельных органов, в том числе критических. Так, изоферментное исследование сывороточной щелочной фосфатазы (ЩФ) дало возможность выделять костный, печеночный нормальный, печеночный патологический и кишечный изоферменты, а также изофермент Регана (канцероэмбриональный антиген). Было показано, что у носителей плутония и америция учащается выявление костного изофермента, что свидетельствует об усилении костной пролиферативной реакции даже в случае невысокой инкорпорации актинидов. При наиболее высоких уровнях инкорпорации костная ЩФ в крови не определялась, что могло свидетельствовать уже о торможении остеогенеза и развитии атрофического процесса. То есть в данном случае радиационное воздействие выступает как раздражающий фактор, приводящий к активации стволового пула ткани костнообразующих клеток [28].

При многолетнем динамическом наблюдении за работниками ПО «Маяк» отмечались изменения характера и выраженности биохимических сдвигов, а именно, уменьшение отклонений, вызванных воздействием в прошлом высоких доз внешнего γ -облучения, и возрастание изменений, обусловленных инкорпорацией плутония. У лиц, являющихся носителями плутония и америция, отмечена следующая зависимость ферментных сдвигов от дозы: небольшой эффект обнаруживался при уровнях ниже предельно допустимых, был умеренно выраженным при 5–10-кратном превышении их и приобретал патологическое значение при более чем 10–15-кратном превышении допустимых уровней [26, 28].

Эти данные, свидетельствующие о возможности выявления с помощью клинико-биохимических тестов реакций организма физиологического характера при воздействии ионизирующей радиации в дозах, близких к предельно допустимым, соответствуют представлению о практической безопасности этого уровня доз по критерию ближайших патологических эффектов соматического характера.

Что касается печеночного нормального изофермента ЩФ в сыворотке крови, то у большинства носителей

плутония отмечалось его небольшое увеличение. Это могло быть отражением увеличения синтеза данного изофермента в гепатоцитах. Моментами, провоцирующими синтез печеночной ЩФ, являются интоксикация, гипоксия, дегенеративно-деструктивные процессы в печеночной паренхиме. Кроме нормальной печеночной ЩФ при высокой инкорпорации радионуклидов было отмечено появление печеночной патологической ЩФ. Появление этого печеночного изофермента отражает деструкцию гепатоцитов и проникновение в кровяное русло фрагментов их мембран [28].

Для профессиональных контингентов, имеющих контакт с плутонием и америцием, в плане наблюдения за состоянием критических органов наиболее эффективными биохимическими исследованиями следует считать определение изоферментного состава сывороточной щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы, а также активности трансаминаз [23, 24, 26–28].

Кроме специфических задач выявления эффектов хронического и острого радиационного воздействия, биохимические исследования необходимы также для диагностики у профессиональных контингентов распространенных соматических болезней (атеросклероза, диабета, онкологических заболеваний и т. д.). Особенно важно их использование в плане биохимического скрининга, рекомендуемого ВОЗ для выявления этих заболеваний.

Итак, в ходе проведенных исследований были выявлены биохимические тесты, которые можно было использовать для оценки воздействия различных видов ионизирующей радиации. При диагностическом процессе биохимические показатели должны использоваться в ряду других клинических симптомов. Кроме того, при использовании биохимических тестов необходимо учитывать их зависимость от ряда биологических, бытовых и наследственных факторов. Поэтому более точная оценка значения биохимических сдвигов в развитии радиационных эффектов могла быть получена при проведении многофакторного анализа, при котором кроме радиационных учитывались и нерадиационные факторы. Так, многофакторный анализ изменений липидного и углеводного обмена показал, что основной вклад в их развитие у работников ПО «Маяк» вносят не радиационные факторы, а избыточная масса тела, несбалансированное питание и другие [4, 18]. При этом у больных с ишемической болезнью сердца были установлены существенные сдвиги липидных показателей по сравнению с контролем в пределах их нормальных значений, а также показана низкая прогностическая информативность определения уровней липидов [19, 25].

Известно, что увеличение энтропии сывороточных белков является показателем патологических состояний или возрастных изменений, что дало основание трактовать ее повышение у облученных людей как признак ускорения инволюционных процессов. Полученные в последнее время результаты свидетельствуют о том, что

при увеличении энтропии белков с возрастом и с суммарной дозой гамма-облучения характер лежащих в его основе белковых сдвигов в том и в другом случаях различается. В отличие от исследователей, обнаруживших связанное с облучением повышение уровня некоторых классов иммуноглобулинов у японцев, переживших атомную бомбардировку, у обследованного контингента работников не было выявлено зависимости уровня иммуноглобулинов от радиационного воздействия [7]. Подобные различия, по-видимому, объясняются многими факторами, в том числе этническими, климатическими, особенностями антигенной стимуляции и другими. Вместе с тем, важно отметить, что ни у работников предприятия атомной промышленности, ни у японцев, переживших атомную бомбардировку, в отдаленные сроки после облучения не отмечено снижения уровня иммуноглобулинов.

Одним из ведущих показателей печеночной недостаточности является снижение белково-синтетической функции (БСФ) гепатоцитов. Своевременное выявление и предупреждение нарушений функции печени у людей, подвергшихся в условиях производства действию гепатотоксичных агентов, представляет важную задачу профессиональной медицины и гигиены труда. В полной мере это относится и к случаям воздействия на печень гепатотропных радионуклидов, в частности плутония-239. Полученные данные свидетельствуют о большей информативности определения преальбумина по сравнению с традиционными тестами (альбумин и холинэстераза сыворотки крови) для оценки состояния БСФ печени при инкорпорации плутония-239 [8] и с учетом результатов предшествующего сравнительного клинко-биохимического исследования при различной патологии печени [13] позволяют рекомендовать данный тест в практику динамического наблюдения за лицами, контактирующими с гепатотропными радионуклидами и другими гепатотоксичными агентами.

При изучении у работников ПО «Маяк» состояния пуринового обмена (уровни мочевой кислоты (МК) и распространенность гиперурикемии) была выявлена положительная связь показателей пуринового обмена с суммарной дозой внешнего гамма-облучения и комплексом нерадиационных факторов. При этом влияние нерадиационных факторов на исследованные параметры было существенно больше, чем внешнего облучения [14].

При оценке уровня гормонов щитовидной железы у работников, подвергшихся хроническому воздействию внешнего гамма-облучения в суммарной дозе более 350 сГр, установлено снижение уровня трийодтиронина в сыворотке крови при нормальном содержании тироксина [15]. Подобный характер изменений тиреоидного статуса свидетельствует об ускорении инволюционных процессов в системе «щитовидная железа–периферические ткани». Было также показано, что у работников ПО «Маяк» наблюдаются радиационно-обусловленные воз-

растные сдвиги белкового, липидного, углеводного и пуринового обмена [6, 17]. При этом радиационное старение не имело каких-либо качественных особенностей по сравнению с естественным старением, а характеризовалось более ранними проявлениями и большей степенью выраженности у облученных людей.

При дальнейшем анализе выяснилось, что зависимость значений ряда биохимических показателей от дозы радиационного воздействия имела возрастные, половые и генотипические особенности [5, 6, 16].

Имея в виду умеренный характер наблюдаемых сдвигов, часто не выходящих за пределы нормальных границ и затрудняющих их оценку у отдельного индивида, для индивидуальной оценки связанных с облучением сдвигов использовали интегральный критерий. В качестве такого критерия был разработан биохимический индекс как усредненное отклонение от нормального уровня тех показателей, которые имели достоверную связь с радиационным воздействием. По его значению, равному 15%, удалось разделить до 70% людей с разными суммарными дозами внешнего гамма-облучения [5].

На основании вышеизложенного нами разработана схема применения наиболее эффективных биохимических исследований при выявлении ближайших и отдаленных эффектов воздействия различных видов ионизирующих излучений, в которой учтены патогенетические механизмы наблюдаемых сдвигов. Предлагаемый перечень биохимических тестов (табл. 1–5) составлен на основании собственных и литературных данных о биохимических сдвигах при радиационном воздействии на человека [21, 25].

В последние годы большое внимание уделялось изучению роли биохимического полиморфизма в эффектах облучения у людей. При этом было установлено, что в порядке возрастания биохимических сдвигов, связанных с радиационным воздействием, люди с разными генотипами гаптоглобина (Hr) распределились следующим образом: Hr 1-1 < Hr 2-1 < Hr 2-2. Сводные данные по значению генетического полиморфизма в развитии детерминированных и стохастических эффектов облучения, полученные на основании собственных и литературных данных [11], представлены в таблице 6. Результаты оценки генетической предрасположенности к эффектам облучения на основе оценки генотипического относительного риска у людей свидетельствуют о достаточно высоком риске радиационных эффектов у лиц с радиочувствительными генотипами, что, в конечном счете, проявляется на популяционном уровне. Анализ роли генетических маркеров в развитии радиационных эффектов показал, что в пределах той или иной генетической системы можно выделить отдельные относительно наиболее радиочувствительные маркеры, поскольку каждый из них в разной степени может обуславливать генетическую предрасположенность к различным радиационным эффектам. Особенностью совместного действия генетических и радиационных факторов являет-

ся их взаимодействие, превышающее мультипликативный эффект. Существенное значение в реализации генетической предрасположенности к радиационным эффектам у людей имеет и то обстоятельство, что последняя наиболее выражена при действии минимальных эффективных доз облучения. Это заключение справедливо и для действия нерадиационных факторов, в частности курения. Очевидно, в общем плане можно думать о том, что генетические механизмы, определяющие различия людей в реакциях на воздействие неблагоприятных факторов, не имеют абсолютного значения. Вследствие этого данные механизмы максимальны при малых эффективных воздействиях, уменьшаются при относительно больших и не имеют существенного значения при значительных.

При оценке частоты соматических мутаций NO типа в гене гликофорина A была установлена достоверная дозовая зависимость (табл. 7), которая, однако, оказалась не очень выраженной.

Анализ литературных данных, посвященных изучению частоты мутаций в структурных генах половых клеток как не облученных, так и облученных людей, свидетельствует о том, что они характеризуются крайне низкими значениями (около $0,5 \times 10^{-5}$ на локус на поколение). К числу причин определения столь низкой частоты мутаций в структурных генах можно отнести, во-первых, исходно низкий темп мутирования в них и, во-вторых, действие селективного отбора против мутировавших генов. Более перспективным в этом отношении оказывается изучение мутаций в минисателлитной ДНК, частота которых (при отсутствии к тому же селективного отбора против них) на три порядка выше, чем в структурных генах, что позволяет существенно уменьшить число обследуемых людей.

Сравнительный анализ подобных исследований, проведенных у облученных людей, обнаружил неоднозначность полученных результатов [3, 12]. Как видно из таблицы 7, частота мутаций среди обследованных работников ПО «Маяк» составила $0,0034 \times \text{фрагмент}^{-1}$. В группе сравнения этот показатель был ниже — $0,0022 \times \text{фрагмент}^{-1}$. Однако различия в частоте мутаций между группами оказались недостоверными (точный критерий Фишера = 1,25; $p > 0,05$). Следует отметить, что частота мутаций в группе сравнения хорошо соответствует литературным данным, полученным в обычной популяции при использовании подобного методического подхода (см. табл. 7). Таким образом, имеющиеся в литературе и полученные нами данные не позволяют говорить о выраженных изменениях в молекулярно-генетических структурах половых клеток облученных людей, передающихся в последующие поколения.

Итоги изучения распределения ряда генетических маркеров у потомков 1-го поколения работников ПО «Маяк» в зависимости от прекоцептивной дозы облучения свидетельствуют о том, что дети, родители которых получили прекоцептивные дозы гамма-облучения

Таблица 1

Биохимические изменения при остром внешнем гамма- и нейтронном облучении в дозе > 100 сГр (первые три периода острой лучевой болезни)

Характер поражения или реакции	Симптом	Биохимические исследования
Деструктивная реакция Выход внутриклеточных ферментов в кровяное русло	Гиперферментемия	Активность сывороточной аспаратаминотрансферазы (АсТ), лактикодегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ)
Распад белков	Гипераминоацидурия	Экскреция с мочой аминокислот (аспарагиновой, цистеина, фенилаланина, триптофана, таурина)
Распад нуклеиновых кислот	Гиперазотемия Гипернуклеозидурия	Остаточный азот крови Экскреция с мочой нуклеозидов пиримидинового ряда: тимидина, дезоксицитидина, дезоксиуридина и его деривата — БАИМК
Повреждение эритроцитов (гемолиз)	Гипергемоглобинемия Гипогаптоглобинемия Гипербилирубинемия Гиперсидеремия Гиперметгемоглобинемия	Свободный гемоглобин сыворотки Гаптоглобин сыворотки Непрямой билирубин сыворотки Сывороточное железо
Метгемоглобинообразование		Метгемоглобин в цельной крови Тельца Гейнца (микроскопически)
Деструкция мышечной ткани	Гиперферментемия	Активность и изоферменты АсТ и креатинкиназы (КК) сыворотки
Повреждение слюнных и поджелудочной желез	Креатинурия Миоглобинурия Гиперферментемия Гиперферментурия Гиперферментемия	Экскреция с мочой креатина Экскреция с мочой миоглобина Общая активность и изоферменты амилазы мочи и крови
Повреждение миокарда		Активность и изоферменты АсТ, ЛДГ и КК сыворотки
Повреждение печени	Гиперферментемия	Активность аланинаминотрансферазы (АлТ), сорбитдегидрогеназы (СДГ), ЛДГ (и ее изоферментов) сыворотки
Стрессорная реакция Реакция коры надпочечников	Гиперкортикостероидемия (стероидурия) Гипокортикостероидемия (стероидурия) Диспротеинемия (гипоальбуминемия, гипер- α_2 -глобулинемия)	17-кетостероиды, 17-оксикортикостероиды (общие и их фракции, крови и мочи)
Воспалительная реакция	Гипергликопротеинемия	Электрофорез сывороточных белков. Общий белок сыворотки
		Общие гликопротеины, сиаловые кислоты, гексозы, гексозамины, серомукоид сыворотки С-реактивный белок в сыворотке

Таблица 2

Биохимические изменения при хроническом внешнем гамма-облучении в дозах, превышающих предельно допустимые

Характер поражения или реакции	Симптом	Биохимические исследования
Нарушение клеточного метаболизма, повышающее проницаемость клеточных мембран. Усиление клеточной гибели	Гиперферментемия	Общая активность сывороточной АлТ, СДГ, ЛДГ (и ее изоферменты)
Нарушение белково-синтетических процессов	Диспротеинемия (незначительная гипо- или гиперальбуминемия, гипо- или гиперглобулинемия) Гипергликопротеинемия	Электрофорез сывороточных белков. Общий белок сыворотки
Нарушение глюкокортикоидной и минералокортикоидной функции коры надпочечников	Гипокортицизм Гиперальдостеронизм	Белковосвязанные сахара сыворотки (сиаловые кислоты, гексозы, гексозамины) Спонтанная и стимулированная АКТГ экскреция 17-оксикортикостероидов и их фракции Экскреция альдостерона

Таблица 3

Биохимические изменения при попадании трансурановых радиоизотопов в организм

Характер поражения или реакции	Симптом	Биохимические исследования
Плутоний-239, Плутоний-238, Америций-241 (^{239}Pu, ^{238}Pu, ^{241}Am)		
Неспецифическая реакция в начальном периоде <i>Изменения в органах максимально-го депонирования (в начальном периоде — деструктивно-воспалительные, позднее — фиброзные)</i>	Гипокортицизм Гиперферментемия	Кортикостероидные гормоны в крови и моче Общая активность сывороточных АлТ, ЛДГ, АсТ, КК
Легкие (ингаляционное поступление): деструктивно-дегенеративная реакция развитие пневмосклероза	Дисферментемия Дисгликопротеинемия Диспротеинемия (гипоальбуминемия, гипергамма-глобулинемия)	ЛДГ ₃ (изоферменты ЛДГ) Гексозамины, гексозы, сиаловые кислоты сыворотки. Электрофорез гликопротеинов Электрофорез сывороточных белков. Общий белок сыворотки
присоединение воспалительных явлений	Гипергликопротеинемия Гипер- α_2 -глобулинемия	То же
Печень: деструктивная реакция нарушение функции, развитие цирроза	Гиперферментемия. Дисизоферментемия щелочной фосфатазы, ЩФ Снижение экскреторной функции Гиперферментемия Снижение белково-синтетической функции	Общая активность сывороточной АлТ, АсТ, СДГ, ЛДГ, ЩФ, изоферменты ЛДГ и ЩФ (патологическая печеночная ЩФ) Экскреторные пробы Общая активность сывороточной ЩФ, АлТ, АсТ, СДГ, ЛДГ, изоферменты ЛДГ, ЩФ (появление плацентарной ЩФ) Преальбумин, альбумин, холинэстераза
Костная ткань (поверхностное распределение радиоизотопа): усиление или ослабление остеогенеза	Гипер- или гипоферментемия Гипер- или гипооксипролинурия	Общая активность и изоферменты сывороточной ЩФ (костная ЩФ) Экскреция с мочой оксипролина

Таблица 4

Биохимические изменения при попадании радиоизотопов в организм

Характер поражения или реакции	Симптом	Биохимические исследования
Полоний-210 (^{210}Po)		
Печень Почки	См. изменения в печени при поступлении ^{239}Pu См. изменения в почках при поступлении ^{238}U	См. биохимические исследования при поступлении ^{239}Pu См. биохимические исследования при поступлении ^{238}U
Уран-238, Уран-235, Уран-234 (^{238}U, ^{235}U, ^{234}U)		
Почки дегенеративно-деструктивная реакция нарушение функции	Гиперферментурия Нарушение фильтрации Гиперкалиемия Гиперазотемия	Общая активность и изоферменты ЛДГ и ЩФ в моче Проба Реберга Калий сыворотки крови Остаточный азот, мочевины сыворотки

Окончание таблицы 4

Характер поражения или реакции	Симптом	Биохимические исследования
Йод-131, Йод-129, Йод-125 (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²⁹I)		
Щитовидная железа	Гипотиреозидизм Начальный гипотиреозидизм	Тироксинсвязывающая способность сыворотки. Гормоны щитовидной железы
Слюнные и поджелудочная железы	Гиперферментемия, гиперферментурия	Общая активность и изоферменты амилазы крови и мочи
Цезий-137 (¹³⁷Cs)		
Мышечная ткань	Гиперферментемия	Общая активность и изоферменты АсТ, ЛДГ, КК
Печень	Креатинурия Гиперферментемия	Экскреция креатина Общая активность сывороточной АлТ, СДГ, ЛДГ, ЩФ, изоферменты ЛДГ и ЩФ
Стронций-90, Стронций-89 (⁹⁰Sr, ⁸⁹Sr)		
Печень	Диспротеинемия (гипоальбуминемия, гиперглобулинемия)	Электрофорез сывороточных белков. Общий белок сыворотки
Костная ткань (объемное распределение радиоизотопов): усиление или подавление остеобластной активности нарушение минерального состава	Гипер- или гипофосфатаземия Гиперкальциемия, гипофосфатаземия	Общая активность и изоферменты ЩФ (костная ЩФ) Кальций и фосфор сыворотки крови
Тритий (³H)		
Мышечная ткань	См. изменения в мышечной ткани при поступлении ¹³⁷ Cs	См. биохимические исследования при поступлении ¹³⁷ Cs
Печень	См. изменения в печени при поступлении ¹³⁷ Cs	См. биохимические исследования при поступлении ¹³⁷ Cs

Таблица 5

Биохимические изменения при отдаленных последствиях радиационного воздействия

Характер поражения или реакции	Симптом	Биохимические исследования
Злокачественные новообразования: независимо от локализации	Появление или повышение содержания онкомаркеров Гиперферментемия	1. Неспецифические онкомаркеры 2. Специфические онкомаркеры Сывороточная АлТ, АсТ. Общая активность и изоферменты ЛДГ сыворотки. Унификация спектра изоформ ЛДГ
гепатоцеллюлярный рак и тератобластомы гонад остеосаркома высокодифференцированная (оссифицирующаяся)	Дисизоферментемия ЩФ	Общая активность и изоферменты ЩФ, термостабильность ЩФ. Плацентарноподобная, патологическая и печеночная ЩФ
	Гипергликопротеинемия Гиперальфафетопротеинемия	С-реактивный белок. Гликопротеины сыворотки Альфафетопротеин в сыворотке и трансудатах
	Гиперферментемия	Общая активность и изоферменты ЩФ (костная ЩФ), термолабильные формы ЩФ

Окончание таблицы 5

Характер поражения или реакции	Симптом	Биохимические исследования
Парапротеинозы	Гипероксипролинурия М-градиент	Экскреция оксипролина Электрофорез белков сыворотки крови и мочи
Ускоренное развитие атеросклероза, обменных нарушений и инволюционных изменений: липидный обмен	Дислипотеидемии	Холестерин, фракции холестерина, триглицериды, общие липиды сыворотки, электрофорез липопротеинов. Фенотипирование дислипотеидемий
углеводный обмен	Нарушение толерантности к углеводам, сахарный диабет	Тест толерантности к глюкозе, фруктозамин, гликолизированный гемоглобин, глюкоза и кетоновые тела в моче
пуриновый обмен	Гиперурикемия	Мочевая кислота, суточная экскреция мочевой кислоты с мочой
белковый обмен	Гипоальбуминемия	Электрофорез белков, альбумин
тиреоидный статус	Гипергаммаглобулинемия Патология щитовидной железы Инволюционные изменения	Иммуноглобулины Свободные Т3 и Т4, ТТГ, АТ к ТГ, ТГ и др. Свободные Т3 и Т4 (или общие Т3 и Т4, тироксинсвязывающий белок)

Таблица 6

Относительный риск детерминированных и стохастических эффектов облучения у людей с радиочувствительными генотипами (собственные и литературные данные [11])

Эффекты облучения	Дозы внешнего гамма-облучения (Гр) или плутоний-239 (кБк)	Генетические системы: радиочувствительные генотипы	ОР*
Детерминированные эффекты			
Хроническая лучевая болезнь	0,7–4,0 Гр	Нр: Нр 2-2	2,0
Ранний церебральный атеросклероз	>4,0 Гр	Нр: Нр 2-1, Нр 2-2 ABO: B(III), AB(IV)	2,7 4,2
Хронический гастрит	>4,0 Гр	Нр: Нр 2-1, Нр 2-2 ABO: 0(I), A(II)	2,4 2,7
Хронический гепатит, цирроз печени	>3,7 кБк	Нр: Нр 1-1, Нр 2-2	2,9
Лучевой дерматоз	1 Гр	TfC: C2-1, C2-2 C3: FS	4,1 2,6
Острая лучевая болезнь	> 1 Гр острого облучения	HLA: A10, A28; Bw: 16,35, 38; DR 3	2,8 4,1 3,7
		Нр: Нр 2-2	6,7
Стохастические эффекты			
Рак легкого	Рентгенография грудной клетки (1–40 процедур)	CCND1 (G870A): AA Tp53 интрон 3: A2A2	1,2 2,1
Рак легкого	Радон > 121 Бк, м ³	GSTM1: (0)	3,5
Менингиома	Лучевая терапия: 1–6 Гр на область головы	NF2 Rs731647): TT Ki-ras (Rs9966): CT	1,8 1,5
Рак молочной железы	> 5 маммографий	DSB genes: 2–4 варианта vs 0–1 варианта	1,25
Рак молочной железы	Рентгенологи, персонал	XRCC1 (codon 399): Arg/Arg	1,4
Меланома	Интенсивное УФО-облучение	XPB (Lys757Gln): Lys/Lys XPB (Asp312Asn): Asp/Asp	1,8 1,5
Острый лейкоз	После предшествующей радиохимиотерапии	XRCC1 (codon 399): Arg/Arg RAD51: g/c, c/c GSTT1: (0) GSTP1: Ile/Val, Val/Val NQO1: Ser/Ser	2,5 2,6 1,7 1,6 2,7
Рецидив рака желудка		NQO1: Ser/Ser	6,0

* — относительный риск: p < 0,05 — жирный шрифт; p < 0,1 — обычный шрифт.

Таблица 7

Результаты молекулярно-генетических исследований у работников ПО «Маяк» и их потомков

Частота мутаций NO типа в гене гликофорина А									
Показатели			Контроль	Доза облучения > 200 сГр		p			
n Число ГФА мутаций NO типа, ×10 ⁻⁶			5 10,2 ± 2,1	11 23,2 ± 4,6		<0,05			
Частота мутаций в минисателлитной ДНК половых клеток работников									
Исследования		Количество семейных троек	Общее количество фрагментов у потомков	Количество мутаций		Частота мута- ций на фрагмент			
а) основная группа		50	1176	4		0,0034			
б) группа сравнения		19	455	1		0,0022			
Популяционные данные [11]		179	4363	9		0,0020			
Распределение генетических маркеров у потомков 1-го поколения в зависимости от прекоцептивной дозы облучения работников									
Группы	Дозы прекоцептивного облучения родителей	n	Генотипы Нр			Аллели			
			1-1	2-1	2-2	Нр ¹	Нр ²		
1-я	Контроль (0)	205	13,6%	51,2%	35,1%	0,400	0,600		
2-я	Менее 200 сГр	371	14,3%	46,4%	39,3%	0,375	0,625		
3-я	Более 200 сГр	140	12,1%	38,6%	49,3%	0,314	0,686		
Частота аномального метилирования в генах клеток тканей аденокарциномы легкого работников									
Доза на легкие (Pu-239)	Гены								
	p16	DAP-K	MGMT	RASSF1A	HPAХ5β	GATA5	HCAD	3 и более генов	
	Контроль	44,4%	25,5%	17,2%	56,1%	46,8%	42,6%	56,1%	20,8%
	≤30 сГр	57,1%	42,9%	42,9%	30,8%	23,1%	57,1%	60,0%	30,0%
>30 сГр	71,0%	22,6%	32,3%	32,3%	39,3%	62,1%	56,3%	44,8%	
p	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	

более 200 сГр, по сравнению с контролем характеризуются повышенной средней приспособленностью и снижением среднего коэффициента отбора по генетической системе Нр за счет достоверного повышения частоты генотипа Нр 2-2 (см. табл. 7). Наиболее вероятной причиной наблюдаемых сдвигов может быть направленный гаметический отбор (аллель Нр² против аллеля Нр¹) при данных условиях прекоцептивного облучения, который проявляется в нарушении сегрегации у гетерозигот Нр 2-1, имеющих оба аллеля [9]. Результатом такого отбора в названной группе потомков явилось: снижение частоты гетерозиготности по системе Нр, тенденции к снижению средней гетерозиготности по всем исследованным генетическим маркерам, изменение в частоте сочетаний отдельных генотипов и групп крови, уменьшение генетической идентичности и увеличение генетического расстояния относительно контроля [10]. Исходя из неодинаковой продолжительности жизни у людей с

разными генотипами Нр, было показано, что наблюдаемое изменение распределения генотипов у потомков приведет к сокращению ожидаемой продолжительности жизни на 0,5 года [12]. При анализе распределения генотипов и частоты аллелей Нр у внуков работников ПО «Маяк» не было установлено их отклонений в зависимости от прекоцептивных доз облучения прародителей по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемые изменения у детей работников не передаются их внукам. Отсутствие сдвигов в распределении генотипов гаптоглобина у внуков прародителей с высокими прекоцептивными дозами с позиций популяционной генетики объясняется, во-первых, отсутствием соответствующих прекоцептивных доз облучения у потомков 1-го поколения (F1-дети) и, во-вторых, вступлением в браки детей работников, получивших прекоцептивные дозы внешнего гамма-облучения более 200 сГр, преимуще-

ственно с лицами (в 94,3% случаев), родители которых либо не подвергались профессиональному облучению, либо имели прекоцептивные дозы облучения менее 200 сГр, т.е. с обычной генетической структурой.

В эпидемиологических исследованиях, выполненных у работников ПО «Маяк», которые подверглись радиационному воздействию, установлен повышенный риск рака легкого. Из возможных молекулярных механизмов лучевого канцерогенеза большой интерес вызывает эпигенетическая активация протоонкогенов или инактивация генов супрессоров опухолей путем аномального метилирования CpG-островков. Сравнительный анализ показал, что относительно контроля в тканях аденокарциномы легкого работников частота аномального метилирования в генах p16, O⁶-MGMT и GATA5 достоверно повышена, а в гене RASSF1A, напротив, снижена (см. табл. 7). При этом была установлена достоверная связь повышения частоты аномального метилирования в генах p16 и O⁶-MGMT, а также связь понижения частоты аномального метилирования гена RASSF1A с поглощенной дозой на легкие от плутония-239. Частота множественного метилирования (в трех и более генах) достоверно повышалась с увеличением поглощенной дозы на легкие от плутония-239 [20].

Литература

1. Веденеев В.С., Токарская З.Б. // Бюллетень радиационной медицины. — 1970. — № 1. — С. 46–52.
2. Котеров А.Н. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. — 2004. — Т. 49, № 4. — С. 55–72.
3. Тельнов В.И. // Бюллетень радиационной медицины. — 1985. — № 1. — С. 81–86.
4. Тельнов В.И. // Медицина труда и промышленная экология. — 1994. — № 2. — С. 4–8.
5. Тельнов В.И. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. — 1994. — № 5. — С. 39–43.
6. Тельнов В.И. // Вопросы медицинской химии. — 1996. — Т. 42, вып. 4. — С. 328–333.
7. Тельнов В.И. // Гигиена и санитария. — 1996. — № 3. — С. 51–53.
8. Тельнов В.И. // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2008. — Т. 48, № 5. — С. 545–552.
9. Тельнов В.И. // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2009. — Т. 49, № 6. — С. 645–651.
10. Тельнов В.И. Материалы Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины» (СПб., 2010) // Клинико-лабораторный консилиум. — 2010. — № 2–3. — С. 88–93.
11. Тельнов В.И. Генетические последствия облучения работников ПО «Маяк» и их потомков // Источники и эффекты облучения работников ПО «Маяк» и населения, проживающего в зоне влияния предприятия / Под редакцией М.Ф. Киселева, С.А. Романова. — Челябинск: Челябинский дом печати, 2010. — Ч. 2. — С. 175–210.
12. Тельнов В.И., Жунтова Г.В. // Клиническая лабораторная диагностика. — 1993. — № 5. — С. 58–61.
13. Тельнов В.И., Жунтова Г.В. // Вопросы медицинской химии. — 1995. — Т. 41, вып. 4. — С. 57–60.
14. Тельнов В.И., Жунтова Г.В. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. — 1995. — Т. 40, № 4. — С. 3–5.
15. Тельнов В.И., Жунтова Г.В. // Вопросы медицинской химии. — 1998. — Т. 44, вып. 5. — С. 479–484.
16. Тельнов В.И., Кириллова Е.Н. // Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2009. — № 2 (25). — С. 216–217.
17. Тельнов В.И., Токарская З.Б. // Бюллетень радиационной медицины. — 1988. — № 3. — С. 118–122.
18. Тельнов В.И., Токарская З.Б. // Физиология человека. — 1992. — № 2. — С. 121–126.
19. Тельнов В.И., Belinsky S.A., Русинова Г.Г., Crowell R.E., Сотник Н.В., Адамова Г.В. Молекулярные маркеры рака легкого у работников атомной промышленности // Вопросы радиационной безопасности. — 2002. — № 4. — С. 36–41.
20. Токарская З.Б. Биохимические исследования // Руководство по организации медицинского обслуживания лиц, подвергшихся действию ионизирующего излучения / Под ред. академика Л.А. Ильина. — М.: Энергоатомиздат, 1985. — С. 46–52.
21. Токарская З.Б., Сурина А.Г., Мамакова О.В. // Терапевтический архив. — 1983. — № 10. — С. 117–120.
22. Токарская З.Б., Сурина А.Г., Белецкий Н.Г., Мамакова О.В. // Вопросы онкологии. — 1986. — Т. 32, № 12. — С. 41–45.
23. Токарская З.Б., Тельнов В.И. // Терапевтический архив. — 1982. — № 5. — С. 43–46.
24. Токарская З.Б., Тельнов В.И. // Вопросы радиационной безопасности. — 2003. Спец. выпуск. — С. 53–63.
25. Токарская З.Б., Чернова Г.В. // Бюллетень радиационной медицины. — 1976. — № 2. — С. 69–74.
26. Чернова Г.В. // Вопросы мед. химии. — 1974. — Т. XX, вып. 6. — С. 563–577.
27. Чернова Г.В., Токарская З.Б. // Бюллетень радиационной медицины. — 1972. — № 2. — С. 104–111.

ОЦЕНКА УРОВНЯ НЕКОНЬЮГИРОВАННОГО ЭСТРИОЛА ПРИ ПАТОЛОГИИ БЕРЕМЕННОСТИ

В.А. ШУРОВ, Н.О. МОГЕЛАДЗЕ

ФГУ «Российский научный центр “Восстановительная травматология и ортопедия” имени акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития

Резюме. Проанализирован уровень неконъюгированного эстриола в плазме крови 20 женщин с хронической плацентарной недостаточностью. Уровень гормона повышался в процессе беременности в сроки от 26 до 36 недель. При ультразвуковом исследовании у 11 женщин выявлена маточно-плацентарная недостаточность кровообращения 1-а и 1-б стадий. В этой группе женщин наблюдалось снижение частоты сердцебиений плода, уровень гормона увеличен в среднем на 26% при норме $71,1 \pm 7,9$ нмоль/л. Повышение уровня гормона рассматривается как компенсаторная реакция при возникновении трудностей в маточно-плацентарном кровообращении. Это повышение направлено на улучшение кровотока по сосудам матки. Такое повышение уровня эстриола наблюдается, в первую очередь, у беременных из социально менее защищенных слоев общества, у женщин, не имеющих среднего специального и высшего образования.

Ключевые слова: беременность, фетоплацентарная недостаточность, эстриол.

ASSESSMENT OF UNCONJUGATED THEEOL LEVEL AT THE PATHOLOGY OF PREGNANCY

V.A. SHCHUROV, N.O. MOGELADZE

Federal State Institution «Russian G.A. Ilizarov scientific center “Rehabilitation traumatology and orthopedics”» Ministry of Public Health and Social Development

Summary. Unconjugated theelol level was analyzed in blood plasma of 20 women with chronic placental insufficiency. Hormone levels increased during pregnancy in a period of 26 to 36 weeks. An ultrasound study of 11 women found uteroplacental circulatory insufficiency 1-A and 1-B stages. In this group of women there was a decrease of fetal heart rate, hormone levels increased on average by 26% at a rate $71,1 \pm 7,9$ nmol / liter. Increased levels of the hormone are considered as a compensatory reaction when difficulties arise in utero-placental circulation. This increase are aimed at improving blood flow through the vessels of the uterus. Increase in the level of theelol is observed primarily in pregnant women from socially less protected sectors of society, women have no special secondary and higher education.

Key words: pregnancy, fetoplacental insufficiency, theelol.

Данные для корреспонденции:

Щуров Владимир Алексеевич — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела физиологии ФГУ РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова, 640001, г. Курган, ул. Коли Мяготина, 95, кв. 49, тел.: +7 (909) 176-41-10, e-mail: shchurovland@mail.ru

Известно, что качественное питание беременной женщины — главный фактор обеспечения оптимального развития здорового ребенка [1]. Хроническое недоедание во время беременности сопровождается повышением частоты самопроизвольных абортов, преждевременных родов, мертворождений [11], способствует возрастанию числа детей, родившихся с явлениями врожденной гипотрофии, с поражением ЦНС [2].

При недостаточности питания работающей женщины разрушается гестационная доминанта, и выбор поддержания запасов может быть сделан не в пользу плода [11]. Стимулировать такой выбор и привести к преждевременным родам могут продолжающаяся работа беременной более 42 часов в неделю, работа в по-

стоя более 6 часов в день и труд в ночную смену [10], случаи, когда срок после предшествующей беременности менее 6 мес., а также при беременности несовершеннолетних [3, 7], после медицинских абортов, изнасилований [6].

Одним из показателей взаимоотношений в системе «мать-плод» может быть уровень неконъюгированного эстриола. Неконъюгированный эстриол — основной эстроген беременных женщин. Предшественник стероида синтезируется в надпочечниках плода и в плаценте превращается в эстриол [4, 5]. Повышение уровня эстриола характерно при вынашивании крупного плода. Его снижение — при задержке развития плода [9].

Эстриол играет важную роль в процессах роста и развития беременной матки, улучшает ток крови по её сосудам, снижая их сопротивление. Концентрацию этого гормона в жидкостях организма обычно измеряют с целью определения состояния плода, в частности у беременных с высокой степенью риска преждевременных родов или гибели плода. В процессе беременности уровень свободного эстриола неуклонно растёт.

В случае нарушения функционирования фетоплацентарного комплекса снижение уровня гормона опережает клинические проявления этого нарушения. Угрожающим считается снижение уровня свободного эстриола более чем на 40%.

Исследование выполнено с целью определения диагностической ценности измерения уровня неконъюгированного эстриола при начальных стадиях нарушения маточно-плацентарного кровотока у беременных женщин.

Материалы и методы. Анализ уровня эстриола в плазме крови проведен у 20 беременных женщин с хронической фетоплацентарной недостаточностью со сроком беременности 26–36 недель. Синдром задержки развития плода был у 5 женщин, у 1 имелось 2 плода, у 1 женщины анемия и 1 страдала ожирением. У 11 пациенток (опытная группа) по данным УЗ-исследования обнаружены явления нарушения маточно-плацентарного кровотока 1-а и 1-б стадий [8]. У всех женщин проанализированы уровень образования, профессия, семейный доход, занимаемая жилплощадь, состав семьи. Статистическая обработка материалов исследований проведена с использованием стандартных методик параметрической статистики программы «Excel».

Результаты исследования

У больных с нарушениями маточно-плацентарного кровотока (опытная группа) уровень свободного эстриола составил $89,6 \pm 9,1$, а у больных без патологии маточно-плацентарного кровообращения — $71,1 \pm 7,9$ нмоль/л. В обеих группах уровень этого гормона в плазме увеличивался в процессе беременности. Мы сравнили динамику эстриола в норме, где имеются верхняя и нижняя границы показателя, и у беременных с патологией маточно-плацентарного кровообращения (рис. 1). В опытной группе величина гормона превышала верхнюю границу нормы. Мы не выявили случаев существенного снижения данного показателя при патологии маточно-плацентарного кровообращения.

Уровень эстриола зависел от скорости маточно-плацентарного кровотока. Чем выше скорость этого кровотока, тем ниже уровень свободного эстриола ($E = 128,9 - 14,4q$; $r = -0,356$). Более того, величина эстриола зависела от уровня образования женщин и была наиболее близкой к норме у пациенток с высшим и средним специальным образованием (рис. 2).

То же самое можно сказать и о зависимости уровня гормона от подушевого дохода семьи. Чем выше денеж-

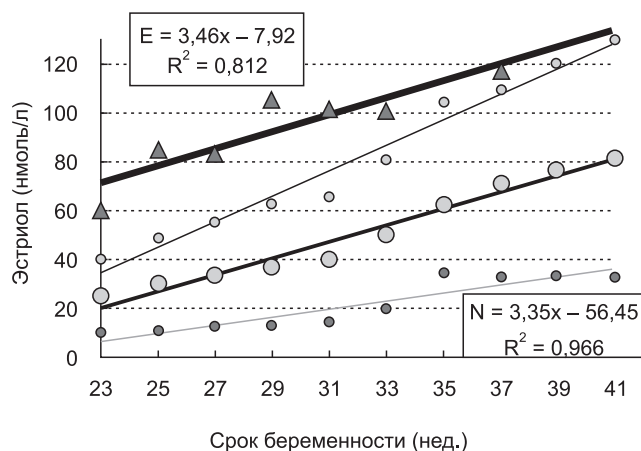


Рис. 1. Динамика свободного эстриола у здоровых беременных женщин (N) и у пациенток с хронической фетоплацентарной недостаточностью (P)

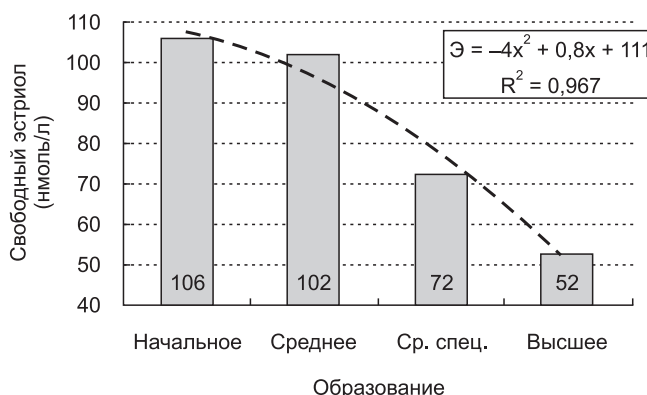


Рис. 2. Зависимость содержания эстриола в плазме от уровня образования беременных женщин

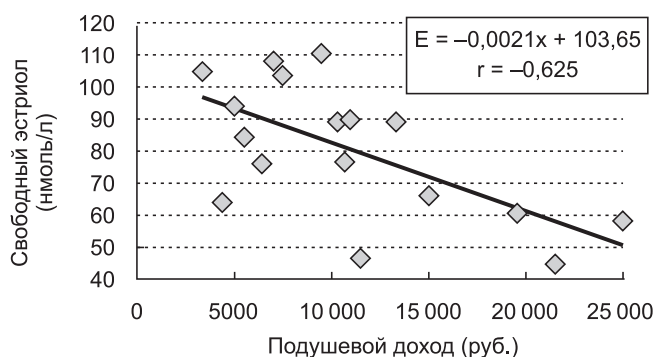


Рис. 3. Зависимость свободного эстриола от уровня доходов семьи

ный доход женщин, тем соответственно ниже уровень свободного эстриола (рис. 3).

Кроме того, выявлена взаимосвязь уровня эстриола и частоты сердечных сокращений плода. Увеличение содержания гормона в сроки 33–37 недель беременности наблюдалось при снижении частоты сокращений сердца плода. У таких женщин чаще встречались расстройства маточно-плацентарного кровотока (рис. 4).

Таким образом, уровень свободного эстриола постепенно повышается по мере развития беременности.

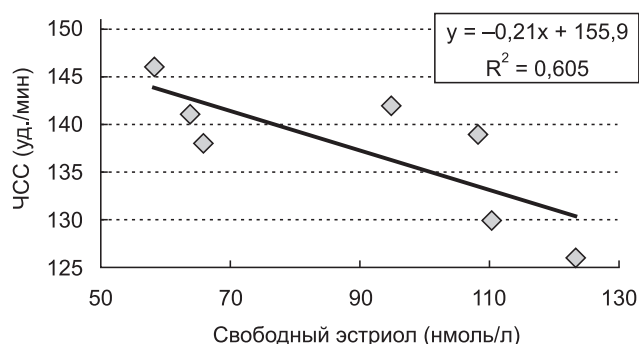


Рис. 4. Зависимость уровня эстриола от частоты сердцебиений плода

Литература

1. Воронцов И.М. Питание беременной женщины — главный фактор обеспечения оптимального развития и здоровья ребенка на последующие периоды жизни // *Мать и дитя: материалы II республ. форума.* — М., 2001. — С. 30–31.
2. Голдбек Н. Питание во время беременности: пер. с англ. — М.: Крон-Пресс, 1998. — 30 с.
3. Дворянский С.А., Арасланова С.Н. Преждевременные роды. — М.: Мед. книга, 2002. — 94 с.
4. Доктор Маланова: Эстриол (С3) свободный и общий // www.malanova.ru/showMaterial.php?dealWithArticle&.
5. Рыков А.А., Рыкова О.В., Сидорова И.В. Пренатальная диагностика: вопросы биохимического скрининга // *Здоров'я України.* — 2006. — № 19/1.
6. Уракова Н.А., Ипатова Т.В. Оценка причин и исходов преждевременных родов по материалам родильного дома № 3 города Ижевска за 2008 год // *Мать и дитя: материалы IV респ. научного форума.* — Екатеринбург, 2010. — С. 292–294.
7. Чиркова А.В., Жданова В.И., Буравлева А.М. и др. Течение беременности, родов и морфологические особенности плаценты

При возникновении трудностей в маточно-плацентарном кровообращении наблюдается повышение уровня гормона. Уровень гормона повышается как адаптивная компенсаторная реакция в фазе напряжения, направленная на улучшение кровотока по сосудам матки. У больных без нарушения маточно-плацентарного кровообращения повышение уровня гормона в плазме крови не наблюдается. Выявленное повышение уровня гормона наблюдается, в первую очередь, у беременных из социально менее защищенных слоев общества, у женщин, не имеющих среднего специального и высшего образования. Компенсаторное повышение уровня гормона наблюдается и при замедлении ритма работы сердца плода.

у несовершеннолетних // *Становление и развитие республиканской клинической больницы: сборник научно-практических работ.* — Ижевск, 1997. — С. 276–279.

8. Щуров В.А., Могеладзе Н.О. Клиническое значение ультразвуковой диагностики маточно- и фетоплацентарного кровообращения при компенсированной форме фетоплацентарной недостаточности // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* — 2010. — Т. 36, № 4. — С. 48–52.

9. Kislitsky A., Kislitsky A. Неконъюгированный эстриол // www.risnet.ru/tn_index_id_42246.htm

10. Pompeii L.A., Savitz D.A., Evenson K.R. et al. Physical exertion at work and the risk of preterm delivery and small-for-gestational-age birth // *Obstetrics of Gynecology.* — 2005. — Vol. 106. — P. 1279–1288.

11. Russo-Stieglitz K.E. et al. Pregnancy outcome in patients requiring parenteral nutrition // *J. Mat.-Fet. Med.* — 1999. — Vol. 8, N4. — P. 164.

ДИНАМИКА МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАПЕЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ В ПРОЦЕССЕ ВЫСЫХАНИЯ КАК ИНФОРМАТИВНЫЙ ПАРАМЕТР ДЛЯ ОЦЕНКИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО СТАТУСА ЖИДКИХ СРЕД

Т.А. ЯХНО, О.А. САНИНА, А.Г. САНИН, В.Г. ЯХНО

Учреждение Российской академии наук «Институт прикладной физики РАН»,
Нижний Новгород, Россия

Резюме. Разработан новый методологический подход для проведения диагностики многокомпонентных жидкостей на основе регистрации динамики фазовых переходов в их высыхающих каплях. Процесс высыхания капли при одних и тех же внешних условиях определяется исходными параметрами раствора: поверхностным натяжением, смачиванием, вязкостью, внутренней структурой, дисперсностью, теплопроводностью, ионной силой, pH. Эти факторы влияют на такие чувствительные процессы как агрегация, преципитация, седиментация, гелеобразование и кристаллизация, сопровождающие высыхание многокомпонентной жидкости. В результате меняются физические свойства капли, динамика которых может быть зарегистрирована. Создан прототип устройства, позволяющий регистрировать динамику акустомеханического импеданса (АМИ) капель, высыхающих на поверхности кварцевого резонатора. Решающим фактором при использовании измерения АМИ в режиме сдвиговых колебаний является чрезвычайная чувствительность его величины к возникновению и росту новой фазы на границе жидкость — кварц, а также к акустическим и механическим свойствам образующихся структур. Величина сигнала АМИ отражается на экране в режиме реального времени в виде кривой. Программное обеспечение позволяет проводить количественный сопоставительный анализ формы кривых АМИ высыхающих капель биологических жидкостей сравниваемых групп больных тем или иным заболеванием между собой и с контролем. Приводятся примеры использования способа в медицинской диагностике.

Ключевые слова: новые методы лабораторной диагностики, сенсорные технологии, динамика молекулярной самосборки, акустическая импедансометрия, высыхающие капли.

DYNAMIC CHANGES OF MECHANIC PROPERTIES OF BIOLOGICAL FLUIDS DROPS DURING THE PROCESS OF DRYING AS AN INFORMATIVE PARAMETER FOR EVALUATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF LIQUID MEDIUMS

T.A. YAKHNO, O.A. SANINA, A.G. SANIN, V.G. YAKHNO

Institution of Russian sciences Academy "Institute of applied physics of Russian Sciences Academy",
Nijny Novgorod, Russia

Summary. A new technique for multicomponent liquids analysis based of a registration the dynamic changes of phase transitions in their drying drops is suggested. The environment in all investigations is stable. Drying process is determined by the initial properties of the solution: its surface tension, wettability, viscosity, internal structure, dispersion (for colloids), thermal conductivity, ionic strength, pH level, gelforming substances. These factors influence such sensitive processes as aggregation, precipitation, sedimentation, gelation, and crystallization during drop drying. Thus, dynamics of phase transitions in drying drop can be clearly recognized through dynamic changes of drop's integral mechanical parameters, such as density, viscosity, elasticity, velocity. At the same environment (including substrate and equal drop volume) this dynamics is determined only by liquid nature (content, structure). If a drop dries on a surface of the sensor, then the process of phase transitions can be registered by using the device developed for this purpose. In this technique, information comes from the dynamics of the complex process of self-organization in drying drops, this dynamic changes being dependent on the composition and structure of the liquid. Detecting the self-organization processes as acoustomechanical impedance, one can reveal quantitative distinctions between donors (control) and ill patients with different diseases. Possible utilization of this methodology in medical laboratory diagnostics is demonstrated.

Key words: new methods of medical diagnostics, sensor techniques, dynamic changes of molecular self-association, acoustical impedansometry, drying drops.

Данные для корреспонденции:

Яхно Татьяна Анатольевна, кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник Учреждения Российской академии наук «Институт прикладной физики РАН»,
603950, Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46 ГСП-120; тел.: (831) 436-85-80; e-mail: tanya-yakhno@rambler.ru

Введение

Изменение физико-химических параметров биологических жидкостей при развитии патологических процессов в организме неоднократно отмечалось отечественными и зарубежными авторами. В последние десятилетия, благодаря развитию новых методологических подходов, показано, что физико-химическое состояние сыворотки и плазмы крови является носителем информации о состоянии организма. Связь между развитием патологических процессов и нарушением агрегативной устойчивости белков крови в медицине отмечена давно. В практической медицине использовался ряд диагностических тестов, направленных на определение коллоидной устойчивости белков сыворотки крови при различных патологических состояниях, сопровождающихся диспротеинемией, — коагуляционные пробы (КП) [9]. Это качественные и полуколичественные пробы, предназначенные для определения лабильности сывороточных белков. Устойчивость белкового коллоидного раствора к коагуляции (слипанию частиц с образованием их агрегатов) зависит от величины отдельных коллоидных частиц, их электрического заряда и толщины сольватного слоя, окружающего каждую частицу. Образование агрегатов и даже выпадение их в осадок происходит при увеличении размера коллоидных частиц, уменьшении их электрического заряда или разрыве сольватного слоя между частицами. При диспротеинемиях физико-химические характеристики коллоидного раствора, образуемого белками сыворотки крови, меняются, и те факторы, которые раньше не могли вызвать его коагуляцию, приводят к слипанию частиц коллоидного раствора сывороточных белков с образованием более или менее крупных агрегатов.

В последние 30 лет активно проводятся испытания диагностической информативности метода лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) в биологии и медицине [1–5, 7, 10, 17, 22–25]. Биофизическая сущность ЛКС состоит в определении спектральных характеристик рассеянного излучаемого субстратом монохроматического лазерного излучения, из которого с помощью математической обработки восстанавливается гистограмма распределения размеров частиц, содержащихся в исследуемой жидкости [23]. По выраженности и направленности сдвигов в распределении частиц по размерам авторы [26] могут установить этапы патологического процесса, от стадии начальной интоксикации до выраженной иммунной реакции. На основании ЛКС сыворотки крови предложен способ диагностики онкологических заболеваний [2].

Существуют и другие методологические подходы, направленные на оценку физико-химических характеристик биологических жидкостей. Показана диагностическая информативность изменения микроинтерференционных картин вытекания пенных пленок биологических жидкостей или изменения времени их жизни [8], а также перспективность проведения дина-

мической тензиометрии капель сыворотки крови и мочи [47, 48].

Особый интерес представляет медицинская диагностика по морфологическим особенностям капель биологических жидкостей, высохших на предметных стеклах в горизонтальном положении [12–15, 18–21, 28].

Микроскопия высохших капель с целью диагностики возможна только через 2–3 дня после высыхания, когда испарится рыхлосвязанная вода и произойдет растрескивание высохшей пленки. Разработчики метода обычно подсчитывают количество тех или иных трещин или микроскопических структур, свойственных «норме» и разным видам патологии. Несмотря на объективную обусловленную информативность данного подхода, он обладает рядом недостатков: длительным временем и трудоемкостью анализа, субъективностью визуальной оценки структур и «полуколичественными» методами обработки результатов.

Ранее нами было показано [37], что динамические параметры структуризации высыхающих капель сыворотки крови также содержат диагностическую информацию об изменении их физико-химического статуса, однако извлечение этой информации с помощью визуального наблюдения оказалось весьма трудоемким. Поэтому был разработан способ автоматической регистрации динамических параметров высыхающих капель [31, 36, 44, 53, 58, 59].

Описание технологии

Идея нового методологического подхода заключается в следующем. Капля жидкости, высыхающая на твердой смачиваемой подложке, представляет собой естественную модель самоорганизующейся системы с бесконечно большим разнообразием вариантов динамики процессов молекулярной самосборки, в зависимости от состава и структуры жидкости. Исходные физико-химические параметры раствора (поверхностное натяжение, смачивание, вязкость, внутренняя структура, дисперсность, теплопроводность, ионная сила, pH) влияют на динамику таких процессов как коацервация, преципитация, седиментация, гелеобразование и кристаллизация, сопровождающие процесс высыхания многокомпонентной жидкости. В результате меняются физические свойства капли, динамика которых может быть зарегистрирована. При одинаковых внешних условиях (включая подложку) эта динамика определяется только составом и структурой жидкости.

В соответствии с предлагаемым подходом, капля исследуемой жидкости высыхает на поверхности кварцевого резонатора. Используемый нами резонатор выполнен в виде пластины $\text{хус}/1^\circ 30'$ среза размером $48,0 \times 4,5 \times 1,2$ мм. Устройство и мода колебаний резонатора показаны на рисунке 1. Резонатор совершает колебания сжатия-расширения по длине, при этом его боковые поверхности совершают колебания сдвига. В процессе измерений рабочая частота колебаний кварцевой пласти-

ны принудительно поддерживается постоянной и равной резонансной частоте ненагруженного резонатора — 60 кГц. Амплитуда колебаний ненагруженного резонатора синусоидально распределена по длине пластины и составляет не более 10 нм (рис. 1В). Капля исследуемой жидкости помещается вблизи конца пластины (рис. 1А). Оценки показали, что распределение амплитуды колебаний по длине пластины практически не меняется при взаимодействии поверхности резонатора с объектом (каплей). Другими словами, сохнувшая капля не вносит искажения в распределение колебательной скорости по длине резонатора. Измеряемой величиной является комплексная электрическая проводимость резонатора, нагруженного каплей, при этом собственная емкость резонатора и емкость соединительного кабеля вычитаются мостовой схемой устройства (рис. 2). Значения акустомеханического импеданса (АМИ) капли вычисляются из измеряемой величины электрической проводимости [27] и выводятся на экран в режиме реального времени (рис. 3). На настоящем этапе развития технологии измеряется, отображается и записывается величина модуля АМИ. АМИ является величиной акустического или механического импеданса объекта, нагружающего кварц в режиме сдвиговых колебаний. В данном случае мы имеем дело с таким специфическим объектом как капля жидкости, высыхающая на поверхности кварца (подложке). Поэтому можно полагать, что АМИ интегрально включает в себя такие физические характеристики объекта как вязкость, эластичность, трение и массу с разной степенью адгезии к подложке:

$$AMI = H1 \cdot (1 + j) \cdot S \cdot \sqrt{2\pi f \eta \rho} + H2 \cdot j \cdot 2\pi f \cdot m + H3 \cdot \frac{k}{j \cdot 2\pi f} + H4 \cdot kfric, \quad (1)$$

где j — мнимая единица; S — площадь контакта капли с кварцем; f — частота колебаний кварца; η — начальная вязкость жидкости; ρ — начальная плотность жидкости; m — масса; k — эластичность; $kfric$ — коэффициент трения.

Первое слагаемое в выражении (1) описывает величину акустического импеданса вязкой жидкости, соприкасающейся с подложкой на площади S , второе — величину механического импеданса массы m , колеблющейся вместе с подложкой, третье — величину механического импеданса нагрузки в виде упругого (эластичного) элемента, четвертое — величину механического импеданса диссипативных потерь (трения).

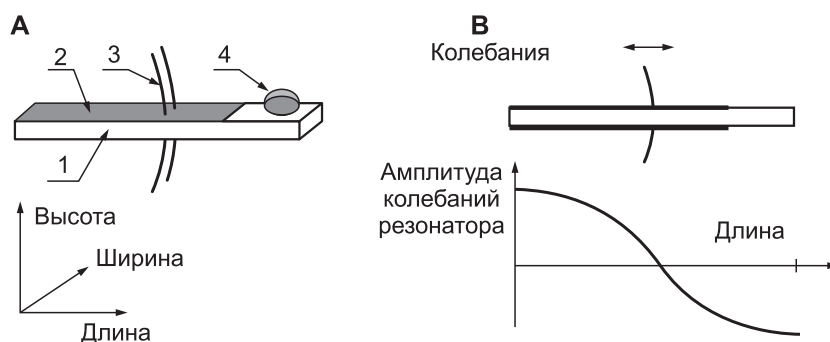


Рис. 1. Устройство и мода колебания кварцевого резонатора: А — резонатор с каплей исследуемой жидкости. 1 — кварцевая пластина; 2 — металлическое напыление; 3 — поддерживающие проводники; 4 — капля исследуемой жидкости. В — распределение амплитуды колебаний сжатия-растяжения резонатора вдоль длины пластины

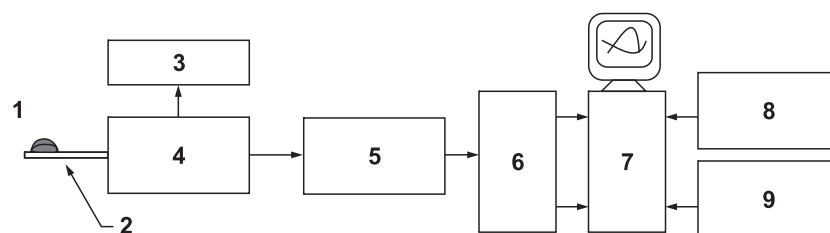


Рис. 2. Блок-схема устройства: 1 — капля жидкости; 2 — кварцевый резонатор; 3 — генератор; 4 — мостовая схема; 5 — амплитудный детектор; 6 — АЦП; 7 — ПК; 8 — программа отображения сигнала; 9 — программа обработки сигнала

Каждое слагаемое имеет свой весовой коэффициент: $H1, H2, H3, H4$. Эти коэффициенты имеют исходно разные значения у разных жидкостей и изменяются по-разному в процессе высыхания капли, в зависимости от свойств жидкости (состава, структуры). Это вносит индивидуальность в динамику АМИ, что отражается на форме кривой, выводимой на экран. В начале процесса, пока капля жидкая, ее импеданс пропорционален характеристическому сопротивлению вязкой волны [27]:

$$AMI_{beg} = H1 \cdot (1 + j) \cdot S \cdot \sqrt{2\pi f \eta \rho}, \quad (2)$$

где AMI_{beg} — значение АМИ в начале процесса высыхания.

Обычно для исследуемых жидкостей $\eta \sim 10^{-2}$ Па и $\rho \sim 10^3$ кг/м³. При этих условиях высота капли не влияет на величину АМИ, поскольку при выбранной частоте глубина проникновения вязкой волны имеет порядок 10 м [27]. Поэтому в начале процесса высыхания можно полагать, что в выражении (1) весовой коэффициент $H1 = 1$, а остальные весовые коэффициенты равны нулю: $H2 = H3 = H4 = 0$.

В конце процесса высыхания на поверхности резонатора обычно остается твердотельное отложение. Резонатор при этом нагружается импедансом соколеблющейся массы m_{end} остатка.

$$AMI_{end} = H2 \cdot j \cdot 2\pi f \cdot m_{end}, \quad (3)$$

где AMI_{end} — значение АМИ в конце процесса высыхания; m_{end} — масса сухого остатка. Поэтому в конце процесса высыхания можно полагать, что весовой коэффициент $H2 = 1$, а остальные весовые коэффициенты равны нулю: $H1 = H3 = H4 = 0$.

Соответствие АМИ выражениям (2) и (3) в начале и в конце процесса высыхания было проверено экспериментально по измерениям действительной и мнимой частей электрической проводимости резонатора (или по измерениям действительной и мнимой частей АМИ). Проверка показала, что начальное и конечное значения АМИ, как правило, можно описывать выражениями (2) и (3). Решающим фактором при использовании измерения АМИ в режиме сдвиговых колебаний является чрезвычайная чувствительность его величины к возникновению и росту новой фазы на границе жидкость — кварц, а также к акустическим и механическим свойствам (например, эластичности) образующихся структур (отложений). Динамика фазовых переходов в высыхающей капле получает отображение в виде кривой в координатах АМИ / время. Наши исследования показали, что форма кривой АМИ является паспортной характеристикой жидкости [32–36, 38, 41–43, 49, 54, 55]. Общий вид прототипа прибора представлен на рисунке 3.

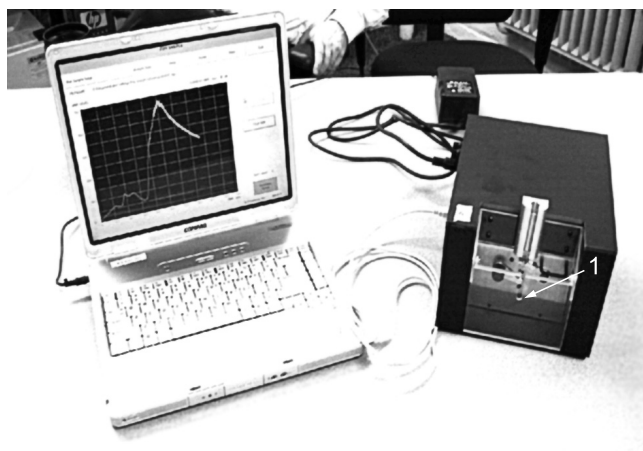


Рис. 3. Внешний вид прототипа устройства.
1 — кварцевый резонатор с высыхающей каплей

Единственным строго контролируемым параметром капли в нашей технологии является ее объем. Обычно мы используем объем 3 μl или 5 μl . Естественно, объем капель сравниваемых между собой жидкостей должен быть одинаковым. Мы размещаем каплю с помощью микродозатора и направляющих его кронштейнов в строго определенное место кварцевой пластины, с небольшой высоты, исключающей разбрызгивание (рис. 4). Мы не лимитируем площадь растекания капли, поскольку она отражает степень смачивания подложки и является одной из важных характеристик жидкости [31]. Поэтому одинаковое качество поверхности сенсора является критичным для данной технологии. Перед началом и после окончания измерения поверхность сенсора последовательно обрабатывается водой и изопропи-

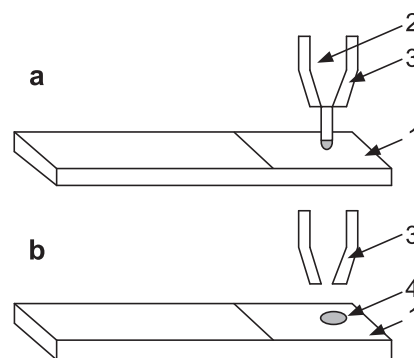


Рис. 4. Схема размещения капли исследуемой жидкости на поверхности кварца.

а — начало выхода капли из микродозатора; б — расположение капли на поверхности кварцевой пластины. 1 — кварцевый резонатор; 2 — микродозатор со стеклянным наконечником, содержащим исследуемую жидкость; 3 — кронштейны, направляющие и поддерживающие микродозатор; 4 — капля жидкости на поверхности кварца

ловым спиртом, после чего тщательно просушивается. Такая процедура обработки поверхности кварца позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты при повторных промерах каплей одной и той же жидкости.

Итак, первый параметр, обеспечивающий информативность «капельной» технологии, — это смачивание поверхности сенсора. При одинаковом объеме каплей сравниваемых жидкостей и разной степени смачивания капли этих жидкостей будут иметь разную форму: одна — более плоскую, с большей площадью основания, другая — более округлую, с меньшей площадью основания. Это непременно обеспечит различие, как в исходной величине сигнала (соотношение 2), так и в динамике структуризации этих капель [6, 30–36, 38, 39, 41–44, 46, 49, 51, 53, 54, 58, 59, 60].

Другим важным параметром, влияющим на динамику АМИ, являются физические свойства формирующихся верхнего и нижнего адсорбционных слоев. Экспериментально доказано [1, 29, 30, 39, 40, 45], что в капле многокомпонентной жидкости происходит перераспределение компонентов жидкой фазы в соответствии с их поверхностной активностью. Концентрация и качественный состав поверхностно-активных веществ (ПАВ), формирующих адсорбционный слой на границе с воздухом, определяют его механические свойства — эластичность и плотность, в разной степени лимитирующие испарение воды, а, следовательно, по-разному влияющие на динамику процессов структуризации. Различные варианты их рассмотрены нами в математической модели [45]. Присутствие ПАВ снижает также поверхностное натяжение на границе жидкость — подложка и угнетает гелеобразование в коллоидной фазе [39] вследствие образования структурно-механического барьера [16], обеспечивающего расклинивающее давление при образовании кластеров. Эти процессы также вносят свой вклад в динамику сигнала АМИ, поскольку размер кла-

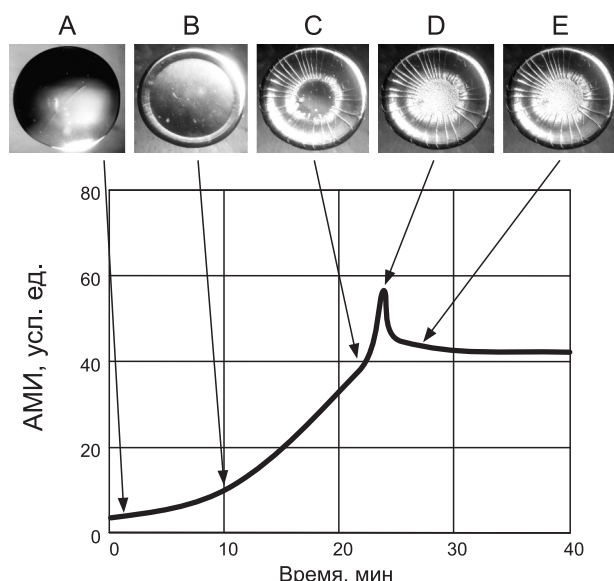


Рис. 5. А–Е — этапы высыхания капли сыворотки крови донора (5 μ л) и соответствующие им участки кривой АМИ (снизу): А–В — формирование белкового валика по периферии и уплощение купола капли; В–С — гелеобразование; С–Д — процесс кристаллизации соли в гелевой матрице; Д–Е — испарение остатков свободной воды и достижение постоянного уровня сигнала. Этот уровень отражает массу капли с рыхлосвязанной водой и силу адгезии осадка к поверхности кварца

стеров существенно влияет на эволюцию структурообразования в высыхающих каплях [31, 51]. Процессы самоорганизации в высыхающих каплях биологических жидкостей, отображаемые сигналом АМИ, полностью обратимы при добавлении воды и хорошо воспроизводимы при повторном высушивании образца [31].

Результаты исследований

Результаты исследования модельных белково-солевых смесей были описаны нами в ряде публикаций [29, 30, 36, 39, 46, 51–54]. В данной статье мы приводим результаты апробации метода в медицинской диагностике [11, 34, 36, 41, 42, 56, 57, 59].

Объем исследования составил 174 пробы, из которых 50 проб взяты у женщин после родов в срок в ранний послеродовой период (не более 2 часов), 36 — у женщин после преждевременных родов (2-й триместр беременности), 10 — у беременных с диагнозом угроза преждевременных родов, 33 — у женщин с нормально протекающей беременностью, 10 — у женщин с диагнозом первичный рак груди 3-й степени (до начала лечения), 6 — у больных раком легких (до начала лечения), 1 — у больного раком 12-перстной кишки, 7 — у пациентов с парапротеинемиями, 7 — у больных гепатитами различной природы. Пробы получали в различных лечебных учреждениях Нижнего Новгорода, доставляли к месту испытаний в термостатируемых контейнерах (+4° С), согревали до комнатной температуры и проводили тестирование. Каждую пробу исследовали трижды. При расчете диагностических показателей учитывали все ре-

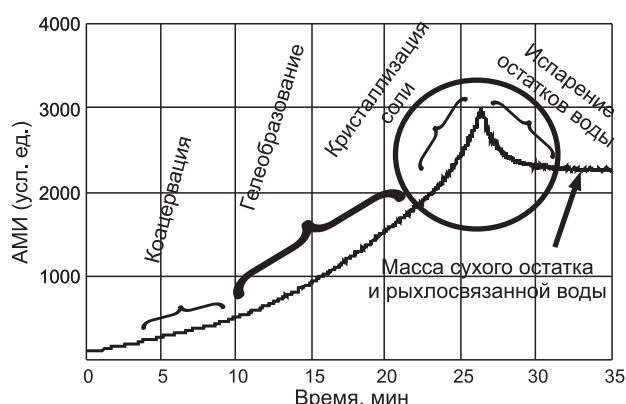


Рис. 6. Схематическое представление соответствия участков кривой АМИ процессам, происходящим в высыхающих каплях биологических жидкостей и модельных альбумино-солевых растворов. Кругом обозначен пик, связанный с кристаллизацией соли

зультаты испытаний. Исследовали также слюну и мочу практически здоровых людей (20 проб), мочу женщин с первичным раком груди 3-й стадии до начала лечения (7 проб), слюну, собранную у больных вирусным гепатитом В (16 проб). Слюну собирали натощак, центрифугировали перед тестированием (10 мин, 1500 об./мин). Все сравниваемые пробы тестировали при одинаковых лабораторных условиях ($T = 18\text{--}22^\circ\text{C}$, $P = 740\text{--}760$ мм рт. ст., $H = 60\text{--}70\%$).

На рисунке 5 показана типичная кривая АМИ высыхающей капли сыворотки (плазмы) крови. Каждому участку кривой соответствуют определенные процессы в высыхающей капле. Более подробная информация о соответствии процессов в высыхающих каплях биологических жидкостей с ходом кривой АМИ / Время представлена на схеме (рис. 6).

Для выявления количественной разницы между разными жидкостями форма кривых АМИ может быть параметризована и представлена в виде чисел на плоскости признаков. В рамках данной работы были использованы специально разработанные алгоритмы (индексы формы, ИФ), отражающие те или иные особенности формы кривых АМИ [30, 52, 53].

На рисунке 7 показаны типичные кривые АМИ плазмы крови для некоторых заболеваний и физиологических состояний по сравнению с референтными эталонами. Контроль воспроизводимости результатов проводили ежедневным тестированием 7% раствора БСА в 0,9% водном растворе NaCl. Ошибка измерений при наших условиях не превышала 5%.

Полученные массивы данных обрабатывали с помощью различных ИФ и результаты статистических различий между пробами представляли на плоскости признаков в координатах разных ИФ. Для каждого заболевания были найдены специфические ИФ, позволявшие наилучшим образом отделять их на плоскости признаков от остального массива данных и не разделявшие при этом другие заболевания. На рисунке 8 показан один

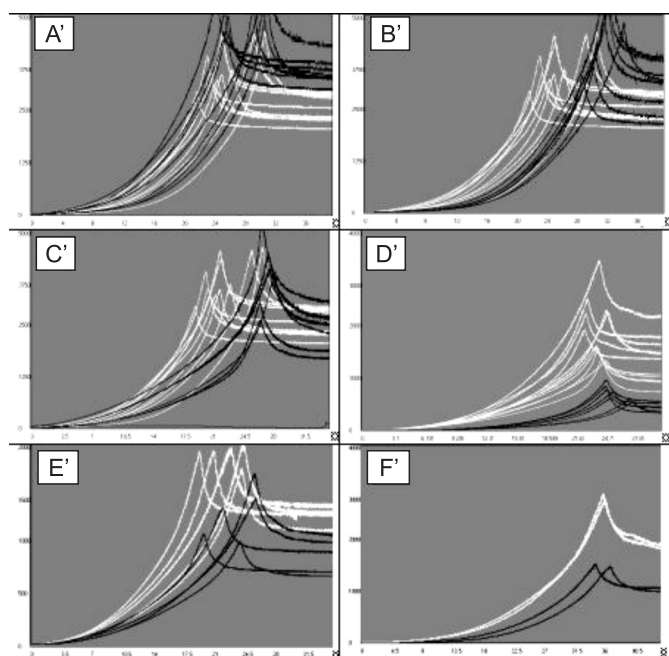


Рис. 7. Необработанные экспериментальные кривые отображения динамики АМИ в процессе высыхания капель сыворотки крови.

Ось Y — АМИ (усл. ед.), ось X — время (мин). А — рак груди (черные кривые) по сравнению со здоровыми (белые кривые); В — рак легких (черные кривые) по сравнению со здоровыми (белые кривые); С — парапротеинемии (черные кривые) по сравнению со здоровыми (белые кривые); D — преждевременные роды (черные кривые) по сравнению с родами в срок (белые кривые); E — гепатит В (черные кривые) по сравнению со здоровыми (белые кривые); F — беременность 34 недели с диагнозом «угроза преждевременных родов» (черные кривые) по сравнению с нормальной беременностью 34 недели (белые кривые), по две капли из каждой сыворотки

затели женщин после нормальных и преждевременных родов (рис. 8, справа). При этом показатели больных другими заболеваниями не отличались от здоровых доноров. Интересно, что, независимо от вида заболевания, результаты исследования капель сыворотки и плазмы крови в координатах ИФ-10 и ИФ-11 располагались на разных лучах (рис. 8, центр). Показано, что ИФ-10 информативен при диагностике угрозы выкидыша и преждевременных родов (рис. 9); ИФ-3 и ИФ-4 позволяют выявлять онкологические заболевания суммарно, но не различают рак легких от рака груди; ИФ-5 позволяет выявлять рак легких и отличать его от рака груди (рис. 10). Разработанное программное обеспечение производит запись, хранение и воспроизведение результатов исследованных жидкостей. Программа «Сплиттер» позволяет представлять базы данных сравниваемых жидкостей на плоскости признаков в координатах выбранных ИФ в автоматическом режиме. Вся процедура обсчета статистических различий с помощью программы «Сплиттер» занимает 1–2 секунды. На рисунках 11 и 12 показаны результаты представления данных с помощью программы «Сплиттер». В соответствии с правилами, изложенными в работе [61], был произведен расчет диагностических показателей АМИ-тестов плазмы крови исследованных пациентов (табл. 1). Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о перспективности развития и необходимости дальнейших испытаний данного методологического подхода для использования его в медицинской экспресс-диагностике. Особую ценность представляет возможность неинвазивной диагностики

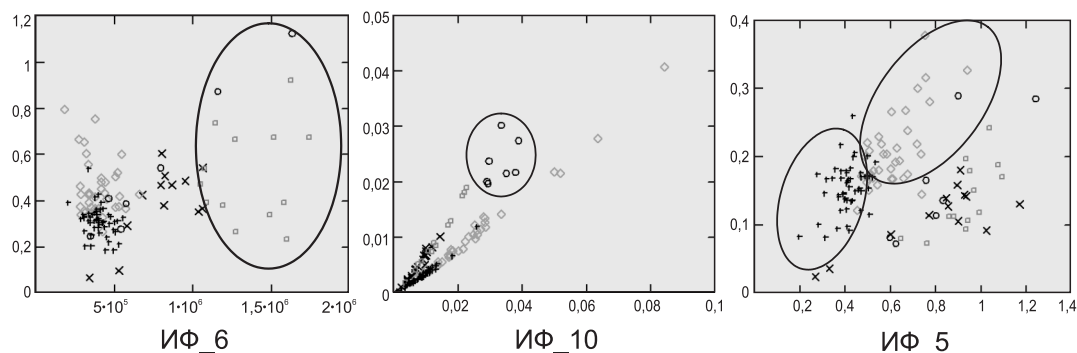


Рис. 8. Представление различных заболеваний и физиологических состояний на плоскости признаков в координатах различных ИФ, по данным регистрации АМИ высыхающих капель сыворотки крови [505]

× × × Доноры, сыворотка
□ □ □ Онкология, сыворотка
◇ ◇ ◇ Нормальные роды, плазма
+ + + Преждевременные роды, плазма
○ ○ ○ Парапротеинемии, сыворотка

и тот же массив данных представленный в координатах разных ИФ. Координаты ИФ-6 и ИФ-11 были подобраны для наилучшего выявления больных онкологическими заболеваниями (рис. 8, слева), в координатах ИФ-11 и ИФ-10 больные парапротеинемиями занимали четко локализованную область (рис. 8, в центре), а в координатах ИФ-5 и ИФ-10 наиболее четко разделялись пока-

затели женщин после нормальных и преждевременных родов (рис. 8, справа). Несмотря на то, что вариабельность этих жидкостей по составу и структуре велика даже у практически здоровых людей, проведение анализа с помощью программы «Сплиттер» в автоматическом режиме позволило выявить различия в форме кривых АМИ в норме и патологии (рис. 13–15).

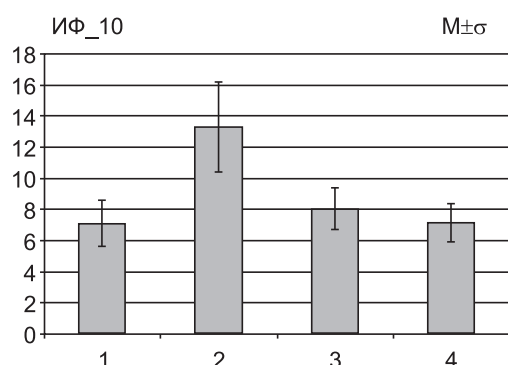


Рис. 9. Величина ИФ-10 кривых АМИ высыхающих капель плазмы крови у женщин в различных физиологических состояниях. 1 — небеременные женщины детородного возраста, 2 — женщины после родов в срок, 3 — угроза преждевременных родов, 4 — после преждевременных родов

Заключение

Проведенное исследование показало, что динамика молекулярной самосборки компонентов жидкостей, высыхающих в виде капель на твердой смачиваемой подложке, содержит информацию об их составе и структуре. Этот феномен получил физическую интерпретацию и прошел экспериментальную проверку. Разработан способ, позволяющий извлекать эту информацию в виде «динамических портретов», представляющих собой паспортную характеристику жидкости. Способ основан на проведении сопоставительного анализа жидкости с эталонной базой данных, собранной при тех же условиях (объем капли, подложка, параметры колебаний сенсора, Т, Р, Н). Приведены примеры возможного использования данного феномена в медицинской диагностике. Особенностью данного подхода является то, что каждый ком-

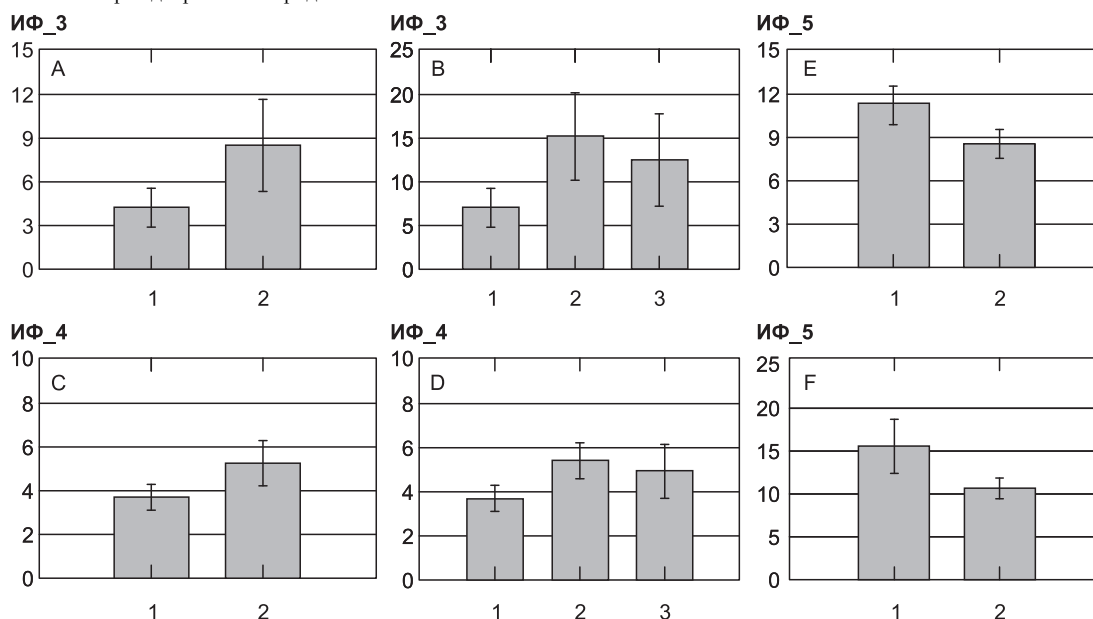


Рис. 10. Величина ИФ кривых АМИ высыхающих капель плазмы крови у больных онкологическими заболеваниями.

А, С — доноры (1) и больные онкологическими заболеваниями (2); В, D — доноры (1), рак груди (2), рак легких (3); Е — доноры (1), рак легких (2); F — рак груди (1), рак легких (2)

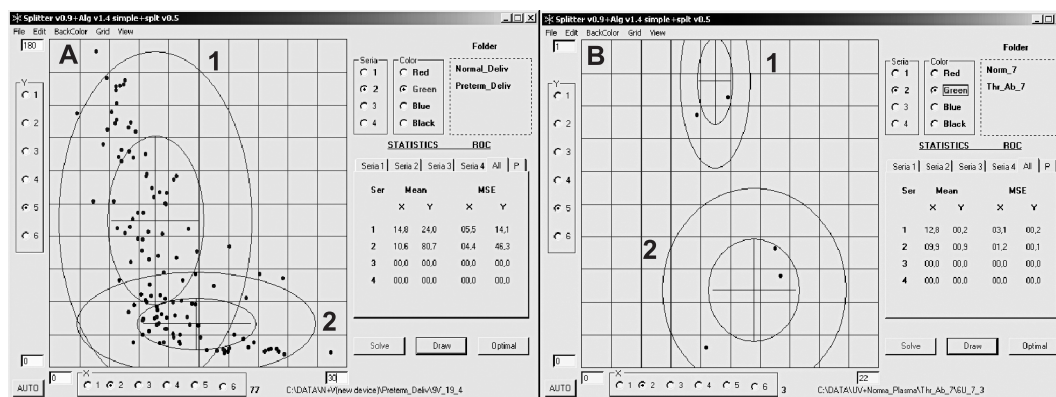


Рис. 11. Интерфейс программы «Сплиттер».

А — распределение данных АМИ-тестов плазмы крови у женщин после преждевременных родов (1) и нормальных родов (2) в координатах ИФ-2 и ИФ-5; В — распределение данных АМИ-тестов сыворотки крови у беременной женщины с диагнозом «угрожающий выкидыш», 7 недель (1) и женщины с нормально протекающей беременностью, 7 недель (2) в тех же координатах ($M \pm 2\sigma$)

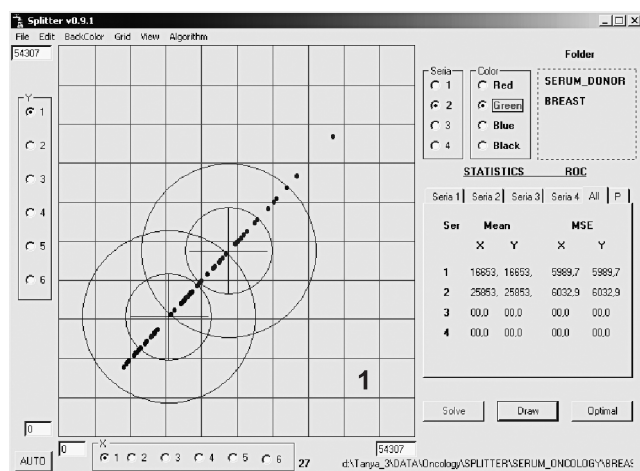


Рис. 12. Интерфейс программы «Сплиттер». Распределение данных АМИ-тестов плазмы крови у женщин с диагнозом рак груди (1) и практически здоровых женщин детородного возраста (2) в координатах ИФ_1 ($M \pm 2\sigma$)

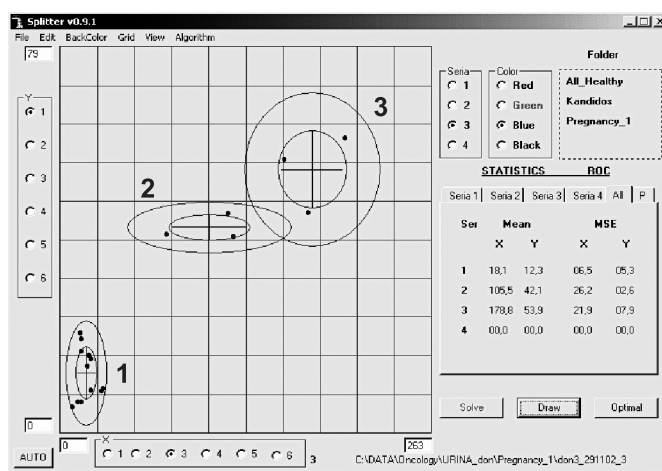


Рис. 14. Интерфейс программы «Сплиттер». Распределение результатов тестирования мочи женщин на плоскости признаков в координатах ИФ_1/ИФ_3: (1) – здоровые небеременные женщины; (2) – данные беременной женщины; (3) – данные женщины, больной кандидомикозом ($M \pm 2\sigma$)

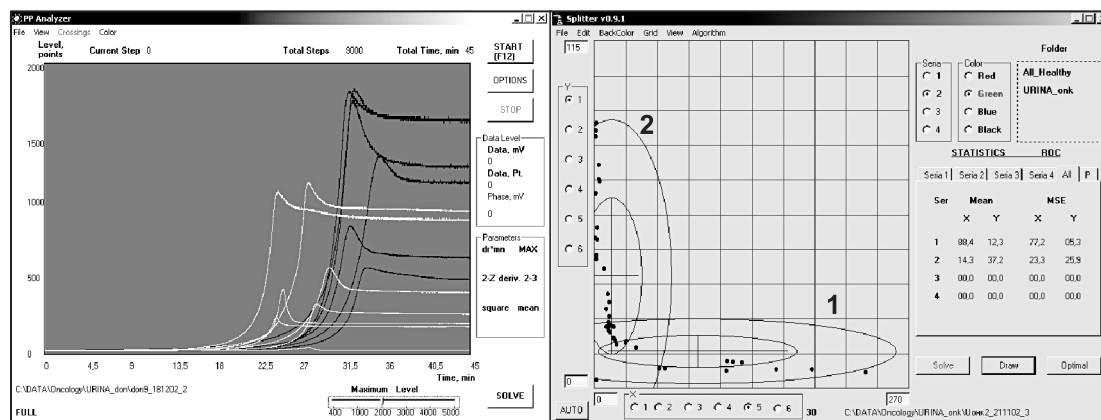


Рис. 13. Интерфейс программы «Сплиттер». Слева – кривые АМИ каплей мочи практически здоровых женщин (белые) и женщин с первичным раком груди (черные); справа – распределение полученных данных на плоскости признаков в координатах ИФ_1/ИФ_5. (1) – здоровые, (2) – больные ($M \pm 2\sigma$)

Таблица 1

Диагностические показатели АМИ-тестов плазмы крови

Группы сравнения		Чувствительность	Специфичность	Прогноз заболевания (PPV)	Прогноз здоровья (NPV)
Группа 1 (к-во чел.)	Группа 2 (к-во чел.)				
Роды в срок (50)	Преждевременные роды (36)	83	92	88	89
Нормальная беременность (33)	Угроза преждевременных родов (10)	98	57	67	97
Доноры (15)	Парапротеинемия (7)	100	100	100	100
Доноры (15)	Онкология (17)	76	100	100	74
Доноры (15)	Рак груди (10)	92	86	86	92
Доноры (15)	Рак легких (5)	96	73	87	92
Рак груди (10)	Рак легких (5)	93	73	67	95
Доноры (15)	Гепатиты (7)	96	88	90	96

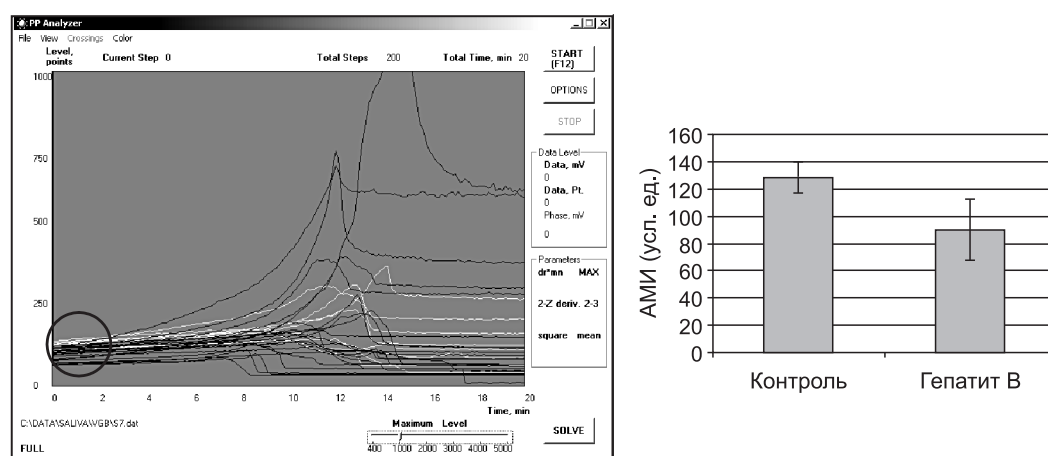


Рис. 15. Интерфейс программы «Сплиттер». Слева — кривые АМИ капель слюны практически здоровых доноров (белые) и больных гепатитом В (черные); справа — различия в значениях АМИ ($M \pm \sigma$) в начале высыхания капель (отмечено кружком)

понент исследуемой жидкости вносит свой специфический вклад в динамику самосборки. Это относится и к специфическим маркерам заболеваний, что позволяет отличать не только больных от здоровых, но и находить признаки, свойственные тем или иным заболеваниям. При этом сам динамический процесс играет роль «усилителя», позволяющего визуализировать наличие компонентов, присутствующих в жидкости в ничтожных концентрациях.

Авторы благодарны сотрудникам НижГМА и лечебных учреждений Нижнего Новгорода, в разные годы принимавшим участие в проведении испытаний данного метода.

Литература

1. Адамсон А. Физическая химия поверхностей. — М: Мир, 1979. — 567 с.
2. Алексеев С.Г., Брандт Н.Б., Миронова Г.А., Акимото Х., Акимото К. Способ диагностики онкологических заболеваний и устройство для его осуществления. Патент RU (11) 2132635 (13) С1. Дата публ. 07.10.1999.
3. Бажора Ю.И., Кресюн В.И., Носкин Л.А., Годован В.В., Андронов Д.Ю., Волошенков Б.А. Лазерная корреляционная спектроскопия — новый метод мониторинга в токсикологии // Современные проблемы токсикологии. — 1998. — № 2. — С. 7–11.
4. Биленко А.А. Диагностические возможности лазерной корреляционной спектроскопии в клинической медицине // Вестн. проблем биологии и медицины. — 1997. — № 30. — С. 20–32.
5. Биленко А.А. Применение лазерной спектроскопии плазмы крови для отбора больных раком прямой кишки с колостомой для выполнения восстановительной операции // Клин. хирургия. — 1998. — № 11. — С. 19–21.
6. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — Л.: Медицина, 1978. — 294 с.
7. Зубаренко А.В., Бажора Ю.И., Коваленко Н.Б., Андронов Д.Ю., Романчук А.П. Лазерная корреляционная спектроскопия в диагностике плазменного гомеостаза при остром воспалении // Медицинская реабилитация, курортология, физиотерапия. — 1998. — № 3. — С. 49–50.

8. Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д. Поверхностные явления в белковых системах. — М.: Химия, 1988. — 240 с.
9. Краткая медицинская энциклопедия / под ред. Б.П. Петровского, 2 изд. — М.: Советская энциклопедия, 1989. — <http://www.golkom.ru/kme/>
10. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. — К.: Наукова думка, 1987. — 256 с.
11. Обухова Л.М., Эдалев Н.С., Конов А.С., Яхно Т.А., Шапошникова О.Б. Некоторые параметры сыворотки крови при отравлении наркотическими веществами // Кристаллизация для нанотехнологий, техники и медицины: тезисы докл. V Межд. научной конф., 23–26 сентября 2008, Иваново. — Иваново, 2008. — С. 230.
12. Потехина Ю.П., Зубеев П.С., Страхов А.В., Бузоверя М.Э., Яхно Т.А., Щербак Ю.П. Кристаллографический анализ биологических жидкостей при желчнокаменной болезни // Международный медицинский журнал. — 2000. — № 5. — С. 469–473.
13. Рапис Е. Белок и жизнь (самоорганизация, самосборка и симметрия наноструктурных супрамолекулярных пленок белка). — Иерусалим: Филобиблон, 2003. — 200 с.
14. Рапис Е.Г. Микрокристаллический способ исследования стекловидного тела глаза человека и животных в норме и при геомофтальме // Вестник офтальмологии. — 1976. — № 4. — С. 62–64.
15. Рапис Е.Г. Образование упорядоченной структуры при высыхании пленки белка // Письма в ЖТФ. — 1988. — Т. 14, № 17. — С. 1560–1564.
16. Ребиндер П.А. Избр. труды. Поверхностные явления в дисперсных системах. Коллоидная химия. — М., 1978. — 390 с.
17. Романчук А.П. Результаты применения метода лазерной корреляционной спектроскопии в спорте // Теория и практика физической культуры. — 2002. — № 1. — С. 3–11.
18. Савина Л.В. Кристаллоскопические структуры сыворотки крови здорового и больного человека. — Краснодар: Советская Кубань, 1999. — 96 с.
19. Савина Л.В. Ксенопротеинография как способ наблюдения за сывороточной системой крови // Лаб. дело. — 1987. — № 8. — С. 576–579.
20. Савина Л.В., Гольфельд Н.Г., Кострова Ю.А. Морфотипы кристаллограмм сыворотки крови при диабетической офтальмопатии // Офтальм. журнал. — 1987. — № 6. — С. 353–355.
21. Кристаллографические методы исследования в медицине: Сборник научных трудов 1-й научно-практической конференции. — М.: МОНИКИ, 1997. — 170 с.

22. Спиридонов М.В., Певгов В.Г., Батурин А.С., Григорьев Г.К. Исследование молекулярных комплексов сыворотки крови методами лазерной корреляционной спектроскопии и атомно-силовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. — 2009. — № 6. — С. 37–43.
23. Тахауов Р.М., Семенова Ю.В., Карпов А.Б., Носкин Л.А. Доклиническая диагностика гомеостатического дисбаланса у работников плутониевого производства // Сибирский медицинский журнал. — 2003. — № 5. — С. 90–95.
24. Терновой К.С., Крыжановский Г.Н., Музычук Ю.И., Носкин Л.А., Клопов Н.В., Носкин В.А., Стародуб Н.Ф. Классификация результатов исследования плазмы крови с помощью лазерной корреляционной спектроскопии на основе семиотики предклинических и клинических состояний // Укр. биохим. жур. — 1998. — № 2. — С. 53–65.
25. Терновой К.С., Селезнева Т.Н., Аклев А.Б., Пашков И.А., Носкин Л.А., Клопов Н.В., Носкин В.А., Стародуб Н.Ф. Сравнительный анализ семиотических сдвигов, устанавливаемый при ЛКС-исследовании плазмы крови случайных выборок из зон Чернобыльской аварии, Уральского радиационного следа и сотрудников С.-Петербургского института ядерной физики РАН // Укр. биохим. жур. — 1998. — № 3. — С. 81–85.
26. Титов В.Н., Карганов М.Ю., Ротенко А.А., Дмитриев В.А., Алчинова И.Б., Архипова Е.Н. Биологические функции и биологические реакции. Лазерная корреляционная спектроскопия в оценке чистоты межклеточной среды — функции эндозологии (лекция) // Клин. лаб. диагностика. — 2009. — № 6. — С. 21–35.
27. Физическая акустика. Т. 1. Методы и приборы ультразвуковых исследований / под ред. У. Мэзон. — М.: Мир, 1960. — 370 с.
28. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. — М.: Хризостом, 2001. — 300 с.
29. Яхно Т.А., Казаков В.В., Санин А.Г., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. Сравнительная оценка механических свойств адсорбционных слоев в растворах белков сыворотки крови человека // ЖТФ. — 2007. — Т. 77, № 4. — С. 119–122.
30. Яхно Т.А., Казаков В.В., Санин А.Г., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях растворов белков сыворотки крови человека // ЖТФ. — 2007. — Т. 77, № 4. — С. 123–127.
31. Яхно Т.А., Санин А.Г., Vacca C.V., Falcione F., Санина О.А., Казаков В.В., Яхно В.Г. Новая технология исследования многокомпонентных жидкостей с использованием кварцевого резонатора. Теоретическое обоснование и приложения // ЖТФ. — 2009. — Т. 79, № 10. — С. 22–29.
32. Яхно Т.А., Санин А.Г., Пелюшенко А.С., Шапошникова О.Б., Чернов А.С., Яхно В.Г. Кварцевый резонатор без специального покрытия как универсальный биосенсор // Альманах клинической медицины. — Т. XII. 2-я Троицкая конференция «Медицинская физика и инновации в медицине». — С. 139.
33. Яхно Т.А., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. Влияние факторов внешней среды на динамические параметры кристаллизации солей в высыхающих каплях солевых и белково-солевых растворов // III Съезд биофизиков России, 24–29 июня 2004. Воронеж. Тезисы докл. — Т. II. — Воронеж, 2004. — С. 748–749.
34. Яхно Т.А., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. Динамические параметры структуризации высыхающих капель биологических жидкостей как критерий для медицинской диагностики // III Съезд биофизиков России, 24–29 июня 2004. Воронеж. Тезисы докл. — Т. II. — Воронеж, 2004. — С. 602–604.
35. Яхно Т.А., Санин А.Г., Шапошникова О.Б. Фазовые переходы белка в модельной системе (высыхающая капля) и их возможное биологическое значение // Тезисы докладов и сообщений, представленные на II съезде Общества клеточной биологии совместно с юбилейной конференцией, посвященной 50-летию Института цитологии РАН. Санкт-Петербург. 16–19 октября 2007 // Цитология. — 2007. — Т. 49, № 9. — С. 808–809.
36. Яхно Т.А., Санин А.Г., Яхно В.Г. Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях биологических жидкостей: физико-химические основы, способ регистрации и извлечения диагностической информации // Медицина в зеркале информатики. — М.: Наука, 2008. — С. 63–78.
37. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Левин Г.Я., Корочкина О.В., Бузоверея М.Э. Динамика процессов самоорганизации биожидкостей в норме и при некоторых заболеваниях // Материалы 4-й Междунар. конф. по математическому моделированию, 27 июня–1 июля 2000. — М.: МГТУ «Станкин», 2001. — Т. 2. — С. 265–275.
38. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Пелюшенко А.С., Шапошникова О.Б., Соколов А.А. Философия высыхающей капли. Физико-химические основы и прикладные решения // Тезисы докл. Десятой междисциплинарной научной конференции «Нелинейный мир». — Нижний Новгород, 27 июня–2 июля 2005. — С. 159.
39. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Пелюшенко А.С., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. Феномен высыхающей капли и возможности его практического использования // Нелинейный мир. — 2007. — № 1–2. — С. 47–54.
40. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. Белок и соль: пространственно-временные события в высыхающей капле // ЖТФ. — 2004. — Т. 49, № 8. — С. 1055–1063.
41. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. Диагностические возможности процесса самоорганизации капель биологических жидкостей // Тезисы докл. 1-й Троицкой конференции по медицинской физике, 19–21 мая 2004. — Троицк, Московской области. — 2004. — С. 69.
42. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях как информативный критерий оценки качества жидкостей // Тезисы докл. 1-й Троицкой конференции по медицинской физике, 19–21 мая 2004. — г. Троицк, Московской области. — 2004. — С. 70.
43. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. Динамика структуризации высыхающих капель как информативный параметр в исследовании жидких сред // III Съезд биофизиков России, 24–29 июня 2004. Тезисы докл. Т. II. — Воронеж. — С. 604–605.
44. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Шмелев И.И. Исследование динамики фазовых переходов жидкостей разного типа методом регистрации акустомеханического импеданса высыхающей капли // Биофизика. — 2002. — Т. 47, № 6. — С. 1101–1105.
45. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Соколов А.В. Процессы формообразования в высыхающих каплях сыворотки крови в норме и патологии // Биофизика. — 2005. — Т. 50, № 4. — С. 726–734.
46. Яхно Т.А., Яхно В.Г. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей // ЖТФ. — 2009. — Т. 79, № 8. — С. 133–141.
47. Kazakov V.N., Fainerman V.B., Kondratenko P.G., Elin A.F., Sinyachenko O.V., Miller R. Dilational rheology of serum albumin and blood serum solutions as studied by oscillating drop tensiometry // Colloids Surf. B. — 2008. — V. 62. — P. 77–82.
48. Miller R. In honor of the 65th birthday of Valentin B. Fainerman // Advances in Colloid and Interface Science. — 2011. — V. 163. — P. 85–89.
49. Sanin A., Yakhno T., Vacca C., Falcione F., Shaposhnikova O. Drying Drops-2: Technical Approach for Registering the Dynamics of Phase Transitions // Topical problems of biophotonics-2007: Proc. Int. Symp. Nizhny Novgorod–Moscow–Nizhny Novgorod. Russia. 4–11 August. 2007. — IAP RAS. — 2007. — P. 95–96.

50. Yakhno T. Protein Phase Instability Developed in Plasma of Sick Patients: Clinical Observations and Model Experiments // *Natural Science*. — 2010. — N 3. — P. 220–227. Also available: <http://www.scrip.org/journal/NS>.
51. Yakhno T. Salt-induced protein phase transitions in drying drops // *Journal of colloid and interface science*. — 2008. — V. 318. — P. 225–230.
52. Yakhno T., Sanin A., Kazakov V., Sanina O., Yakhno V., Vacca C., Falcone F. Uncoated quartz resonator as a universal biosensor // *Intelligent and Biosensors* / ed. by Vernon S. — Somerset, 2010. — P. 386. <http://www.scrip.org/articles/show/title/uncoated-quartz-resonator-as-a-universal-biosensor>.
53. Yakhno T., Sanin A., Pelyushenko A., Kazakov V., Shaposhnikova O., Chernov A., Yakhno V., Vacca C., Falcone F., Johnson B. Uncoated quartz resonator as a universal biosensor // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2007. — V. 22, N 9–10. — P. 2127–2131.
54. Yakhno T., Sanin A., Vacca C., Falcione F., Shaposhnikova O. Drying Drops-1: Physical-Chemical Basis of Structural Evolution in Biological Liquids // *Topical problems of biophotonics-2007: Proc. Int. Symp. Nizhny Novgorod–Moscow–Nizhny Novgorod. Russia. 4–11 August 2007*. — IAP RAS. — 2007. — P. 93–94.
55. Yakhno T., Sanin A., Vacca C., Falcione F., Shaposhnikova O. Drying drops-3: Some Experimental Data and Possible Applications of the Technology // *Topical problems of biophotonics-2007: Proc. Int. Symp. Nizhny Novgorod–Moscow–Nizhny Novgorod. Russia. 4–11 August. 2007*. — IAP RAS. — 2007. — P. 97–98.
56. Yakhno T., Sanin A., Yakhno V., Pelyushenko A., Dowell M., Vacca C., Goutorova V. Drying drops of biological liquids: dynamics of optical and mechanical properties. Application in rapid medical diagnostics // *Proc. SPIE. V. 5692. BIOS-2005. Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems III*, 20–26 January 2005. San Jose. California. USA, 2005. — P. 188–198.
57. Yakhno T., Sanin A., Yakhno V., Pelyushenko A., Egorova N.A., Terentiev I.G., Smetanina S.V., Korochkina O.V., Yashukova E.V. The informative-capacity phenomenon of drying drops. Aptitude test in medical diagnostics // *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*. — 2005. — V. 24, N 2. — P. 96–104.
58. Yakhno T.A., Sanin A.G., Sarvazyan A.P. Dynamic quartz crystal microbalance sensor // *IEEE International Ultrasonics Symposium, October 5–8 2003. Hilton Hawaiian Village. Honolulu. Hawaii. Abstracts*. — P. 36.
59. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Sanin A.G., Sanina O.A., Pelyushenko A.S. A Method for Liquid Analysis by means of Phase Transitions during drop drying // *Proc. SPIE. Bioengineered and Bioinspired Systems*, 19–21 May 2003. Maspolamas. Gran Canaria. Spain. — 2003. — V. 5119. — P. 87–99.
60. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Sanin A.G., Sanina O.A., Pelyushenko A.S. Experimental study of phase transitions in drying drops of multi-component liquids. A new approach and useful applications // *Topical Problems of nonlinear wave physics: Proc. International Symposium. NWP-1. 2–9 August 2005. St.-Petersburg–Nizhny Novgorod. Russia*. — N. Novgorod. — P. 109–110.
61. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine // *Clinical chemistry*. — 1993. — V. 39. — P. 561–577.

ТЕЗИСЫ
конференции «Биохимия — Биофизика — Информатика —
три кита лабораторной медицины XXI века»

ДИАГНОСТИКА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА МЕТОДОМ АНАЛИЗА
ПРОТЯЖЕННЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК, ВЫЯВЛЕННЫХ В СТУЛЕ ПАЦИЕНТОВ

Г.М. Бутрович, О.А. Вострюхина

Санкт-Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, Гатчина
galia_3001@mail.ru

Целью нашего исследования является разработка процедуры неинвазивного молекулярно-генетического анализа фекальной ДНК, способного идентифицировать генетические изменения, сопряженные с развитием колоректального рака (КР) у человека.

Опухолевые клетки, выделенные из стула человека, содержат менее деградированную ДНК, нежели клетки здоровых тканей. При амплификации ДНК, выявленной в фекалиях, для получения фрагментов длиной более 700–800 н. п., матрицей служит преимущественно ДНК злокачественных клеток [1]. Следовательно, протяженные фрагменты ДНК могут свидетельствовать о наличии КР, а также обеспечить возможность анализа молекулярных маркеров, специфичных для КР. В качестве анализируемых маркеров нами были выбраны микросателлит BAT26 (5-й интрон гена *hMSH2*) и пять экзонов гена *Trp53* [2–4]. Для верификации диагностической процедуры планируется анализировать операционный материал тех же пациентов (гистологически охарактеризованные парафиновые срезы). Пробы фекалий и парафиновые срезы были получены из ФГУ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Росмедтехнологий. Выделение геномной ДНК из фекальных образцов проводили с использованием кита «Ompix» (Омникс). Протяжен-

ные фрагменты амплифицировали при помощи «Encyclo PCR kit» (Евроген). Для выявления повреждений ДНК в анализируемых участках применялись методы SSCP и электрофореза в денатурирующих условиях.

В ходе работы анализировали 12 образцов стула пациентов, имеющих КР (в 11 случаях были выявлены протяженные фрагменты ДНК) и 4 образца от онкологически здоровых людей (в 1-м случае были обнаружены протяженные фрагменты). Чувствительность и специфичность метода, определенные с помощью программы Graphpad Instat, составили соответственно 91% и 75% ($P = 0,0269$ с уровнем статистической достоверности более 95%, метод Фишера).

Апробация метода на клиническом материале продемонстрировала чувствительность и специфичность, достаточные для выявления КР.

Исследование поддержано грантом Министерства образования и науки РФ № 2.2.1.1/11.16.

1. Boynton K.A. et al. Clinical Chemistry. 2003. 49(7), 1058–1065.
2. Calistri D. et al. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2010. 19 (10), 2647–54.
3. Koga Y. et al. Jpn J. Clin. Oncol. 2009. 39 (1), 62–69.
4. Sung Whan An et al. Yonsei Med. J. 2009. 50 (3), 331–334.

ТЕХНОЛОГИЯ АНАЛИЗА ФРАКЦИИ ОБЩЕГО ГОМОЦИСТЕИНА,
СВЯЗАННОГО С КРУПНОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ

А.А. Жлоба, Э.А. Блашко, Е.Г. Маевская

ГОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Росздрава

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий
Zhloba@mail.spbnit.ru

В настоящее время в лабораторной диагностике используют анализ общего гомоцистеина (оГци), включающий связанный с белками Гци. Этот анализ не вполне удовлетворяет своей информативностью.

Цель работы — изучить технологию анализа фракции Гци в составе крупномолекулярной фракции белков плазмы крови (фГци).

Материал — плазма крови пациентов с гипергомоцистеинемией (ГГци) ($N = 7$) от 15 до 20 мкМ, с ГГци ($N = 7$) от 20 до 70 мкМ.

Методы исследования. Отделение крупномолекулярной фракции проводили с использованием ультрафильтрации через Vivaspin 100 MVCO PES и 300 MVCO PE (Sartorius, Германия). Фракции получали центри-

фугированием 500 мкл образца в течение 30 минут при 5000 g, 22° С. Определение Гци и его фракций проводили ВЭЖХ-анализом на оборудовании Agilent 1100 (США).

Результаты. При использовании фильтров 300 MVCO PES в низкомолекулярную фракцию при ГГци от 15 до 20 мкМ в среднем попадает 37% данного аминокислоты, тогда как для фильтров 100 MVCO PES эта цифра примерно в два раза ниже, что свидетельствовало о недостаточной фильтрации Гци. При использовании фильтров 300 MVCO PES в низкомолекулярной фракции с уровнем оГци от 15 до 20 мкМ в среднем выявляли $6,9 \pm 1,8$ мкМ Гци, а в образцах с уровнем оГци от 20 до 70 мкМ ($34,9 \pm 10,5$) через поры проходило в среднем $13,0 \pm 3,5$ мкМ (37%). При этом наблюдались существенные различия внутри группы с высокой ГГци в удержи-

вании Гци в крупномолекулярной фракции. Во фракции, проходящей через поры, полученной от всех образцов, Гци не коррелировал с уровнем оГци, как при умеренной ГГци ($R = -0,70, p > 0,05$), так и при средней ГГци ($R = -0,55, p > 0,05$) и соответственно в удерживаемой.

Выводы. Оценка связывания гомоцистеина фракцией белков крови методом ультрафильтрации с последующим ВЭЖХ-анализом позволяет установить долю Гци, которая может быть связана белками, не утилизирующимися, подобно альбумину, в печени, а белками, поступающими путем рецепторного эндоцитоза в другие клетки. Оценка фильтруемости Гци вместе с крупномолекулярными белками в отличие от оценки оГци в большей степени отражает возможность повышения концентрации Гци в клетках, экспрессирующих подобно макрофагам LRP-рецептор.

НЕКОТОРЫЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

А.И. Шихлярова, Г.Я. Марьяновская, А.П. Барсукова,

Е.П. Коробейникова, Т.П. Протасова, Е.А. Шейко

ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт

Минздравсоцразвития России»

(863) 251-96-33, rnioi@list.ru

Цель работы состояла в метаболическом обосновании процесса ингибирования опухолевого роста на основе биофизических механизмов восприятия сигнала квантово-волновой природы и отклика систем различных иерархических уровней [1]. Задачи работы включали разработку мультимодальных алгоритмов воздействия сверхнизкочастотных магнитных полей, режимов оптического некогерентного излучения, локальной электростимуляции (СКЭНАР) на моделях перевивных и индуцированных опухолей у крыс. Проводили мониторинг роста опухоли и выявили эффект торможения в 50–70% случаев и полной регрессии в 32–40% случаев при 100%-м росте в контроле. Реализация противоопухолевого эффекта сопровождалась нормализацией соотношения показателей ключевых ферментных систем энергетического и перекисного метаболизма мозга, печени, крови, органов тимико-лимфатической и эндокринной

систем. В 89% случаев наблюдалось формирование интегральных антистрессорных адаптационных реакций, что превышало в 6,9 раза показатели контроля. Отмечено восстановление системных свойств радиальной симметрии в твердотельных образцах сыворотки крови. Полученные результаты указывают на системообразующее влияние и упорядоченность процессов, нарушенных опухолью, аргументируют роль электромагнитных флуктуаций в повышении противоопухолевой резистентности и позволяют предложить новые вспомогательные подходы в лечении и реабилитации онкобольных.

Литература

1. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С., Шихлярова А.И. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации. — Екатеринбург: Филантроп, 2002. — 196 с.

**КОРРИГИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ОПТИКО-МАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА УРОВЕНЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ
ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АУТОГЕМОХИМИОТЕРАПИИ (АГХТ)
БОЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

А.И. Шихлярова, С.М. Кечеджиева, Г.Я. Марьяновская, А.П. Барсукова, Е.П. Коробейникова
ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт
Минздравсоцразвития России»
(863) 295-54-41, rnioi@list.ru

Глубокая раковая и лекарственная интоксикация вызывает ингибирование дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий клеточных систем организма. Целью работы явилась коррекция нарушений энергетического статуса лимфоцитов крови путем активации оптико-магнитными излучениями (ОМИ) акцепторных ферментов цикла Кребса в условиях медикаментозной нагрузки у больных раком молочной железы. В задачи входило изучение активности митохондриальных сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и α -глицерофосфатдегидрогеназы (α -ГФДГ) лимфоцитов (ЛФ) крови [1] при использовании оригинальной технологии ОМИ с длиной волны 670 нМ в дозе 1,5 мкд. Уже после первого курса АГХТ в сочетании с ОМИ уровень СДГ увеличился до $28,0 \pm 2,7$ у.е. против $4,0 \pm 0,96$ у.е. в контроле ($p < 0,001$). Уточненной характеристикой вовлеченности

СДГ в процесс окисления янтарной кислоты как донора электронов явился коэффициент соотношения активированных лимфоцитов (J_a) и лимфоцитов, опустошенных гранулами (J_0): $K = J_a/J_0$, который возрос в 1,9 раза по сравнению с фоном и в 2,3 раза — с контролем (без ОМИ). Проведенные исследования указывали на эффективность нового физико-фармакологического подхода, способствующего коррекции энергетического метаболизма иммунокомпетентных клеток, имеющих важное значение в повышении противоопухолевой резистентности.

Литература

1. Митохондриальные болезни (взгляд цитохимика) / под ред. Р.П. Нарциссова. — М., 1999. — С. 5–14.

**NGAL — «РЕНАЛЬНЫЙ ТРОПОНИН», РАННИЙ МАРКЕР
ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК:
АКТУАЛЬНОСТЬ ДЛЯ НЕФРОЛОГИИ И КАРДИОХИРУРГИИ**

В.В. ВЕЛЬКОВ

ЗАО «ДИАКОН», г. Пушкино, Московская область

Резюме. Обзор, посвященный новому ренальному биомаркеру — NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin — липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, другое название — липокалин 2). Данный белок является компонентом острой фазы воспаления, принимает участие в процессах, связанных с регуляцией пролиферации поврежденных клеток, и также может оказывать бактериостатическое действие. При развитии острого повреждения почек (ОПП) ишемической, нефротоксической или другой этиологии повышенный уровень NGAL с кровотоком поступает в почки и стимулирует дифференцировку и восстановление поврежденных ренальных эпителиальных клеток. Одновременно при ОПП NGAL начинает синтезироваться в дистальном нефроне, через 2 часа в больших количествах поступает в мочу и тем самым препятствует развитию инфекций мочеполового тракта. Такое повышение уровня NGAL в моче является ранним диагностическим указанием на развитие ОПП.

Особо важное применение измерение уровней NGAL находит при кардиохирургических операциях, сопряженных с применением аппарата искусственного кровообращения и, как следствие, связанных с большим риском ишемического поражения почек. NGAL также применяется как ранний маркер: 1) необходимости диализа, 2) нефротоксического повреждения почек при применении рентгено-контрастных препаратов, 3) нефротоксичности фармакопрепаратов, 4) отсроченной функции трансплантата при трансплантации почки, 5) развития посттравматического ОПП, 6) развития ОПП, связанного с сепсисом, септическим шоком и с другими критическими состояниями.

Ключевые слова: NGAL, липокалин 2, острая почечная недостаточность, острое повреждение почек, кардиохирургия, диагностика.

**NGAL — THE RENAL TROPONIN: THE EARLY MARKER OF THE ACUTE KIDNEY INJURY:
THE URGENCY FOR NEPHROLOGY AND CARDIAC SURGERY**

V.V. VELKOV

ZAO «DIAKON», Pushchino, Moscow region, Russia

Summary. Review is devoted to new renal biomarker — NGAL — neutrophil gelatinase-associated lipocalin. It is lipocalin associated with neutrophils gelatinase and its other name is lipocalin 2. This protein is a component of acute inflammatory phase; it participates in processes related with regulation of affected cells proliferation. It also has bacteriostatic properties. In acute kidneys injury of ischemic, nephrotoxic and other aethiology the elevated level of NGAL comes to kidneys with the blood flow and stimulates the differentiation and reparation of the affected renal epithelial cells. Also its synthesis starts in distal nephron and in 2 hours its high concentration can be found in urine. The result is protection of urogenital tract from infections. Thus, elevation of NGAL in urine can be considered as early diagnostic sign pointing on acute renal injury development. The most important role NGAL evaluation plays in cardiosurgery, in operations with the use of external blood circulation and, as a result, high risk of ischemic affection of kidneys. NGAL can be also used as an early marker of 1) necessity of dialysis, 2) nephrotoxic effect of radiological contrast drugs, 3) nephrotoxicity of pharmacological drugs, 4) delayed function of transplan in kidney transplantation 5) development of posttraumatic acute renal injury 6) acute renal injury related to sepsis, septic shock and other emergency conditions.

Key words: NGAL, lipocalin 2, acute renal failure, acute kidney injury, cardiac surgery, diagnostics.

Данные для корреспонденции:

Вельков Василий Васильевич, к.б.н., директор по науке ЗАО «ДИАКОН»,
142290, Московская обл., г. Пушкино, пр. Науки, 5,
тел.: (905)501-82-05, e-mail: vvv@diakonlab.ru

ЧАСТЬ 1

Острое повреждение почек: новый термин и старые проблемы

Острое повреждение почек (ОПП) — это новый термин, принятый в зарубежной медицине, которым обозначается внезапное прекращение или резкое снижение функций почек.

В отечественной практике эта патология традиционно обозначается как острая почечная недостаточность (ОПН). ОПН — комплекс синдромов, характеризующихся быстрым (за несколько часов или дней) и резким (в несколько раз) падением скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Такое прекращение или снижение функций почек может происходить как без видимых предшествующих признаков надвигающейся почечной дисфункции, так и при развитии осложнений у пациентов с хроническими заболеваниями почек (ХПЗ).

Причинами ОПП могут быть: 1) малый объем крови, поступающей в артерии почки, что вызывает их ишемию, 2) действие воспалительных и нефротоксичных факторов, 3) действие нефротоксичных лекарственных препаратов, например, некоторых рентгенконтрастных веществ, 4) обструкция (окклюзия) мочевых путей, в частности увеличение простаты и др. В зависимости от своей тяжести ОПП может приводить к следующим осложнениям: 1) метаболический ацидоз, 2) высокий

уровень калия, 3) нарушения баланса жидкостей тела, 4) вредное влияние на другие системы органов [1].

Традиционно ОПП диагностируется на основе: 1) уменьшения продукции мочи, т.е. развития олигурии (суточный диурез менее 500 мл) или анурии (менее 50 мл в сутки), 2) повышения в крови азота мочевины и 3) повышения уровня креатинина в сыворотке крови. Существует около 30 различных критериев ОПН, которые выделяют как ее тяжелые формы, при которых необходим диализ, так и относительно умеренные формы, связанные с повышением сывороточного креатинина и со снижением СКФ.

Большинство критериев ОПН основаны на повышении концентраций сывороточного креатинина, включая его повышение на > 25% или на > 50% над базовым уровнем, и/или на 50% снижении СКФ. Ясно, что в зависимости от конкретных диагностических значений того или иного критерия ОПН могут формулироваться и различные клинические решения. Для решения этой проблемы были выработаны два международно согласованных критерия ОПП (табл. 1 и 2).

Недостатки критериев ОПП

Как уже говорилось, критерии ОПП основаны на показателях концентрации сывороточного креатинина и количестве выделяемой мочи. Это поздние показатели, и они не обеспечивают раннего обнаружения наступаю-

Таблица 1

ОПП согласно критерию RIFLE
“The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group” [2, 3]

	Повышение сывороточного креатинина	Количество выделяемой мочи
Риск почечного повреждения (Risk of renal injury)	на 0,3 мг/дл	< 0,5 мл/кг/ч для > 6 ч
Повреждение почек (Injury to the kidney)	2-кратный базовый уровень	< 0,5 мл/кг/ч для > 12 ч
Недостаточность почечной функции (Failure of kidney function)	3-кратный базовый уровень или повышение на > 0,5 мг/дл, если креатинин $\geq$ 4 мг/дл	Анурия > 12 ч
Утрата функции почек (Loss of kidney function)	Персистирующая ПН > 4 недель	
Терминальная стадия заболевания (End stage disease)	Персистирующая ПН > 3 месяцев	

Таблица 2

ОПП согласно критериям AKIN “Acute Kidney Injury Network”

Стадия	Повышение сывороточного креатинина	Количество выделяемой мочи
1	1,5–2,0-кратный базовый уровень	< 0,5 мл/кг/ч для > 6 ч
2	2–3-кратный базовый уровень	< 0,5 мл/кг/ч для > 12 ч
3	3-кратный базовый уровень или повышение на 0,5 мг/дл, если базовый уровень > 4 мг/дл, или любая ренальная заместительная терапия	< 0,3 мл/кг/ч для > 24 ч или анурия более 12 ч

щего ОПП. Их практическая ценность, в лучшем случае, весьма ограничена. В частности, повышенные уровни сывороточного креатинина не информативны ни в отношении точного времени, когда наступает ОПП, ни в отношении его локализации, ни, тем более, в отношении тяжести клубочкового или канальцевого поражения.

В целом, как показывают многочисленные исследования:

- высокий сывороточный креатинин не специфичен для повреждений почек,
- его уровень может варьировать в широком диапазоне в зависимости от многих *не* ренальных факторов (возраст, пол, мышечная масса, статус обезвоживания и др.),
- до 50% ренальных функций может быть утрачено *до* повышения креатинина,
- уровень креатинина не отражает функции почек до того момента, пока не установится стационарное состояние (т.е. через 2–3 дня после наступления ОПП!),
- при разных формах заместительной ренальной терапии уровень креатинина изменяется по-разному.

Таким образом, использование уровней креатинина для принятия клинических решений не дает положительных результатов. Как утверждается в одной из обзорных статей: *«измерение сывороточного креатинина для выработки надежного терапевтического вмешательства при ОПП бесполезно и аналогично ожиданию 2–3 дней перед началом терапии пациентов с ишемическим инсультом, инфарктом миокарда и острым неврологическим инсультом».*

Эпидемиология ОПП

Количество случаев ОПП может варьировать от 5% у пациентов с нормальными почечными предоперационными функциями до 25% у пациентов, находящихся в отделениях интенсивной терапии (ОИТ). С ОПП связано удлинение сроков госпитализации и высокий риск инфекционных осложнений. Большинство пациентов, у которых развивается ОПП, в дальнейшем нуждаются в диализе и остаются от него зависимыми всю жизнь. Смертность среди пациентов, находящихся в ОИТ с послеоперационными ОПП, и нуждающихся в ренальной заместительной терапии, варьирует от 40 до 60%. Вероятность развития ОПП после кардиохирургических вмешательств варьирует от 0,33 до 9,5%. Разумеется, конкретные цифры зависят от того, насколько строгими критериями ОПП пользовались исследователи. Так, при одних диагностических критериях (повышение сывороточного креатинина на 1 мг/дл над базисным уровнем) количество случаев ОПП составило 7,9%, а случаев ОПП, при которых требовался диализ, — 0,7%. В другом исследовании, когда критерием ОПП служило повышение сывороточного креатинина на 50% и более, количество случаев ОПП составило 30%. В целом, ОПП обычно развивается:

- у 7% всех госпитализированных пациентов,
- у 14,5% критических больных в педиатрии,
- у 30% пациентов ОИТ,
- у 30% пациентов, перенесших кардиохирургическое вмешательство.

Последствия ОПП могут быть весьма тяжелыми, если не фатальными: у 50% пациентов, находившихся в ОИТ на диализе из-за ОПП, имеет место летальный исход, а, у 25% пациентов, выживших после диализа, в течение трех лет развиваются терминальные стадии почечных заболеваний. В общем, ОПП является причиной 4 млн смертей каждый год. Почему? Одна из причин — отсутствие ранних маркеров приближения ОПП.

За последние 50 лет диагностика острых коронарных событий и стратификация рисков, с ними связанных, достигли несомненных успехов. С 1960 г. в качестве кардиомаркера стало применяться измерение уровней: ЛДГ (лактатдегидрогеназа), с 1970 г. — ККФК (креатинфосфокиназа К) и миоглобина, с 1980 г. — креатинкиназы МБ (ККМБ), с 1990 г. — кардиального тропонина I (сTnI), с 2000 г. — сTnT, в 2009 г. — появились ультравысокочувствительные тесты на тропонины. Все это позволило снизить смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) на 50%. Однако методы диагностики и прогнозирования последствий ОПП за эти 50 лет оставались прежними — креатинин и объем мочи. В начале XXI века ситуация резко изменилась.

NGAL

Пожалуй, один из самых интересных белков, открытых в недавнее время, — это NGAL — *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов. Впервые NGAL был выделен из супернатанта активированных нейтрофилов человека и соответственно был назван. Название оказалось не совсем удачным. Более детальные исследования показали, что хотя NGAL действительно выходит в плазму из вторичных гранул активированных нейтрофилов, но синтезироваться он может в разных органах и в разных типах их клеток.

У NGAL многих важных функций. Прежде всего — он компонент острой фазы (ОФ) воспалительного ответа. Его основные функции: 1) стимулирование пролиферации поврежденных клеток, в особенности, эпителиальных, и 2) противодействие бактериальным инфекциям. Впервые он был описан в 1993 г. У него много других названий. Он известен и как липокалин нейтрофилов (*neutrophil lipocalin* — NL), и как липокалин нейтрофилов человека (*human neutrophil lipocalin* — HNL), как липокалин 2 (*lipocalin 2*), и как онкогенный белок 24p33 (*oncogene protein 24p33*), и как утерокалин (*uterocalin*) мыши, как *neu-related lipocalin* крысы и как $\alpha 2$ -microglobulin-related protein крысы.

Принадлежит NGAL к белкам семейства липокалинов. Липокалины — это, как правило, маленькие секретуемые белки, характерная черта которых — способ-

ность специфически связывать малые гидрофобные молекулы, в частности, сидерофоры. Напомним, что сидерофоры — это железопереносящие белки животных и бактерий. Связывание с сидерофорами происходит за счет специфического углубления в структуре молекулы («кармана»), после чего образуются соответствующие макромолекулярные комплексы, имеющие уже определенным образом измененные функциональные характеристики. Кроме этого, многие липокалины связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток. Это позволяет считать NGAL также и транспортным белком.

NGAL человека состоит из одной полипептидной цепи, состоящей из 178 аминокислотных остатков, и имеет молекулярную массу в 22 kDa.

Гликозилированная форма NGAL имеет молекулярную массу в 25 kDa. В нейтрофилах и в моче NGAL присутствует как мономер, с малым процентным содержанием димерной и тримерной форм.

Где и когда синтезируется NGAL

В зависимости от различных нормальных и патологических состояний NGAL экспрессируется и секретируется большим количеством различных клеток, как полагается, находящихся в состоянии стресса, например, из-за инфекций, воспаления, а также при ишемии, при неопластической пролиферации и в тканях, подверженных инволюции (деградации). При стрессе NGAL особенно активно синтезируется иммунными клетками, гепатоцитами, адипоцитами, клетками предстательной железы, клетками *почечных канальцев*, а также клетками эпителия респираторного и пищеварительного трактов. В зависимости от конкретной ситуации, NGAL может быть донором железа, что при поражении почек оказывает ренально-протективное действие и стимулирует нефрон-индуцирующую активность, а также имеет проапоптотическую активность. Как хелатор железа NGAL — ингибитор эритропоэза.

NGAL в комплексе с ММП-9 модулирует пролиферацию клеток

Как это следует из его названия, NGAL связывается с ферментом, называемым желатиназой (gelatinase B) нейтрофилов, другие названия этого фермента — нейтрофильная коллагеназа IV типа (neutrophil type IV collagenase), или матриксная металлопротеиназа-9, ММП-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9). ММП-9 относится к семейству *железосодержащих* протеолитических ферментов, синтезируются она в большинстве тканей и при этом разрушает внеклеточный белковый матрикс клеток.

В норме ММП-9 обеспечивает контролируемое ремоделирование соединительной ткани или обмен соединительного тканевого матрикса.

При патологиях ММП-9 (наряду с другими матриксными металлопротеиназами) участвует в генерализации

процессов инвазии и метастазирования. Коллагеназы специфически гидролизуют белки группы коллагена, обеспечивая тем самым инициацию и развитие злокачественных инвазивных процессов. Коллагеназы IV типа (или желатиназы А и Б), или ММП-2 и ММП-9 специфически гидролизуют коллаген базальных мембран (коллаген IV типа) и тем самым обеспечивают инвазию через базальные мембраны. Более того, нарушение регуляции активности ММП — причина васкулярного ремоделирования, нестабильности бляшки и вентрикулярного ремоделирования при повреждениях миокарда. Комплекс NGAL–ММП-9 (массой в 92 kDa) встречается не только в различных тканях, но и в моче.

В норме NGAL «спасает» поврежденные клетки

Повышенный синтез NGAL в деградирующих тканях позволяет считать, что этот белок принимает участие, с одной стороны, в процессе апоптоза, а с другой — в повышении выживаемости поврежденных клеточных структур. При различных типах нормального и нарушенного связывания NGAL с ММП-9, которое может регулироваться взаимодействием с катионами железа, может происходить: 1) восстановление поврежденного эпителия (полагается, что одна из «нормальных» функций NGAL, как белка острой фазы воспаления); 2) стимулирование злокачественного роста и метастазирования; 3) ремоделирование атеросклеротических бляшек, и 4) ремоделирование миоцитов при ишемических повреждениях миокарда. Во всех этих случаях уровни NGAL в плазме и/или в моче, как мы увидим дальше, повышаются. Это и делает NGAL биомаркером указанных патологий.

NGAL-маркер неоплазий

Сидерофоры, с которыми связывается NGAL, весьма важные регуляторы клеточных процессов. Сложный перенос железа, происходящий между различными компонентами клеток, критически важен для регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза. И нарушения этих механизмов, вызванные «неправильной» работой NGAL, могут приводить к злокачественной пролиферации, дедифференцировке и иммортализации раковых клеток. Действительно, *in vivo* NGAL особенно интенсивно синтезируется в стимулированных, растущих, неопластических или деградирующих эпителиальных клетках.

Все больше и больше накапливается данных, что повышенный синтез NGAL связан как со многими формами злокачественных опухолей, так и с активностью их метастазирования. И, как правило, такое повышение синтеза NGAL связано с повышенными уровнями ММП-9. При этом повышенная скорость прогрессирования и метастазирования напрямую связана со степенью повышения синтеза NGAL. Все это делает NGAL не только весьма перспективным маркером злокачественного роста и метастазирования, но и потенциальной ми-

шению для терапии [4]. Синтез NGAL весьма часто повышен при широком диапазоне различных неоплазий. Высокие уровни NGAL и ММП-9 обнаруживаются как в самих опухолевых клетках, так и в плазме и в моче. В моче в таких случаях повышается концентрация как мономерной формы NGAL, так и его комплекса с ММП-9. В больших количествах NGAL синтезируется в аденомах кишечника, в аденокарциномах молочных желез и при уротелиальных карциномах (urothelial carcinomas), при первичном колоректальном раке [5], при первичных тиреоидных опухолях. При раке молочных желез высокие уровни NGAL в комплексе с ММП-9 обнаруживаются в моче и в сыворотке. Полагается, что концентрация такого комплекса в моче и в сыворотке может быть маркером тяжести рака молочной железы.

Существенно, что при сверхсинтезе NGAL, связанном с инвазивным раком молочной железы, происходит повышение синтеза таких мезенхимальных маркеров как виментин и фибронектин и снижение синтеза такого эпителиального маркера как кадгерин-Е (E-cadherin). Все эти изменения, ведущие к переходу от эпителиального фенотипа клеток к мезенхимальному, сопровождаются повышением подвижности и инвазивности злокачественных клеток. С другой стороны, ингибирование синтеза NGAL в агрессивных клетках рака молочной железы тормозит миграцию клеток и развитие мезенхимального фенотипа.

При раке поджелудочной железы уровень NGAL в злокачественных клетках повышен в 27 раз (!), при панкреатитах NGAL также повышен, но не так сильно. Полагается, что сывороточные уровни NGAL могут быть ранними маркерами панкреатитов и рака поджелудочной железы. Повышается NGAL и при хронической миелоидной лейкемии. При раке яичников повышенные в 2–2,6 раза уровни NGAL в периферической крови оказались связанными с тяжестью болезни. Более того, NGAL стимулировал эпидермальный фактор роста, который, в свою очередь, индуцировал переход от эпителиального фенотипа клеток к мезенхимальному. Авторы считают, что «NGAL может быть маркером, свидетельствующим: 1) о переходе от пре-малигнантной к малигнантной форме рака яичников, и 2) о прогрессировании малигнизации эпителия яичников».

Таким образом, аномальное повышение синтеза NGAL в различных тканях может стимулировать переход от эпителиального фенотипа клеток к мезенхимальному и затем приводить к злокачественной пролиферации. Формально схожий процесс происходит и при повреждениях ренальных клеток. В этих случаях повышение уровня NGAL направлено на нормализацию функции поврежденного почечного эпителия и является индикатором тяжести почечной патологии (см. ниже).

В целом полагается, что NGAL — это весьма перспективный онкомаркер, особенно полезный для неинвазивной диагностики и мониторинга широкого спектра злокачественных заболеваний.

NGAL как бактериостатик

В комплексе с микробными сидерофорами NGAL оказывает бактериостатическое действие и тормозит развитие инфекций. Это тоже одна из нормальных функций NGAL, связанная с его участием в острофазном ответе на воспаление.

Для поглощения необходимых им катионов железа Fe^{3+} микробные клетки обладают специальным механизмом. В аэробных условиях при pH 7,0 железо представлено в виде слаборастворимого гидроксидного комплекса Fe^{3+} . Для обеспечения себя железом микроорганизмы выделяют специальные соединения, переводящие железо в растворимую форму. Эти так называемые сидерофоры связывают ионы Fe^{3+} в комплекс и в таком виде транспортируют его внутрь микробной клетки. NGAL способен связывать бактериальные сидерофоры, нагруженные катионами железа, и ограничивать рост бактерий. Яркое и однозначное доказательство бактериостатической роли NGAL — трансгенные мыши, лишённые гена, кодирующего NGAL, и тем самым, белка NGAL. Эти мыши имели высокую инфицированность различными грамотрицательными бактериями и быстро погибали. Интересно, что NGAL может повышаться у инфицированных пациентов с низким, даже не поддающемуся подсчёту количеством нейтрофилов, связанным с лейкемией или с лейкемией, уже подвергнутой терапии. Это указывает на то, что при инфекциях источником NGAL являются не только нейтрофилы. Действительно, уровни сывороточного NGAL очень слабо коррелируют с количеством нейтрофилов у критических больных.

Уровни NGAL при инфекциях и/или воспалении

Действительно, в этих случаях плазменные уровни NGAL повышаются весьма быстро, особенно при воспалении, связанном с бактериальными инфекциями. Измерение сывороточного NGAL позволяет дискриминировать бактериальные инфекции от вирусных. При вирусных инфекциях уровни NGAL в сыворотке составляли $9,78 \pm 45,30$ мкг/л, при бактериальных — $404,14 \pm 355,02$ мкг/л, в плазме — $47,81 \pm 18,18$ и $45,46 \pm 194,32$ мкг/л соответственно, что хорошо коррелировало с уровнями С-реактивного белка (СРБ), измеренными в тех же условиях.

Как выяснилось позднее, уровни NGAL, исходно повышенные при поступлении у педиатрических пациентов с инфекциями, у большинства (89%) больных снижались уже к 3–4 дню, в то время как уровни СРБ к этому времени снижались только у 17% больных. В целом, с длительностью проявления симптомов инфекции коррелировали уровни СРБ, но не уровни NGAL. Полагается, что NGAL значительно повышается при активных текущих инфекциях.

Однако плазменные уровни NGAL повышаются и при острой фазе воспаления, не связанного с инфекциями, вызываемой, например, инъекцией мышам декса-

метазона, при этом NGAL, как и большинство острофазных белков, синтезируется в печени.

Синтез NGAL в адипоцитах

Как оказалось, NGAL является еще и адипокином. Напомним, что адипокины — секретируемые гормоны адипозных тканей, принимают участие в развитии нарушений метаболизма липидов и гемостаза, в развитии гипертензии, инсулинорезистентности, ангиогенеза и др., многие из адипокинов связаны с иммунитетом и воспалительными процессами.

Сначала в модельных опытах обнаружилось, что NGAL в больших количествах синтезируется в адипозных клетках, и, более того, этот синтез возрастает при ожирении и при действии агентов, вызывающих инсулинорезистентность.

А совсем недавно было показано, что экспериментальная индукция у добровольцев гиперинсулинемии значительно повышает синтез NGAL в адипоцитах и его уровень в плазме. Полагается, что *измерение сывороточного NGAL может быть полезным для мониторинга эффективности терапевтических мероприятий при метаболических нарушениях, связанных с ожирением* [6].

Таким образом, при различных стрессовых воздействиях NGAL синтезируется в различных органах и оказывает протективный эффект. То, как это происходит при повреждениях почек, рассмотрим более подробно. Но сначала — о роли NGAL при нормальном развитии нефрона.

NGAL и ренальные функции

NGAL стимулирует дифференцировку и структурную реорганизацию ренальных эпителиальных клеток

С помощью животных моделей показано, что в эмбриональных ренальных тканях NGAL стимулирует дифференцировку эпителия, способствуя перемещению стромальных интерстициальных клеток-предшественников (a stromal/ interstitial progenitor) на периферию развивающейся почки. Это ведет к дифференцировке мезенхимальных предшественников, которые образуют нефрон-подобные структуры, в которых затем экспрессируются специфические маркеры, характерные: 1) для клубочков, 2) для проксимальных канальцев, 3) для петель Генле и 4) для дистальных канальцев. Эти процессы стимулируются и регулируются различными клеточными сидерофорами, связывающимися с NGAL.

Более того, в культивируемых клетках собирательных трубок NGAL стимулирует преобразование эпителиальных клеток в тубулярные структуры.

Однако способность NGAL индуцировать дифференцировку не ограничивается только эмбриональными ренальными клетками. Он способен стимулировать дифференцировку 4T1-Ras трансформированных мезенхи-

мальных опухолевых клеток. В итоге, в таких клетках появляются белковые маркеры, характерные уже для эпителиальных клеток.

Таким образом, *в норме NGAL, будучи определенным образом стимулированным соответствующими сидерофорами, 1) принимает важное участие в индукции формирования эпителиальных характеристик у ранее неэпителиальных клеток, и 2) затем влияет на преобразование структуры уже образовавшегося эпителия.*

А что происходит при повреждении ренальных тканей?

NGAL при повреждении почек

Первое указание на то, что NGAL может синтезироваться в почках, появилось еще в 1989 г., до того, как NGAL был выделен из активированных нейтрофилов. Мышиный гомолог NGAL — белок 24p3, как оказалось, синтезируется именно в почках и, более того, при инфекции вирусом SV40 синтез 24p3 в почках возрастал в 14–20 раз. Позднее обнаружилось «драматическое» повышение синтеза NGAL в клетках проксимальных канальцев крысы, вызванное нарушениями, связанными с ишемией, индуцируемой реперфузией. Затем данные, согласно которым ренальная ишемическая реперфузия повышает синтез NGAL в почках, подтвердились и в случаях поражения нефротоксическими соединениями.

В целом, у человека и у лабораторных животных в ответ на ренальные повреждения уровень NGAL резко возрастает в плазме, в почках и в моче. Механизм этого явления изучен на молекулярном уровне. Промоторная область, регулирующая экспрессию гена NGAL, имеет участок связывания с различными факторами, регулирующими транскрипцию, важнейший из которых — NF-κB. А фактор NF-κB, как показано, быстро активируется в почечных канальцах после ОПП и стимулирует транскрипцию гена NGAL и повышение его синтеза, что играет центральную роль в обеспечении выживания поврежденных ренальных клеток и их дальнейшей пролиферации. Собственно, именно эти факты и говорят о функциях NGAL при развитии повреждений ренального эпителия. Это: 1) восстановление эпителия и 2) предотвращение дальнейшего развития ОПП. Как же это происходит?

При ОПП NGAL из плазмы крови поступает в почки, фильтруется и реабсорбируется в проксимальных канальцах

Четко и многократно показано: *при повреждении ренальных канальцев происходит повышение уровня NGAL как в сыворотке (в 7–16 раз), так и в моче (в 25–1000 раз!)*. При ОПП источниками высоких плазменных уровней NGAL являются: печень, легкие, нейтрофилы макрофаги и другие клетки иммунной системы. Как оказалось, хотя NGAL плазмы свободно фильтруется клубочками, он в большой степени реабсорбируется в проксимальных канальцах за счет эндоцитоза. Инъ-

екция животным радиоактивно меченного NGAL приводит к его накоплению в проксимальных канальцах, но не к его появлению в моче. Действительно, радиоактивно меченный (Иод-125) NGAL, введенный в кровообращение, затем обнаруживается в проксимальных канальцах, но практически не попадает в мочу, хотя и обнаруживается в ней, в количествах, не превышающих 0,2% от введенной концентрации. Отметим также и обнаруженное повышение плазменных уровней NGAL, которое сильно коррелировало с падением ренальных функций у пациентов с поражениями почек, вызванными системным васкулитом.

При ОПП NGAL синтезируется в дистальном нефроне

Четко показано, что при ОПП происходит быстрое и массовое повышение (в 1000 раз!) синтеза мРНК, кодирующей NGAL, *в восходящем колоне петли Генле и в собирательных трубках*. Это стало ясным, когда обнаружилось, что: 1) местом первичного ишемического повреждения почек являются проксимальные канальцы, и 2) повышенные уровни белка NGAL, которые обнаруживаются в пост-ишемических почках, локализуются именно в поврежденных проксимальных канальцах, в их лизосомальном компартменте. В результате такого массивного синтеза белка NGAL именно в дистальном нефроне и последующей его секреции, именно такой, «ренальный» NGAL и составляет наибольшую фракцию NGAL в моче.

То, что это именно так, показало прямое измерение при ОПП уровней NGAL в ренальной вене: пул NGAL, синтезируемый в почках, в кровообращение не поступает, а экскретируется в мочу.

Любая экскреция NGAL в мочу происходит только тогда, когда связана: 1) с повреждением проксимальных ренальных канальцев, что предотвращает реадсорбцию NGAL, и/или 2) с повышением синтеза NGAL в почках de novo.

Принципиально, что введение мышам комплекса NGAL: сидерофор–железо перед острым ишемическим тубулярным повреждением защищало эпителиальные канальцевые клетки и смягчало падение ренальных функций. При этом такой NGAL-сидерофорный комплекс уменьшал апоптоз ренального эпителия после его ишемического повреждения.

Таким образом, при ОПП:

- повышенный плазменный NGAL абсорбируется в проксимальных канальцах и в мочу не секретируется,
- «ренальный» NGAL синтезируется в тонких восходящих окончаниях петли Генле и в собирательных трубках и поступает в мочу.

Что это? Нормальная реакция на острую патологию почек или патологическое нарушение регуляции синтезов NGAL? Как разрешить этот парадокс? Весьма просто.

«Плазменный» NGAL, поступающий в почки, спасает их от повреждений, а «ренальный», синтезированный в почках и выходящий в мочу, спасает от последующей инфекций мочевого тракта, ведь NGAL также и бактериостатик. Хотя инфекции мочевого тракта и не являются типичным следствием ренальных повреждений, они являются обычной причиной сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями. Поэтому и полагается, что NGAL, синтезируемый поврежденными, уже почти нефункционирующими почками, может ограничивать рост грамотрицательных бактерий в нижних отделах мочевого тракта.

В итоге, согласно текущим представлениям, при ОПП:

- 1) *в плазме* повышаются уровни NGAL, синтезированного вне почек,
 - плазменный NGAL поступает в почки и реадсорбируется в проксимальных канальцах,
 - его функция — ограничение и/или уменьшение тяжести повреждений в проксимальных канальцах,
- 2) *в дистальных частях нефрона* в течение нескольких часов после их повреждения происходит локальный массовый синтез NGAL;
 - его функции:

А) антиинфекционное бактериостатическое действие на дистальный уrogenитальный тракт,

Б) стимулирование выживания и пролиферации клеток в дистальном сегменте, который обычно подвергается апоптозу при ишемическом ОПП.

Все эти неожиданные открытия и привели к разработке диагностического метода определения NGAL для раннего обнаружения ренальных тубулярных повреждений.

И хотя уровни NGAL в плазме и в моче тесно коррелируют как друг с другом, так и с тяжестью ренальных нарушений, полагается, что уровень NGAL именно в моче является особенно высоким после ишемических ренальных повреждений, тяжесть которых достаточна для того, чтобы вызвать: 1) ОПП, 2) острый тубулярный некроз или 3) острую тубуло-интерстициальную нефропатию.

Разумеется, при использовании u-NGAL (*u — urine, моча*) как раннего маркера этих патологий следует принимать во внимание, что и другие патологии также способны повышать уровни u-NGAL. А сывороточные уровни s-NGAL (*s — serum, сыворотка*) могут зависеть от таких патологий, как ХЗП (хронические заболевания почек), хроническая гипертензия, системные инфекции, воспаления и злокачественные опухоли.

Разумным было бы одновременное измерение s-NGAL и u-NGAL. Высокий s-NGAL свидетельствовал бы о воспалении *и/или* об ОПП, а высокий u-NGAL — *только* об ОПП.

Открытие причин и механизмов повышения уровней NGAL в сыворотке и в моче сразу же привело исследо-

вателей к предположению, что NGAL может стать таким же эффективным маркером острого поражения почек, каким является тропонин для инфаркта миокарда.

Насколько же оправдались эти надежды?

NGAL при хронических заболеваниях почек

У больных с ХЗП уровни s-NGAL коррелируют с тяжестью патологии. Так, при наблюдении 92 недиабетических пациентов, страдающих второй — четвертой стадией ХЗП, были найдено, что:

А) уровни s-NGAL коррелировали:

1) с сывороточным креатинином, 2) с концентрацией u-NGAL, 3) с гемоглобином, 4) с гематокритом, 5) с количеством лейкоцитов, 6) с СКФ, 7) с уровнями цистатина С, и

Б) уровни u-NGAL коррелировали:

1) с возрастом, 2) с гемоглобином, 3) с гематокритом, 4) с количеством лейкоцитов, 5) с СКФ и 6) с концентрацией цистатина С.

Принципиально, что при ХЗП повышение уровней NGAL не такое высокое, как при ОПП. У пациентов с ХЗП, связанными с гломерулонефритами, уровни u-NGAL повышены и коррелируют с уровнями сывороточного креатинина, СКФ и протеинурией.

Персистирующая протеинурия — не только признак ренального повреждения, которое может быть вызвано различными факторами, но и частая причина канальцевых повреждений, приводящих к ХПН. Связаны ли уровни NGAL с тяжестью протеинурии? Для ответа на этот вопрос уровни u-NGAL измерялись у 23 больных с макропротеинурией, имевших мембранозные гломерулонефриты. Как оказалось, уровни u-NGAL прямо коррелировали с тяжестью протеинурии и обратно — с остаточными функциями почек. Согласно пограничному уровню u-NGAL пациенты были разделены на две группы (по уровню u-NGAL выше и ниже 350 нг/мл) и наблюдались в течение 1 года. Через 12 месяцев пациенты из первой группы имели значительные ухудшения базовых ренальных функций и серьезное снижение СКФ.

Отдельного рассмотрения заслуживают результаты исследования, в котором наблюдалось 96 пациентов (средний возраст 57 лет), имевших ХЗП разной этиологии. Исходные средние значения СКФ у этих больных составляли 15 мл/мин/1,73 м² или выше. Как оказалось, уровни u-NGAL и s-NGAL были независимо от других параметров сильно связаны со значениями СКФ. При этом уровни s-NGAL составляли 515,4 нг/мл, в контрольной группе (14 здоровых индивидов) — 35,4 нг/мл. Уровни u-NGAL — 195,6 и 6,6 нг/мл соответственно. За 18,5 месяца наблюдения у 31 пациента (32%) зафиксировано утяжеление патологий, в некоторых случаях приведшее к терминальным почечным заболеваниям. У тех пациентов, у которых исходные уровни s-NGAL были выше 435 нг/мл, заболевания прогрессировали быстрее, чем у больных с уровнями s-NGAL ниже 435 нг/мл. У пациентов с исходными уровнями u-NGAL

выше 231 нг/мл прогрессирование патологий было более быстрым, чем у больных с u-NGAL с более низкими концентрациями. Анализ данных показал, что *уровни NGAL предсказывают высокий риск ХЗП независимо от СКФ и от возраста пациентов*. Каждое повышение u-NGAL на 10 нг/мл связано с увеличением риска прогрессирования ХЗП на 3%, а повышение s-NGAL на 10 нг/мл повышает этот риск на 2%. Авторы полагают, что *«у пациентов с ХЗП уровни NGAL тесным образом отражают наличие ренальных нарушений и являются сильным и независимым маркером прогрессирования ХЗП»*.

У больных с доминантным аутосомным поликистозным заболеванием почек уровни u-NGAL коррелируют с СКФ и тяжестью кистозного заболевания (cystic disease). u-NGAL — это также и ранний маркер хронического заболевания почек у больных с тубулоинтерстициальной IgA-нефропатией.

Весьма показательно исследование, в котором уровни s-NGAL и u-NGAL измерялись у педиатрических пациентов, имевших следующие заболевания: 1) ренальную дисфункцию (СКФ < 90 мл/мин/1,73 м²), 2) пролиферативный гломерулонефрит, 3) стероид-резистентный нефротический синдром, 4) стероид-чувствительный нефротический синдром, и 5) тубулярную дисфункцию. Найдено, что уровни u-NGAL были повышенными при всех группах заболеваний, за исключением случаев ремиссии стероид-чувствительного нефротического синдрома. Повышенные уровни s-NGAL наблюдались только в группе с ренальной дисфункцией. Уровни u-NGAL и s-NGAL отрицательно коррелировали с СКФ при всех исследованных заболеваниях. У пациентов с протеинурией уровни u-NGAL коррелировали с ее выраженностью. Самое больше повышение u-NGAL было при тубулярной дисфункции. Авторы делают вывод, что *«уровни u-NGAL — лучший биомаркер хронических ренальных заболеваний, чем уровни s-NGAL»* [7].

NGAL — маркер диабетической нефропатии

Это было обнаружено, когда уровни s-NGAL и u-NGAL измеряли у 56 пациентов с сахарным диабетом второго типа (СД 2), разделенных на три группы (нормоальбуминурия, микроальбуминурия и макроальбуминурия). Во всех группах уровни NGAL в моче и в сыворотке были повышены и были положительно связаны с тяжестью ренальной патологии. Интересно, что повышенные (по сравнению с контролем) уровни NGAL были и у диабетических пациентов, не имевших ранних признаков нарушения функции клубочков (нормоальбуминурия). Уровни NGAL в моче и в сыворотке возрастали параллельно с тяжестью патологии и достигали максимума у больных с манифестируемой диабетической нефропатией. Была обнаружена достоверная отрицательная корреляция между: 1) уровнями s-NGAL, u-NGAL, сывороточным креатинином и СКФ и 2) между u-NGAL, сывороточным креатинином, протеинурией, альбумин-

урией, сывороточным альбумином и СКФ. Авторы полагают, что *«измерение u-NGAL может стать полезным и неинвазивным методом для обнаружения ренальных нарушений у диабетических пациентов и для ранней диагностики начинающейся нефропатии»*.

В другом исследовании, при наблюдении 74 пациентов с СД 2, разделенных на три группы (нормо-, микро- и макроальбуминурия согласно скорости секреции альбумина в течение 24 ч), измерялись уровни s-NGAL, u-NGAL и другие клинические параметры. Через один год все комплексы измерений были повторены. Было обнаружено: 1) для u-NGAL — тенденция к повышению, связанная с прогрессированием нормо-, микро- и макроальбуминурии, при этом уровни u-NGAL положительно коррелировали с цистатином С, азотом мочи, сывороточным креатинином и отрицательно с СКФ; 2) уровни s-NGAL к концу наблюдения повысились, но имели тенденцию к снижению, связанную с прогрессированием нормо-, микро- и макроальбуминурии; при этом уровни s-NGAL отрицательно коррелировали с цистатином С, азотом мочи как в начале наблюдения, так и в конце его. Авторы полагают, что *«уровни s-NGAL и u-NGAL — чувствительные предикторы прогрессирования диабетической нефропатии при СД 2, но они могут изменяться по-разному. s-NGAL может быть более полезным для раннего обнаружения диабетической нефропатии, а u-NGAL — для оценки степени повреждения ренальных функций»*.

s-NGAL при гемодиализе

У пациентов, находящихся на гемодиализе (ГД), часто наблюдается дефицит железа. При наблюдении 56 пациентов, находившихся на хроническом ГД, было выявлено, что у таких больных уровни s-NGAL были значительно выше, чем в контрольной группе. Принципиально, что ГД пациенты с уровнями насыщения трансферрином <20% имели уровни s-NGAL ниже, чем в контроле, а введение больным железосодержащих препаратов повышало уровни s-NGAL. Статистический анализ показал, что уровни s-NGAL были предикторами: а) повышения hsCRP (С-реактивный белок в высокочувствительном диапазоне) и б) степени насыщения трансферрином. Для выявления у ГД пациентов дефицита железа пограничный уровень s-NGAL меньший или равный 473 нг/мл имел большую чувствительность и специфичность, чем пограничный уровень ферритина <200 нг/мл. Авторы считают, что *«измерение уровней s-NGAL может быть новым инструментом для оценки дефицита железа и эффективности железотерапии у пациентов, находящихся на гемодиализе»*.

В другом исследовании у 200 пациентов, находящихся на ГД, и у 17 пациентов на гемодиалфильтрации (ГДФ) уровни NGAL измеряли в сыворотке, моче и в ультрафильтрате и соотносили: 1) с типом ренальной заместительной терапии, 2) с ренальными функциями и 3) с маркерами воспаления (hsCRP, ФНО-альфа,

ИЛ-6). Обнаружено, что у пациентов на ГДФ уровни s-NGAL были снижены по сравнению с таковыми у пациентов на ГД. У ГД пациентов с остаточными ренальными функциями уровни s-NGAL были значительно ниже, чем у пациентов с анурией. Уровни s-NGAL у ГД пациентов оказались положительно связанными с hsCRP, ФНО-альфа, ИЛ-6, длительностью диализа, ферритином, креатинином, мочевиной. У ГДФ пациентов s-NGAL коррелировал с hsCRP и креатинином. Авторы полагают, что *«остаточные ренальные функции определяют уровни s-NGAL у пациентов, находящихся на гемодиализе. Вялотекущий воспалительный процесс, более выраженный у пациентов с анурией, также может давать свой вклад в повышение s-NGAL. Удаление s-NGAL с ультрафильтратом может частично объяснять его низкие концентрации после диализа»* [8].

u-NGAL и гемолитический уремический синдром

Гемолитический уремический синдром (ГУС), связанный с диареей, может приводить к ОПП. В многоцентровом исследовании показано, что у детей с ГУС, связанным с диареей, уровни u-NGAL, измеренные в ранний период госпитализации, с большой чувствительностью предсказывали тяжесть ОПП и необходимость диализа. Так, у 34 детей с ГУС, 10 из которых (29%) нуждались в диализе в течение пяти дней после госпитализации, измерялись уровни u-NGAL. Все пациенты были разделены на группы согласно уровням u-NGAL: < 200 нг/мл и ≥ 200 нг/мл. 28 пациентов (58%) имели повышенную экскрецию u-NGAL. Тяжесть ГУС была сходной в обеих группах пациентов. Однако пациенты с повышенными уровнями u-NGAL имели более высокие концентрации азота мочевины в крови и сывороточного креатинина и нуждались в диализе. Авторы считают, что *«большинство пациентов с ГУС, связанным с диареей, имеют повреждения ренального тубулярного эпителия, о чем свидетельствует повышение экскреции u-NGAL. Уровни u-NGAL ниже 200 нг/мл в течение пяти дней госпитализации могут быть дополнительным маркером, свидетельствующим о менее тяжелом поражении почек»*.

u-NGAL и волчаночный нефрит

У взрослых пациентов с волчаночным нефритом медианные уровни u-NGAL составляли 19,3 нг/мл, в контрольной группе — 4 нг/мл. Аналогичные результаты были получены и для педиатрических пациентов. Уровни u-NGAL в большей степени коррелировали с тяжестью заболевания, чем уровни s-NGAL. А недавно опубликованные результаты позволяют с уверенностью считать, что серийное измерение уровней u-NGAL позволяет предсказывать утяжеление педиатрического волчаночного нефрита, при этом уровни s-NGAL флуктуируют в широком диапазоне и достоверной корреляции с повышением тяжести ренального заболевания не имеют. Именно u-NGAL, но не s-NGAL — новый маркер

активности ренальной патологии при педиатрическом волчаночном нефрите [9].

u-NGAL — предиктор посттравматического ОПП

Уровни u-NGAL измеряли у 31 взрослого пациента с множественными травмами, не имевшего предшествовавших кардиальных или ренальных заболеваний. Измерения проводились при поступлении и через 24 и 48 ч. Обнаружилось, что у пациентов, у которых в течение пяти дней развивалось ОПП, уровни u-NGAL при поступлении составляли 155,5 (50,5–205,9) нг/мл против 8,0 (5,7–17,7) нг/мл и персистировали на этом уровне в течение двух дней. Пограничный уровень u-NGAL, измеряемый в первый день после поступления и предсказывающий развитие ОПП при множественных травмах, составлял > 25 нг/мл и имел чувствительность 0,91 и специфичность 0,95 [10].

NGAL — показатель нефротоксичности фармпрепаратов

Наблюдали 19 детей со стероид-зависимым нефротическим синдромом, получавших циклоспорин, у которых измерялись уровни NGAL в моче и в плазме. Перед применением циклоспорина уровни указанных маркеров были такими же, как и в контрольной группе (18 здоровых детей), но повысились во время применения данного препарата. Была отмечена положительная связь между уровнями NGAL в моче и в сыворотке и концентрацией циклоспорина в сыворотке [11].

Полагается, что *измерение уровней NGAL может быть весьма полезным как для проверки эффективности новых фармпрепаратов, так и для выявления их возможной нефротоксичности*. Снижение уровней u-NGAL — эффективный показатель при клинических испытаниях современных терапевтических препаратов, применяемых для поддержания ренальных функций у пожилых кардиальных пациентов, и препаратов, предназначенных для больных, перенесших кардиохирургическое вмешательство.

NGAL — предиктор нефропатии, индуцированной контрастными препаратами при чрескожных коронарных вмешательствах

В настоящее время нефропатия, индуцированная контрастными веществами, — это третья из главных причин ОПП, происходящих в лечебных учреждениях. Специальные исследования показали, что NGAL является точным предиктором нефротоксического поражения почек после введения контрастеров, применяемых, в частности, для ангиографии и, в особенности, для чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ). Так, в одном из ранних исследований уровни NGAL (моча, сыворотка) измерялись до и через 2, 4, 12, 24 и 48 ч после ЧКВ. Перед ЧКВ уровни s-NGAL коррелировали с уровнями сывороточного креатинина, мочевины, u-NGAL, гемоглобина, гематокритом, альбумином, возрастом и на-

личием диабета. Через 2 ч после вмешательства повышенный s-NGAL коррелировал с сывороточным креатинином и с длительностью ЧКВ. Авторы считают, что *«NGAL может быть чувствительным ранним маркером ренального поражения после ЧКВ»*.

В другом исследовании наблюдали 100 пациентов с исходно нормальными уровнями сывороточного креатинина, подвергавшихся ЧКВ. Уровни s-NGAL повышались через 2, 4 и 8 ч после ЧКВ, уровни u-NGAL повышались через 2, 4 и 24 ч. При этом уровни цистатина С повышались через 24 ч. Нефропатия наблюдалась у 11 пациентов, у которых уровни s-NGAL были значительно повышены через 2 ч, уровни u-NGAL — через 4 ч, а уровни цистатина С — через 8 и 24 ч.

Дальнейшие наблюдения 60 пациентов с исходными нормальными уровнями сывороточного креатинина, при 10% случаев нефропатии, индуцированной контрастером, проведенные теми же исследователями, подтвердили ранние результаты. Авторы делают вывод: *«уровни s-NGAL, повышенные через 2, 4 и 8 ч после ЧКВ, предсказывают нефропатию с чувствительностью 90% и специфичностью 74%. Уровни u-NGAL, повышенные через 4, 8 и 24 ч, предсказывают нефропатию с чувствительностью 76% и специфичностью 80%. NGAL может быть чувствительным ранним маркером ренального поражения после ЧКВ»*.

В другом исследовании нефропатия, вызванная рентген-контрастными препаратами, была зарегистрирована у 13 (8,7%) из 150 пациентов, подвергнутых ЧКВ. Через 24 ч уровни ИЛ-18 и u-NGAL были значительно повышены у тех больных, у которых впоследствии развилась нефропатия, уровни сывороточного креатинина к этому времени повышенными еще не были.

В относительно небольшом проспективном исследовании наблюдали педиатрических пациентов (91 человек, возраст 0–18 лет), подвергавшихся электрокардиальной катеризации с введением контрастера (Ioversol). Развитие нефропатии зафиксировано у 11 (12%) больных. При этом нефропатия, определяемая как 50% повышение базового уровня сывороточного креатинина, с помощью измерения только креатинина диагностировалась через 6–24 ч после введения контрастера. А повышение u-NGAL — 135 ± 32 против $11,6 \pm 2$ нг/мл и s-NGAL — 151 ± 34 против 36 ± 4 нг/мл обнаруживалось уже через 2 ч после введения контрастера. При пограничном уровне 100 нг/мл чувствительность и специфичность для u-NGAL (через 2 ч после введения контрастера) составляли 73% и 100% соответственно. Для s-NGAL (тоже через 2 ч) — 73% и 100% соответственно. Авторы считают, что *«уровни NGAL, измеренные через 2 ч после введения контрастера, — мощный независимый предиктор нефропатии, индуцируемой контрастером»*.

И наконец, результаты проспективного исследования, в котором наблюдалось 369 пациентов, подвергавшихся кардиохирургии. 205 пациентов получали аprotинин, 164-эпсилон-аминокапроновую кислоту (ЭАК).

Уровни u-NGAL измерялись сразу после операции и через 3, 18 и 24 ч. ОПП развилось у 15 пациентов (25%), получавших апротинин, и у 19 (12%), получавших ЭАК. Применение апротинина было связано с повышением риска развития ОПП в два раза. Уровни u-NGAL у больных, получавших апротинин сразу после сердечно-легочного шунтирования (аппарат искусственного кровообращения — АИК), были повышены в 19 раз, а через 3 ч — в 18 раз.

u-NGAL при инфекциях мочевого тракта

Наблюдались 60 педиатрических пациентов с симптомами инфекций мочевого тракта (и 29 детей контрольной группы). Уровни u-NGAL у пациентов с указанными инфекциями составляли 91,02 нг/мл против 14,29 нг/мл в контрольной группе. Пограничный уровень u-NGAL в 20 нг/мл диагностировал инфекции мочевого тракта с чувствительностью 97% и специфичностью 76%. Авторы считают, что «u-NGAL может применяться как новый чувствительный маркер для раннего предсказания инфекций мочевого тракта при отсутствии ОПП и ХЗП. Оптимальные значения u-NGAL, предсказывающие развитие инфекций мочевого тракта, ниже значений u-NGAL, характерных для ОПП» [12].

NGAL при сепсисе

Сепсис — одна из главнейших причин развития ОПП. От 30 до 50% всех случаев ОПП происходит у критически больных пациентов [13]. Септические ОПП (по сравнению с несептическими) характеризуются более неблагоприятными прогнозами, длительными сроками госпитализации и низким уровнем выживаемости. Как изменяются уровни NGAL при синдроме системного воспалительного ответа (ССВО), с инфекциями не связанного, и при септическом шоке? Наблюдались 143 педиатрических пациента с неинфекционным ССВО и с септическим шоком (контрольная группа — 25 человек). Уровни s-NGAL измерялись в течение 24 ч после поступления в педиатрическое отделение неотложной терапии. В контрольной группе медианные уровни s-NGAL составляли 80 нг/мл (55,5–85,5 нг/мл), у критически больных детей с ССВО — 107,5 нг/мл (89–178,5 нг/мл) и у детей с септическим шоком — 302 нг/мл (51–570 нг/мл). ОПП развилось у 22 из 143 детей (15,4%). У критически больных детей с развившимся ОПП s-NGAL при поступлении составлял 355 (166–1322) нг/мл, у детей без ОПП — 186 (98–365) нг/мл. Авторы делают вывод: «s-NGAL — высокочувствительный, но не специфический предиктор ОПП у критически больных детей с септическим шоком».

В другом аналогичном исследовании измерялись уровни и s-NGAL и u-NGAL у 83 взрослых пациентов, поступивших в отделение хирургической терапии. У 43 больных был диагностирован септический шок, уровни NGAL замерялись через 12, 24 и 48 ч после поступления. Самые высокие исходные (через 12 ч после

поступления) уровни s-NGAL и u-NGAL оказались связанными с септическими ОПП (по сравнению с несептическими ОПП). Однако через 24 и 48 ч после поступления разницы между уровнями NGAL при септических и несептических ОПП не обнаруживалось. При поступлении уровни s-NGAL при септическом ОПП составляли 381 (253–585) нг/мл против 176 (92–269) нг/мл при несептическом ОПП; уровни u-NGAL при септическом ОПП составляли 396 (97–2552) нг/мг креатинина против 50 (26–287) нг/мг креатинина. Авторы делают вывод, что «при септических ОПП уровни s-NGAL и u-NGAL более высокие, чем при несептических ОПП. Эта разница уровней NGAL может иметь диагностическое и клиническое значение».

Литература

1. Lattanzio M.R. Acute Kidney Injury: New Concepts in Definition, Diagnosis, Pathophysiology, And Treatment / M.R. Lattanzio, P. Nelson et al. // JAOA. — 2009. — January. — Vol. 109. — N 1. — P. 13–19.
2. Acute renal failure — definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group / R. Bellomo, C. Ronco, J.A. Kellum et al. // Crit. Care. — 2004. — Vol. 8. — P. 204–212.
3. The outcome of acute renal failure in the intensive care unit according to RIFLE: model application, sensitivity, and predictability / N.Y. Abosaf, Y.A. Tolba, M. Heap et al. // Am. J. Kidney Dis. — 2005. — N 46. — P. 1038–1048.
4. Inhibition of lipocalin 2 impairs breast tumorigenesis and metastasis / X. Leng, T. Ding, H. Lin et al. // Cancer Res. — 2009. — Vol. 69 (22). — P. 8579–8584.
5. Clinical significance of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression in primary rectal cancer / X.F. Zhang, Y. Zhang, X.H. Zhang et al. // BMC Cancer. — 2009. — May. — Vol. 6. — N 9. — P. 134.
6. Ex vivo and in vivo regulation of lipocalin-2, a novel adipokine, by insulin. Lipocalin-2 is upregulated by insulin via phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways / B.K. Tan, R. Adya, X. Shan et al. // Diabetes Care. — 2009. — N 32 (1). — P. 129–131.
7. Serum and urinary NGAL levels in children with chronic renal diseases / M. Nishida, H. Kawakatsu, Y. Okumura et al. // Pediatr. Int. — 2010. — Jan 5. [Epub ahead of print]
8. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Dialyzed Patients Is Related to Residual Renal Function, Type of Renal Replacement Therapy and Inflammation / J. Malyszko, J.S. Malyszko, E. Koc-Zorawska et al. // Kidney Blood Press Res. — 2010. — N 32 (6). — P. 464–469.
9. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity / C.H. Hinze, M. Suzuki, M. Klein-Gitelman et al. // Arthritis Rheum. — 2009. — N 60 (9). — P. 2772–2781.
10. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as an early marker of acute kidney injury in critically ill multiple trauma patients / K. Makris, N. Markou, E. Evodia et al. // Clin. Chem. Lab. Med. — 2009. — N 47 (1). — P. 79–82.
11. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? / A. Wasilewska, W. Zoch-Zwierz, K. Taranta-Janusz et al. // Pediatr. Nephrol. — 2010. — Jan 14.
12. Early prediction of urinary tract infection with urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin / A. Yilmaz, E. Sevketoglu, A. Gedikbasi et al. // Pediatr. Nephrol. — 2009. — N 24 (12). — P. 2387–2392.
13. Acute kidney injury in patients with sepsis: a contemporary analysis / J.A. Lopes, S. Jorge, C. Resina et al. // Int. J. Infect. Dis. — 2009. — N 13. — P. 176–181.

ЦИСТАТИН С В ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКЕ ФУНКЦИИ ПОЧЕК У КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Ю.А. МОРОЗОВ, М.А. ЧАРНАЯ, И.И. ДЕМЕНТЬЕВА

Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского РАМН, Москва

Резюме. Проведено сравнение расчета скорости клубочковой фильтрации по эндогенным цистатину С и креатинину у кардиохирургических больных с использованием различных формул. Установлено, что формула A. Larsson и соавт. (2004) дает наиболее близкие значения скорости клубочковой фильтрации к значениям, полученным по формуле Cockcroft–Gault. Показано, что определение скорости клубочковой фильтрации в послеоперационном периоде только по цистатину С не может служить экспресс-оценкой функции почек в кардиохирургии. Расчет индекса повреждения почек по авторской формуле позволяет существенно повысить диагностическую ценность цистатина С, особенно у пациентов с дооперационной ренальной гиперфильтрацией. Исходная гиперфильтрация является фактором риска развития послеоперационной почечной дисфункции, особенно при значениях индекса повреждения почек свыше 1,600. Изменение индекса повреждения почек в большей степени зависит от длительности искусственного кровообращения. Температурный режим операции и вид хирургического вмешательства не влияют на индекс повреждения почек.

Ключевые слова: цистатин С, функция почек, кардиохирургия.

CYSTATIN C IN THE EXPRESS-DIAGNOSTIC OF RENAL FUNCTION AT CARDIOSURGICAL PATIENTS

YU.A. MOROZOV, M.A. CHARNAYA, I.I. DEMENTIEVA

Petrovsky National Research Center of Surgery RAMS, Moscow

Summary. Was compared different methods used for calculation of glomerular filtration rate (endogenous cystatin-C- and creatinine-based formulas) in cardiosurgical patients. The results obtained with Larsson A. et al. formula (2004) were the closest to ones received under Cockcroft–Gault formula. Glomerular filtration rate (GFR) express-evaluation in postoperative period of cardiosurgical patients shouldn't be based on cystatin-C-based formulas only.

Calculation of renal damage index using the author's formula gives possibility to increase significantly the diagnostic value of cystatin C, especially at patients with renal hyperfiltration before surgery. The preoperative hyperfiltration is a risk factor of development of postoperative renal dysfunction, especially at values of renal damage index from above 1,600. Change of renal damage index in more degrees depends on cardiopulmonary bypass time. The temperature mode of operation and a kind of surgical intervention does not influence an renal damage index.

Key words: cystatin C, renal function, cardiac surgery.

Данные для корреспонденции:

Морозов Юрий Алексеевич, кандидат медицинских наук,
ведущий научный сотрудник Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского,
119991, Москва, Абрикосовский пер., д. 2,
тел. 8(905) 528-61-68, e-mail: mchar18@rambler.ru

В последние годы в лабораторную практику широко входит определение функции почек по эндогенному белку — цистатину С, который является более точным маркером скорости клубочковой фильтрации (СКФ), чем креатинин плазмы. Было выявлено, что значительное повышение уровня цистатина С происходит уже на ранних стадиях нарушения ренальной функции [6].

Цистатин С — эндогенный ингибитор цистеиновых протеаз, относится к группе цистатинов, в которую, помимо него, входят цистатины D, S и SA. Этот протеин

представляет собой негликозилированный основной белок низкой молекулярной массы, состоит из 120 аминокислот и синтезируется практически всеми клетками человеческого организма [8]. Ген цистатина С локализуется в 20 хромосоме.

Образование цистатина С в организме происходит с постоянной скоростью, его уровень относительно стабилен в крови, а низкая молекулярная масса позволяет свободно фильтроваться через клубочковую мембрану [12].

Считается, что уровень цистатина С является важным предиктором сердечно-сосудистых событий, частоты развития и прогрессирования сердечной недостаточности и смертности у кардиологических пациентов, независимо от расы, пола, возраста, мышечной массы, уровня креатинина [3, 11]. Однако использование цистатина С как маркера нарушения функции почек у больных после кардиохирургических операций является еще недостаточно изученным.

Цель: изучить возможность использования определения цистатина С в крови для экспресс-оценки функции почек у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения.

Материалы и методы

Обследовано 75 кардиохирургических пациентов, оперированных на сердце и аорте в условиях искусственного кровообращения (ИК). Определение концентрации цистатина С в плазме проводили с использованием реагентов Nescauto GC цистатин С (ООО «АкваТест», Санкт-Петербург, Россия, корпорация «Alfreda Pharma», Япония) методом иммунологического анализа в золе частиц дисперсной фазы, покрытых анти-цистатин-специфическими поликлональными антителами, путем измерения изменения сигнала поглощения при образовании агглютинатов. Исследование проводили до и на 1-е сутки после операции. Одновременно изучали содержание в крови креатинина (мг%) на аппарате «Steu-2» (фирма «Beckman», Германия). Индекс повреждения почки (ИПП) оценивался как

$$\text{ИПП} = \frac{\text{СКФ}_{\text{по креатинину}}}{\text{СКФ}_{\text{по цистатину}}}$$

где СКФ по креатинину рассчитывали по формуле Cockcroft–Gault, 1976 [1], СКФ по цистатину — по формуле A. Larsson и соавт., 2004 [6].

Результаты

Результаты расчета скорости клубочковой фильтрации (СКФ, мл/мин) по уровню цистатина С в плазме

с применением различных формул приведены в таблице 1.

Из приведенных данных видно, что формулы G. Filler и соавт. (2003), T. Le Bricon и соавт. (2000), DAKO (2005) и Gentian (2005), R.J. MacIsaac и соавт. (2006) дают одинаковые расчетные дооперационные значения СКФ. Формулы F.J. Hoek и соавт. (2003) и A.D. Rule и соавт. (2006) показывают заниженные, хотя и близкие к расчетным величинам СКФ по предыдущим формулам. Формула A.O. Grubb и соавт. (2005) завышает СКФ. Наиболее схожие величины СКФ к расчетным по формуле Cockcroft–Gault дает формула A. Larsson и соавт. (2004). На 1-е сутки после операции расчет СКФ по эндогенному креатинину показывает уменьшение величины СКФ в среднем на 24,5%. Расчет СКФ по цистатину С не выявляет каких-либо изменений СКФ, независимо от используемой формулы, а снижение СКФ варьирует от 2,7 до 5,7%.

При проведении корреляционного анализа были получены следующие взаимоотношения между СКФ, рассчитанной по креатинину и цистатину С: $r = 0,2174$, $p = 0,034$. Однако у пациентов с исходной гипофильтрацией (СКФ менее 60 мл/мин) корреляционные связи были более значимыми ($r = 0,5287$, $p = 0,032$), тогда как при нормальной СКФ и гиперфильтрации (СКФ свыше 120 мл/мин) эти взаимоотношения были слабыми — $r = 0,3068$, $p = 0,422$ и $r = 0,220$, $p = 0,635$, соответственно.

Если расчет СКФ только по цистатину С не позволял выделять больных с гипо-, нормо- и гиперфильтрацией, то этого недостатка лишен ИПП. В целом до операции ИПП был $1,14 \pm 0,11$, на 1-е сутки после операции — $0,82 \pm 0,06$ ($p = 0,015$). Однако у пациентов с исходной СКФ по креатинину менее 80 мл/мин ИПП составил $0,69 \pm 0,20$, при исходной нормофильтрации — $1,03 \pm 0,03$, а гиперфильтрации — $1,54 \pm 0,25$.

Таким образом, расчет ИПП является более точным параметром оценки почечной функции. Дооперационный ИПП может служить предиктором развития почечной дисфункции в раннем послеоперационном пе-

Таблица 1

Формулы, использованные для расчета скорости клубочковой фильтрации по креатинину и цистатину С

Формула	Исход	1-е сутки после операции	% изменения
Cockcroft–Gault., 1976 [1]	$109,3 \pm 7,2$	$82,5 \pm 7,1$	–24,5
Larsson A. и соавт., 2004 [6]	$104,0 \pm 19,1$	$98,5 \pm 15,3$	–5,3
Hoek F.J. и соавт., 2003 [5]	$77,9 \pm 9,3$	$75,3 \pm 7,8$	–3,4
Filler G. и соавт., 2003 [2]	$94,2 \pm 12,2$	$90,8 \pm 9,9$	–3,6
Le Bricon T. и соавт., 2000 [7]	$83,9 \pm 9,0$	$81,4 \pm 7,5$	–2,7
DAKO, 2005 [12]	$89,0 \pm 13,8$	$85,0 \pm 11,4$	–4,5
Gentian, 2005 [12]	$88,5 \pm 11,7$	$85,1 \pm 9,7$	–3,8
MacIsaac R.J. и соавт., 2006 [9]	$83,5 \pm 9,8$	$80,6 \pm 8,2$	–3,5
Rule A.D. и соавт., 2006 [10]	$78,9 \pm 10,3$	$76,0 \pm 8,5$	–3,7
Grubb A.O. и соавт., 2005 [4]	$123,1 \pm 23,9$	$116,1 \pm 19,3$	–5,7

Таблица 2

Изменение ИПП в зависимости от вида операции

Тип операции	Исход	1-е сутки после операции	Δ , %
Реваскуляризация миокарда	$1,106 \pm 0,085$	$0,800 \pm 0,067$	-27,7
Операции на клапанах	$1,028 \pm 0,095$	$0,708 \pm 0,084$	-31,1
Сочетанные, в том числе и на аорте	$1,365 \pm 0,102$	$0,980 \pm 0,099$	-28,2

Таблица 3

Динамика ИПП в зависимости от исходного уровня

Исходная величина ИПП	До операции	1-е сутки после операции	Δ , %
Менее 1,000	$0,743 \pm 0,069$	$0,521 \pm 0,054$	-29,9
1,000–1,200	$1,102 \pm 0,055$	$0,886 \pm 0,087$	-19,6
1,200–1,600	$1,585 \pm 0,068$	$1,062 \pm 0,153$	-33,0
Более 1,600	$1,683 \pm 0,094$	$0,838 \pm 0,095$	-50,2

Таблица 4

Изменение ИПП в зависимости от условий проведения ИК

	До операции	1-е сутки после операции	Δ , %
Температура $< 33^\circ \text{C}$	$1,104 \pm 0,078$	$0,765 \pm 0,084$	-30,7
Температура $> 33^\circ \text{C}$	$1,173 \pm 0,087$	$0,867 \pm 0,064$	-26,3
ИК < 90 мин	$1,063 \pm 0,046$	$0,839 \pm 0,071$	-21,1
ИК > 90 мин	$1,134 \pm 0,083$	$0,683 \pm 0,058$	-36,5
Без пережатия аорты	$1,065 \pm 0,079$	$0,771 \pm 0,069$	-27,6
С пережатием аорты	$1,181 \pm 0,099$	$0,849 \pm 0,107$	-28,1

риоде, а после операции он характеризует выраженность ренальных клубочковых нарушений.

Изменения ИПП в зависимости от вида хирургического вмешательства приведены в таблице 2.

Видно, что до операции ИПП был приблизительно одинаковым у лиц с различной сердечно-сосудистой патологией, а его изменение на 1-е сутки после хирургического вмешательства также было однотипным.

Динамика ИПП в зависимости от его исходного уровня представлена в таблице 3.

Из приведенных в таблице 3 данных видно, что наименьшее изменение ИПП после операций в условиях ИК отмечено при исходной нормофильтрации (ИПП 1,000–1,200). Дооперационная гиперфильтрация сопровождается значительным снижением ИПП, особенно это характерно для пациентов с резко выраженной гиперфильтрацией (ИПП свыше 1,600), у которых ИПП на 1-е сутки после операции уменьшился на 50%, то есть у всех этих пациентов развивается послеоперационная почечная дисфункция.

В таблице 4 приведены данные изменения ИПП в зависимости от условий проведения ИК.

Видно, что гипотермический режим перфузии в большей степени приводит к снижению ИПП, длительность ИК свыше 90 минут оказывает существенное влияние на изменение этого показателя в послеоперационном периоде. Проведение операций как с пережатием аорты, так и без него не влияет на послеоперационный ИПП.

Это подтверждается данными корреляционного анализа, при проведении которого были выявлены следующие взаимосвязи:

Температура перфузии — ИПП на 1-е сутки: $r = -0,39$, $p = 0,08$.

Длительность ИК — ИПП на 1-е сутки: $r = 0,35$, $p = 0,14$.

Время пережатия аорты — ИПП на 1-е сутки: $r = 0,36$, $p = 0,21$.

Таким образом, изолированное определение цистатина С в плазме не может служить экспресс-тестом нарушения гломерулярной почечной функции у кардиохирургических больных в раннем послеоперационном периоде. Однако расчет индекса повреждения почки как отношения СКФ по креатинину и цистатину С позво-

ляет увеличить диагностическую ценность цистатина С, особенно у больных с дооперационной гиперфилтрацией.

Литература

1. Cockcroft D.W., Gault M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine // *Nephron*. — 1976. — Vol. 16. — P. 31–41.
2. Filler G., Lepage N. Should the Schwartz formula for estimation of GRF be replaced by cystatin C formula? // *Pediatr. Nephrol.* — 2003. — Vol. 18. — P. 981–985.
3. Fried L.F., Katz R., Sarnak M.J. et al. Kidney function as a predictor of noncardiovascular mortality // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2005. — Vol. 16. — P. 3728–3735.
4. Grubb A., Bjork J., Lindstrom V. et al. A cystatin C based formula without anthropometrics variables estimates glomerular filtration rate better than correlation clearance using the Cockcroft–Gault formula // *Scand. J. Clin. Lab.* — 2005. — Vol. 65. — P. 153–162.
5. Hoek F.J., Kemperman F.A., Krediet R.T. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2003. — Vol. 18. — P. 2024–2031.
6. Larsson A., Malm J., Grubb A., Hanson L.O. Calculation of glomerular filtration rate expressed in ml/min from plasma cystatin C values in mg/L // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 2004. — Vol. 64. — P. 25–30.
7. Le Bricon T., Thervet E., Froissart M. et al. Plasma cystatin C is superior to 24-h creatinine clearance and plasma creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation // *Clin. Chem.* — 2000. — Vol. 46. — P. 1206–1207.
8. Loew M., Hoffmann M.M., Koenig W. et al. Genotype and plasma concentration of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for cardiovascular events // *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — Vol. 25, N 7. — P. 1470–1474.
9. MacIsaac R.J., Tsalamandris C., Thomas M.C. et al. Estimation glomerular filtration rate in diabetes: a comparison of cystatin-C- and creatinine-based methods // *Diabetologia*. — 2006. — Vol. 49. — P. 1686–1689.
10. Rule A.D., Bregstraalh E.J., Slezak J.M. et al. Glomerular filtration rate estimates by cystatin C among different clinical presentations // *Kidney Int.* — 2006. — Vol. 69. — P. 399–405.
11. Shlipak M.G., Wassel Fyr C.L., Chertow G.M. et al. Cystatin C and mortality risk in the elderly: the health, aging, and body composition study // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2006. — Vol. 17. — P. 254–2616.
12. Sjostrom P., Tidman M., Jones I. Determination of the production rate and non-renal clearance of cystatin C and estimation of the glomerular filtration rate from the serum concentration of cystatin C in humans // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 2005. — Vol. 6. — P. 111–124.

АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ, УСТРАНЯЮЩАЯ ГОМОЦИСТЕИН С УЧАСТИЕМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА. ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.В. РАЗЫГРАЕВ

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН

Резюме. Аминотиолы, такие как цистеин, цистеинилглицин и гомоцистеин, наряду с глутатионом способны участвовать в процессах ферментативного восстановления соединений, содержащих пероксидные группы. В настоящей работе приводятся данные, подтверждающие предположение о существовании гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазной (гомоцистеинпероксидазной) активности в плазме крови. Дано обоснование наличия активности в плазме крови человека, направленной на ускорение убыли гомоцистеина с участием перекиси водорода. В присутствии плазмы крови в реакционной смеси, содержащей 0,043 М трис-НСl-буфер (рН 8,5), 0,29 мМ ЭДТА, 19,2 мМ NaN_3 , 1 мМ D,L-гомоцистеин, 198 мкМ пероксид водорода (инкубация при 37° С), происходит статистически значимое ускорение убыли гомоцистеина (убыль инициирована добавлением H_2O_2). Исследование выявленной функции представляет большой интерес, поскольку в данном процессе, как мы полагаем, происходит устранение двух соединений (не только свободной SH-формы гомоцистеина, но и пероксида водорода), которые при повышенной продукции обладают повреждающим действием. Оценка данной активности может оказаться полезной при изучении развития различных заболеваний, связанных с гипергомоцистеинемией и/или окислительным стрессом.

Ключевые слова: аминотиолы, сульфгидрильные группы, 5,5'-дитиобис-2-(нитробензойная кислота), гипергомоцистеинемия, окислительный стресс.

BLOOD PLASMA ACTIVITY THAT ELIMINATES HOMOCYSTEINE BY HYDROGEN PEROXIDE: RESEARCH PERSPECTIVES

A.V. RAZYGRAEV

D.O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS

Summary. Amino thiols, such as cysteine, homocysteine, and cysteinylglycine, have some similarity with glutathione to participate in the enzymatic reduction of compounds containing peroxide groups. In this paper we present data supporting the assumption of the existence of homocysteine: H_2O_2 -oxidoreductase (homocysteine peroxidase) activity in blood plasma. We justify the presence of activity in human plasma, that accelerates H_2O_2 -dependent homocysteine decline. In the presence of blood plasma in a reaction mixture containing 0.043 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 0.29 mM EDTA, 19.2 mM NaN_3 , 1 mM D,L-homocysteine, 198 microM hydrogen peroxide (incubation at 37° C), there is a significant acceleration of homocysteine concentration decrease (the decrease is initiated by addition of H_2O_2). The study of this function is of great interest because the process seems to be a simultaneous elimination of two potentially deleterious compounds (not only free SH-form of homocysteine, but also hydrogen peroxide). Evaluation of the activity may be useful in studying the development of various diseases associated with hyperhomocysteinemia and / or oxidative stress.

Key words: amino thiol, sulfhydryl groups, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), hyperhomocysteinemia, oxidative stress.

Данные для корреспонденции:

Разыграев Алексей Вячеславович, к. б. н., научный сотрудник лаборатории биохимии с клинико-диагностическим отделением НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, 199034 Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3; тел.: (812) 328-98-05, факс: (812) 328-23-61, e-mail: alexeyrh@mail.ru

Известно, что аминотиолы, в том числе присутствующие в крови человека, могут служить в качестве компонентов антиоксидантной системы, являясь кофакторами в ферментативном восстановлении перекисей [11]. Продолжает интенсивно изучаться участие глутатиона как важнейшего фактора устранения пероксида водорода и органических пероксидов in vivo. Восстановлен-

ная форма данного аминотиола используется ферментами группы глутатионпероксидаз, среди которых известны селеновые и неселеновые формы (к последним относятся ряд глутатионтрансфераз и пероксиредоксины) [5, 8, 9]. Цистеин, цистеинилглицин и гомоцистеин могут служить донорами электронов для восстановления по крайней мере некоторых фосфолипидгидропе-

рекисей [11]. Исходя из вышеперечисленных фактов справедливым является предположение о том, что не только органические перекиси, но и пероксид водорода также способен метаболизироваться с участием данных аминотиолов (помимо глутатиона). В связи с этим возникает вопрос о существовании в тканях ферментативной активности, катализирующей такие взаимодействия.

Нами было замечено, что внесение плазмы крови человека в реакционную смесь, содержащую гомоцистеин, а также хелатирующий агент (этилендиаминтетраацетат, ЭДТА) и ингибитор гемопротеинов, обладающих пероксидазной активностью (азид натрия), приводит к ускорению убыли гомоцистеина, возникающей в результате добавления H_2O_2 . Это позволяет говорить о наличии в плазме катализатора взаимодействия пероксида водорода и гомоцистеина. Данный факт, подтвержденный корректно выполненным статистическим анализом, может внести вклад в совокупность представлений о механизмах регуляции уровней как гомоцистеина (здесь и далее имеется в виду свободная SH-форма), так и пероксида водорода в организме. Несомненно, это должно иметь практическое значение для медицины, поскольку повышенная генерация обоих соединений играет существенную роль в патогенезе ряда заболеваний, в частности, сопряженных со старением [1, 4].

Настоящее сообщение направлено на достижение следующих целей. Первая — обосновать статистически факт наличия активности в плазме крови человека, направленной на ускорение убыли гомоцистеина в присутствии перекиси водорода. Вторая — обозначить возможные направления для исследования обнаруженной активности с обоснованием их значимости для понимания возникновения патологических состояний.

Материалы и методы. На стадии планирования эксперимента была поставлена задача сформировать и сравнить между собой в одном статистическом тесте две группы: 1) уровень окисления гомоцистеина пероксидом водорода без добавления биоматериала (контроль), 2) то же в присутствии плазмы крови. Ввиду того, что характер распределения изучаемого признака неизвестен, следует применить непараметрический критерий. В качестве критерия, удовлетворяющего приведенным требованиям, был выбран критерий Уилкоксона–Манна–Уитни, предназначенный для сравнения двух независимых выборок. Необходимое число вариантов в каждой из групп было определено равным 5: в случае отсутствия перекрывающихся значений между контрольной и опытными группами это обеспечит обнаружение статистически значимых различий на 1%-м или даже еще более высоком уровне значимости [3]. Исходя из этого, в эксперимент было включено 5 доноров: 3 мужчин и 2 женщины (возраст мужчин — 31, 31 и 39 лет, возраст женщин — 29 и 30 лет). Наблюдения независимы, поскольку значения в контрольной группе 1 невозможно присвоить отдельным донорам.

Кровь брали из мякоти пальца с использованием безопасных ланцетов (Sarstedt, размер 18G, глубина прокола 1,8 мм) и систем для взятия капиллярной крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта (Sarstedt, Microvette 200). Плазму отделяли от форменных элементов центрифугированием в течение 10 мин при 400 g и разбавляли дистиллированной водой в 2 раза.

Скорость окисления гомоцистеина в присутствии пероксида водорода с добавлением и без добавления биоматериала оценивалась в условиях, сходных с теми, которые обычно используются нами для определения глутатионпероксидазной активности, но в данном случае с заменой глутатиона на гомоцистеин в реакционной смеси. Определение проводили при 37°С в реакционной смеси, содержащей 0,043 М трис-HCl-буфер, pH 8,5, 0,29 мМ ЭДТА, 19,2 мМ NaN_3 , 1 мМ D,L-гомоцистеин и биоматериал. Плазму преинкубировали с раствором гомоцистеина на трис-HCl-буфере с ЭДТА и NaN_3 в течение 1 мин. Реакцию окисления гомоцистеина инициировали внесением водного раствора H_2O_2 (начальная концентрация с разведением реакционной смесью — 198 мкМ) и останавливали внесением в реакционную среду трихлоруксусной кислоты (ТХУ, конечная концентрация — 4,8% (масса/объем)), что обеспечивало также денатурацию белка. Время инкубации с перекисью составляло 0 с (ТХУ добавляли сразу же — для оценки начальной концентрации сульфгидрильных групп) и 40 с. По разности концентраций окисляемого субстрата между пробами с указанной длительностью инкубации определяли его расход. Для определения скорости неферментативного окисления гомоцистеина в присутствии перекиси водорода вместо биоматериала в реакционную смесь вносили дистиллированную воду. Объемы реакционной смеси и вносимых растворов реагирующих соединений идентичны используемым ранее для определения глутатионпероксидазной активности [6].

После внесения ТХУ в реакционную смесь пробы выдерживали несколько минут и центрифугировали при 1000 g (10 мин). Супернатант отбирали для определения содержания гомоцистеина с использованием 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ) [13]. К 90 мкл отобранного супернатанта добавляли 2 мл 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 8,5, через 10 мин вносили 15 мкл раствора ДТНБ на метаноле (4 мг/мл абсолютного метанола). Пробы фотометрировали при 412 нм (длина оптического пути — 1 см) через 10 мин после внесения ДТНБ [7]. При данной длине волны регистрируется окрашенный в желтый цвет 2-нитро-5-меркаптобензоат, образующийся в результате взаимодействия SH-групп гомоцистеина с ДТНБ [13]. Для расчетов концентрации гомоцистеина использовали коэффициент молярного поглощения 2-нитро-5-меркаптобензоата при 412 нм для растворов в щелочных буферах, равный $14\,150\,M^{-1}\,cm^{-1}$ (по стехиометрии реакции 1 моль 2-нитро-5-меркаптобензоата соответствует 1 моль гомоцистеина).

Результаты и обсуждение. В результате исследования убыви гомоцистеина в присутствии пероксида водорода с добавлением и без добавления биоматериала в реакционную смесь были получены результаты, которые могут быть представлены в виде следующих рядов значений (изменение концентрации гомоцистеина в мкМ за 40 с):

без добавления плазмы 32, 36, 38, 45, 57 (медиана — 38);

с добавлением плазмы 75, 87, 98, 100, 102 (медиана — 98).

Значения в контрольной группе не перекрываются со значениями, полученными для реакционных смесей с плазмой. При статистическом сравнении по критерию Манна–Уитни нулевая гипотеза о случайном характере различий между контрольной группой и выборкой значений, полученных при внесении плазмы крови в реакционную смесь, опровергается на более высоком уровне значимости, чем 0,01 (вероятность ошибки I рода составляет 0,8%). Таким образом, в отношении плазмы крови человека дано статистическое обоснование наличия активности, направленной на устранение гомоцистеина с участием пероксида водорода.

Следует отметить, что в случае проб, содержащих и не содержащих плазму и с добавлением ТХУ сразу же после внесения перекиси в реакционную смесь, были получены сходные значения оптической плотности, что свидетельствует об отсутствии значительных изменений концентрации гомоцистеина в реакционной среде в период преинкубации с плазмой перед добавлением H_2O_2 .

Параметры реакционных сред, используемых в настоящем исследовании, применяются нами для исследований на плазме и лизатах эритроцитов крыс и, по нашим наблюдениям, обеспечивают постоянство скорости реакции и пропорциональность содержанию материала плазмы и эритроцитов в реакционной смеси при определенных разведениях биоматериала. Однако в плазме человека величина исследуемой активности найдена значительно более низкой, чем в компонентах крови крыс. Плазма разведена всего лишь в 2 раза, и при этом наблюдается лишь небольшое (хотя, как показано выше, статистически значимое) приращение расхода гомоцистеина к уровню неферментативного окисления. В то же время, плазму крови крыс приходилось разбавлять в 8–10 раз (а эритроцитарную массу — более чем в 10 раз) для обеспечения постоянства скорости реакции в течение первых 40 с и для ее пропорциональности разведению биоматериала. Однако такие различия между биоматериалом крыс и человека также следует в дальнейшем подтвердить статистическим анализом.

Наличие данной активности в крови вызывает большой интерес, поскольку позволяет по-новому взглянуть на регуляцию уровней как гомоцистеина, так и пероксида водорода в крови. Важность понимания механизмов данной регуляции вызывает необходимость дальнейшего исследования обнаруженной активности. В дальней-

шем следует осуществить выделение в чистом виде и идентификацию соединения (или комплекса соединений), присутствующего в компонентах крови и, по видимому, обладающего гомоцистеинпероксидазной активностью, определить кинетические константы как по гомоцистеину, так и по пероксиду водорода, использовать инкубационные среды на различных буферных растворах с различными значениями кислотности. Всё это должно обеспечить подбор оптимальных условий для определения каталитической активности. Несомненный интерес представляет дальнейшая проверка компонентов крови на наличие гомоцистеинпероксидазной активности, причем с использованием разнообразных субстратов, содержащих пероксидные группы. Что касается органических гидроперекисей, то на настоящий момент гомоцистеинпероксидазная активность установлена лишь в отношении 1-пальмитоил-2-(13-гидроперокси-цис-9, транс-11-октадекадиеноил)-L-3-фосфатидилхолина и только для сывороточного альбумина [11].

Независимо от того, принадлежит ли найденная активность уже известным белкам или нет, ее следует рассматривать (и это касается любой активности) как самостоятельную функцию, реализующуюся в исследуемых компонентах крови. Это означает, что вполне продуктивными могут быть последующие исследования сравнительного плана.

После формирования доказательств существования гомоцистеинпероксидазной активности первостепенный интерес, безусловно, вызывает исследование связи ее величины с содержанием самого гомоцистеина (свободного и/или связанного) в плазме. Возможно, данная каталитическая активность является важным фактором регуляции уровня гомоцистеина в крови, и если это предположение подтвердится, то в дальнейшем данный фактор следует включить в спектр проверяемых возможных причин возникновения повышенного уровня свободного гомоцистеина в компонентах крови.

При гипергомоцистеинемии в период беременности, как известно, увеличен риск возникновения определенных нарушений в развитии нервной системы у плода (анэнцефалия, spina bifida) [2]. Нарушениям метаболизма гомоцистеина отводят также существенную роль в патогенезе различных деменций, ассоциированных с увеличением физиологического возраста, что позволяет рассматривать гипергомоцистеинемию как фактор старения нервной системы [10]. Не исключено, что функционирование механизмов, регулирующих уровни различных форм гомоцистеина в крови (с участием предполагаемой активности), является фактором, влияющим на развитие упомянутых патологических состояний. Безусловно, приведенные здесь рассуждения ни в коей мере не умаляют значения таких факторов как содержание метилтетрагидрофолата, фосфопиридоксала и метилкобаламина, в значительной мере определяющих уровни гомоцистеина в организме.

К настоящему времени показана связь между гипергомоцистеинемией и прогрессированием атеросклеротических поражений сосудов [4]. Считается, что наиболее токсичными формами гомоцистеина в этом отношении являются тиолактон данного аминотиола и свободная форма гомоцистеина [12]. Перспективным представляется поиск корреляций между степенью атеросклеротических поражений и уровнем активности, направленной на пероксидзависимое окисление свободной формы гомоцистеина, в компонентах крови. При наличии тесной связи можно будет рассматривать диагностическую и прогностическую ценность данного показателя.

Если обнаруженная нами активность является гомоцистеинпероксидазной, т. е. утилизации подвергается не только восстановленная форма гомоцистеина (это продемонстрировано), но и пероксид водорода, уместно будет подчеркнуть необходимость проведения исследований данной активности при различных патологических состояниях, в возникновение которых вовлечена

повышенная генерация свободно-радикальных соединений. Развитию многостороннего представления о механизмах регуляции уровня пероксида водорода в компонентах крови будут способствовать исследования сопряженности работы как неферментативных, так и ферментативных антипероксидантов. В связи с этим интерес для дальнейшего исследования, несомненно, представляет поиск корреляционных связей между данной активностью и активностями таких ферментов как глутатионпероксидазы, каталаза и супероксиддисмутазы.

Даже если окисление гомоцистеина посредством пероксида водорода катализируется целой группой соединений (возможно, некоторыми из уже известных ферментов), исследование общей активности в условиях, обеспечивающих насыщение каждого из них субстратами, безусловно, имеет ценность, поскольку изучение определенной функции, реализующейся в исследуемой ткани, не менее важно, чем изучение активности отдельных биохимических составляющих.

Литература

1. Анисимов В.Н., Соловьев М.В. Эволюция концепций в геронтологии. — СПб.: Эскулап, 1999. — 129 с.
2. Арутюнян А.В., Козина Л.С., Арутюнов В.А. Токсическое влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на потомство (экспериментальное исследование) // Журнал акушерства и женских болезней. — 2010. — Т. 59, № 4. — С. 16–23.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
4. Жлоба А.А. Лабораторная диагностика при гипергомоцистеинемии // Клинико-лабораторный консилиум. — 2009. — № 1. — С. 49–60.
5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. — М.: Слово, 2006. — 556 с.
6. Разыграев А.В. Активность глутатионпероксидазы в ткани шишковидной железы крыс и ее изменение при старении // Успехи геронтол. — 2010. — Т. 23, № 3. — С. 392–395.
7. Разыграев А.В. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис-2-(нитробензойной кислоты) // Клинико-лабораторный консилиум. — 2004. — № 4. — С. 19–22.
8. Bindoli A., Fukuto J.M., Forman H.J. Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling // Antioxidants & Redox Signaling. — 2008. — Vol. 10, N 9. — P.1549–1564.
9. Fujii J., Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein // Redox Report. — 2002. — Vol. 7, N 3. — P. 123–130.
10. Herrmann W., Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases // Clin. Chem. Lab. Med. — 2011. — Vol. 49, N 3. — P. 435–441.
11. Hurst R., Bao Y., Ridley S., Williamson G. Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin // Biochem. J. — 1999. — Vol. 338. — P. 723–728.
12. Jacobsen D.W. Cellular mechanisms of homocysteine pathogenesis in atherosclerosis // Homocysteine in Health and Disease. — New York: Cambridge University Press, 2001. — 510 p.
13. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // Analytical Biochemistry. — 1968. — Vol. 25. — P. 192–205.

НОВЫЙ РОССИЙСКИЙ СТАНДАРТ

С 1 декабря 2011 года вступит в силу новый национальный стандарт Российской Федерации — ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности».

NEW RUSSIAN STANDARD

From 1 of December 2011 the new national standard of Russian Federation is introduced. It is EN 12469-2010 «Biotechnology. Technical demands to boxes of microbiological safety».

Инициатором разработки и внедрения нового национального стандарта выступило ЗАО «Ламинарные системы» совместно с ассоциацией инженеров по контролю микрозагрязнений «Асинком». Новый документ является аутентичным переводом Европейского стандарта EN 12469-2009, разработанного с учетом всех передовых достижений мирового опыта микробиологической лабораторной практики и, что особенно ценно, ссылающегося на уже принятые в России международные европейские стандарты.

Новый ГОСТ Р ЕН 12469 дает определение бокса микробиологической безопасности и содержит:

- описание каждого класса с указанием диапазонов значений контрольных характеристик боксов,
- перечень обязательных требований к материалам и конструкции боксов каждого класса,
- перечень обязательных проверок и методов их проведения для подтверждения защитной эффективности бокса при квалификационных испытаниях, а также в процессе регулярного технического обслуживания.

Специалисты ЗАО «Ламинарные системы» уверены, что применение в России стандарта ГОСТ Р ЕН 12469 наилучшим образом скажется на качестве лабораторного оборудования, представленного на рынке. Ведь в настоящее время в России практически отсутствует нормативная база, регламентирующая технические параметры, производство, проверку и последующее обслуживание боксов микробиологической безопасности. По этой причине российский рынок наводнен оборудованием, не отвечающим даже минимальным требованиям безопасности и не обеспечивающим необходимого уровня защиты как персонала, так и окружающей среды и продукта. Отсутствие однозначных требований к эксплуатации боксов микробиологической безопасности привело к необязательности проведения ежегодных проверок, определяющих правильность работы бокса, целостность фильтров и уплотнений, скорость воздушных потоков и другие важные параметры, влияющие на безопасность эксплуатации бокса.

Безусловно, появление нового ГОСТа заставит производителей потратить немалые средства на приобретение приборов и оборудования для проведения прописанных в стандарте проверок и валидационных процедур. А недобросовестные производители и импортеры будут вынуждены вообще покинуть российский рынок. Но обеспечение надежной защиты персонала, работающего с опасными микроорганизмами, того стоит.

Не дожидаясь официального введения в действие нового регламента, ЗАО «Ламинарные системы» уже сегодня проводит большую плановую работу по внедрению стандарта на предприятии. С учетом требований нового ГОСТа доработана конструкция бокса, усовершенствована визуальная и звуковая сигнализация, пред-

упреждающая оператора о малейших отклонениях в работе оборудования.

В программу испытаний серийно выпускаемых боксов II класса согласно ГОСТ Р ЕН 12469 включены проверки:

- уровня шума;
- уровня освещенности;
- герметичности корпуса;
- устойчивости конструкции (рис. 1);
- уровня вибрации рабочей поверхности;
- значения средней скорости нисходящего потока воздуха в рабочей камере бокса;
- значения средней скорости потока воздуха, входящего через рабочий проем бокса;



Рис. 1. Тест на устойчивость конструкции

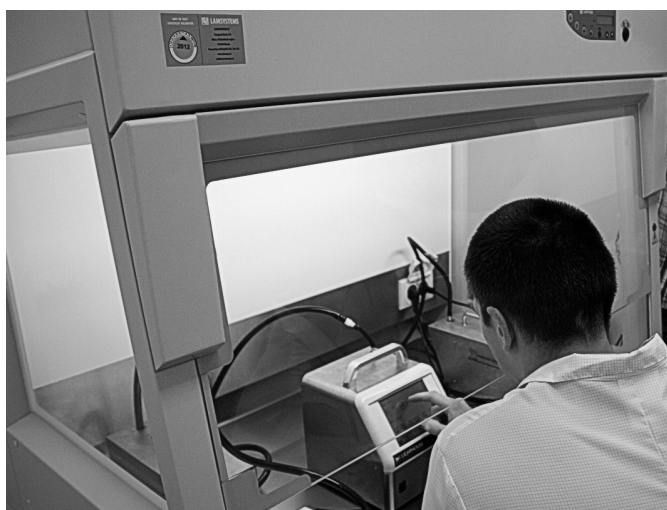


Рис. 2. Проверка целостности НЕРА-фильтров

- целостности приточного и выпускного НЕРА-фильтров и мест их герметизации с применением аэрозольной нагрузки (рис. 2);
- движения установившихся потоков воздуха (визуализация);
- эффективности удержания в рабочем проеме (КИ-тест¹) (рис. 3);
- эффективности защиты продукта от внешней контаминации (КИ-тест);
- эффективности защиты от перекрестных загрязнений (КИ-тест);
- класса чистоты воздуха в рабочей зоне бокса²;
- устойчивости бокса к обработке формальдегидом;
- системы аварийной сигнализации.

На базе предприятия создана валидационная лаборатория, которая в настоящее время проходит аккредитацию и в дальнейшем сможет проводить независимое тестирование боксов любого производителя.

Следующая серьезная задача, решением которой специалисты ЗАО «Ламинарные системы» намерены заняться вплотную, — разработка и активное распространение рекомендаций по правильному использованию боксов микробиологической безопасности, формирова-

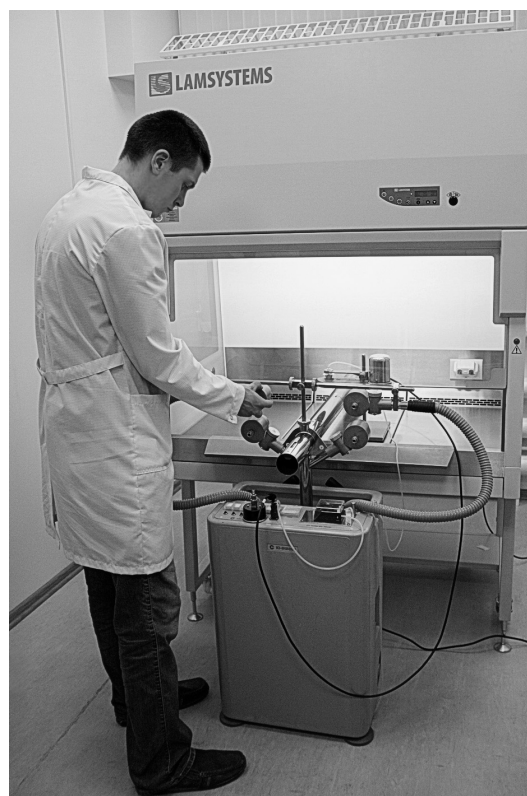


Рис. 3. Эффективность удержания микроорганизмов и агентов в переднем окне (калий-йод-тест)

ние свода правил, приемов и методов работы, которые, вкуче с сертифицированным оборудованием, обеспечат требуемую защиту персонала от микробиологической опасности. И первым шагом на этом пути станет выпуск нового более подробного руководства по эксплуатации бокса II класса.

Развивая единую российскую нормативную базу в области производства, валидации и использования боксов микробиологической безопасности, ЗАО «Ламинарные системы» делает ставку на улучшение качества не только своей продукции. Здоровая конкуренция во все времена была на пользу, прежде всего, конечному потребителю.

¹ Подробное видео о проведении теста на www.lamsys.ru

² Не предусмотрено ГОСТом.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Уважаемые авторы!

При направлении статьи в редакцию просим соблюдать следующие правила:

Статья должна сопровождаться официальным направлением от учреждения, в котором выполнена работа, иметь визу научного руководителя, заверенную печатью учреждения.

Кроме того, необходимы копии авторского свидетельства, удостоверения на рационализаторское предложение или разрешения на публикацию, если эти документы упомянуты в тексте статьи. На последней странице статьи должны быть подписи всех авторов.

Оформление рукописи:

1. Объем оригинальной статьи, включая таблицы, рисунки и список литературы, не должен превышать 13–15 страниц. Возможна публикация работы путем разбиения на части.

2. Параметры текстового редактора MS Word: шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12 пт, межстрочный интервал — двойной, обязательно соблюдение полей (слева — 3 см, справа — 1,5, сверху и снизу — 2 см). Все страницы должны быть пронумерованы.

3. В начале первой страницы указываются: название статьи, инициалы и фамилия(и) автора(ов), название учреждения, из которого вышла работа, город, резюме — краткое содержание статьи (200–250 слов), ключевые слова (не более 12) на русском и английском языках. В случае, если авторы работают в разных учреждениях, это должно быть отмечено звездочкой (*).

4. Оригинальные статьи должны содержать следующие разделы: введение, материалы и методы, полученные результаты, список литературы. В статью также могут включаться материалы обсуждений, дискуссий по проблеме, а также благодарности.

5. В статье указываются данные автора (или одного из авторов): фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность, место работы, адрес (организации), телефон/факс, электронный адрес. Данная информация размещается после названия статьи, ФИО автора(ов), данных организации, резюме и ключевых слов на русском и английском языках в разделе «Данные для корреспонденции».

6. Все сокращения, используемые в статье, должны быть расшифрованы, кроме символов химических элементов и сокращенных названий метрических единиц.

7. Библиографические ссылки:

- Ссылки на литературу, цитируемую в тексте статьи, даются нумерацией арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [1]) и должны соответствовать списку литературы.
- Литературные источники приводятся в конце статьи.
- Список литературы составляется в соответствии с ГОСТ РФ 7.0.5-2008 «Библиографическая ссылка» в порядке цитирования, на отдельной странице. Фамилии иностранных авторов в тексте даются в оригинальной транскрипции (в случае, когда число авторов превышает 3, используются формулировки «et al.» и «и соавт.»).
- Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация — строго соответствовать нумерации в тексте статьи.
- При ссылках на авторефераты диссертаций следует указывать их название.
- Ссылаться на неопубликованные работы нельзя.
- За точность библиографии несет ответственность автор.

8. Упомянутые в тексте статьи лекарственные вещества и методы их введения должны быть утверждены МЗ и СР РФ и разрешены для клинического применения.

9. Таблицы, схемы и рисунки (если они необходимы) оформляются в виде отдельного файла, обозначенного по фамилии автора и(или) названия статьи. В тексте статьи необходимо делать ссылку на каждую таблицу, схему, рисунок, на полях должны быть обозначены места их размещения по тексту (рис. 1, табл. 1 и т. д.). Таблицы, схемы, рисунки должны иметь названия. В подписях приводится объяснение значения всех кривых, букв, цифр и других условных обозначений.

10. В материалах, направленных в журнал, должна быть использована система СИ, за исключением размерности величин, традиционно измеряемых в других мерах.

Статьи, не соответствующие указанным правилам, могут быть возвращены авторам без рассмотрения.

Статьи, ранее опубликованные или направленные в другой журнал, не принимаются.

Все представленные работы рецензируются.

Исправленные автором после рецензирования и перепечатанные рукописи возвращаются в редакцию не позднее одного месяца, а исправленные гранки — через одну неделю.

Авторский гонорар и оплата труда по рецензированию рукописей не предусмотрены.

Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются.

Материалы просим присылать по адресу:

197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8, корпус 11,

редакция журнала «Клинико-лабораторный консилиум»

или доставить лично по данному адресу, предварительно позвонив в редакцию по телефону:

(812) 233-97-26, +7(905) 22-960-22 (Эмануэль Юлия Владимировна).

Предпочтительнее прислать статью по электронной почте по адресу: ejvcons@mail.ru

(текст статьи оформляется в виде одного файла, названного по фамилии первого автора).

Сопроводительные документы в этом случае можно также переслать по электронной почте,

предварительно отсканировав (с печатью и подписью руководителя),

или отправить по факсу: (812) 233-97-26.

Чтобы убедиться, что Ваша статья получена в редакции, при отправке по электронной почте пользуйтесь параметром «уведомление» или позвоните в редакцию.

Благодарим за сотрудничество!