



№ 3 (39) сентябрь 2011

КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор:

Эмануэль В. А., 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)**

Оригинал-макет и верстка:

ООО «Издательско-
полиграфическая
компания «КОСТА»»,
тел. **(812) 445 10 02**

Отпечатано в ООО «ИПК «КОСТА»

Санкт-Петербург,
Новочеркасский пр., д. 58
Тираж 1000 экз.
Заказ №

РЕЗОЛЮЦИЯ

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

Диагностические методы, в том числе лабораторные (in vitro), бурно развиваются в последние десятилетия и вносят весомый вклад в качество медицинской помощи. Современные биохимические, молекулярно-биологические методы являются системообразующими при формировании персонализированной медицины. Это требует новых подходов и модернизации как в сфере образования по специальности «Клиническая лабораторная диагностика», так и в отношении оценки результатов лабораторных исследований в практическом здравоохранении. В связи с этим участники конференции «Биохимия — Биофизика — Информатика — три кита лабораторной медицины XXI века» предлагают:

1. Обратить внимание Министерства здравоохранения и социального развития РФ на возможное решение кадровой проблемы, отмеченной в докладе министра Голиковой Т.А. на коллегии министерства «Об итогах работы Минздравсоцразвития России в 2010 году и задачах на 2011 год», о выраженном дефиците в стране врачей клинической лабораторной диагностики, путем включения преподавания клинической лабораторной диагностики в Федеральный государственный образовательный стандарт высшего профессионального образования по специальностям: лечебное дело, педиатрия и стоматология. Только такая кадровая политика позволит обеспечить приток выпускников медицинских вузов для последипломной подготовки по дефицитной специальности.
2. Ввести преподавание клинической лабораторной диагностики в интернатуре и клинической ординатуре, а также в системе непрерывного образования врачей всех клинических специальностей с введением вопросов лабораторной медицины в тестирование врачей при их аттестации для обеспечения эффективности применения наукоемких, дорогостоящих лабораторных технологий в лечебно-диагностическом процессе.
3. Внести в «Номенклатуру услуг в здравоохранении» биофизические методы, получающие все большее распространение в практическом здравоохранении как интегральная характеристика свойств биологического материала.
4. При разработке диагностических алгоритмов акцентировать внимание на необходимости более широкого применения методов медицинской информатики, позволяющих формировать новое знание из баз данных результатов лабораторных исследований, в том числе находящихся в диапазоне референтных значений, расширяющих доказательную тактику клинического решения.



**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.А.,
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 AACCC (США) |
| Дюк В.А.,
д. т. н., профессор, СПИИРАН (Санкт-Петербург) | Бринкманн Т.,
адъюнкт-профессор клинической биохимии
медицинского факультета
Университета Рура в Бохуме (Германия) |
| Каллер 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

РЕЗОЛЮЦИЯ конференции «Биохимия — Биофизика — Информатика — три кита лабораторной медицины XXI века»	1
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ	2
<i>В.Н. Титов</i> БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ XXI ВЕКА.	6
<i>Е.В. Абакушина</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ.	17
<i>В.В. Вельков, О.И. Резникова</i> НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОЙ И ОСТРОЙ РЕНАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ	26
<i>В.В. Вельков</i> ЦИСТАТИН С: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И НОВЫЕ ЗАДАЧИ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ (ЧАСТЬ 3).	31
<i>М.В. Решетняк</i> ГИПЕРФРУКТОЗЕМИЯ КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА	38
<i>М.В. Филатов, С.Б. Ланда, Т.А. Штам, Р.А. Ковалев</i> АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ЧЕЛОВЕКА IN VIVO И IN VITRO В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ	44
ТЕЗИСЫ конференции «Биохимия — Биофизика — Информатика — три кита лабораторной медицины XXI века»	
<i>Л.А. Александрова</i> ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ У ЧЕЛОВЕКА	54
<i>Л.А. Александрова, В.А. Тарлыков</i> ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТРАНСФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ.	54
<i>И.Б. Алчинова, Е.Н. Архипова, И.Ю. Егорова, А.С. Бобе, М.Ю. Карганов</i> ИССЛЕДОВАНИЕ СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВА СЫВОРОТКИ КРОВИ МЫШЕЙ РАЗНЫХ ЛИНИЙ ПРИ ОСТРОМ ОБЛУЧЕНИИ.	55
<i>Ю.В. Архипенко, О.Б. Кострова, И.Б. Ландау, С.Э. Миронов, Н.М. Сафьянников</i> СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ АНАЛИЗАТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В КРОВИ, СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ МЕТОДОМ ПРОИЗВОДНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ.	55
<i>Е.Н. Архипова, И.Б. Алчинова, Ю.С. Медведева, А.Б. Черепов</i> КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВА И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ	56
<i>А.О. Безушко</i> ОПТИМИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА ОКСИДА АЗОТА (II) В ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЙ СИСТЕМЕ	56
<i>М.О. Белова, Л.А. Курбатова</i> КРИСТАЛЛОМОРФОЛОГИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ	57
<i>Е.А. Беляева</i> МОНИТОРИНГ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ КАК МАРКЕРА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК	57
<i>Э.Л. Блашко</i> РОЛЬ СВОЕВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ В СИСТЕМЕ ПРОФИЛАКТИКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	58
<i>А.В. Ботина, М.К. Вязанкина, А.Ч. Машек, Е.Е. Майоров, Н.Я. Чистякова</i> ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТРАЖАТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ $SiO_2+H_2O+ZrO_2$ В МЕДИЦИНСКИХ ПРИБОРАХ.	58

Содержание

<i>Л.В. Гончарук, Ю.И. Бажора, С.Ф. Гончарук</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ И МОЧИ У БОЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАРОДОНТА С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ	59
<i>В.О. Гунько, Т.Н. Позорелова</i> АКТИВНОСТЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-KB В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕСТАЦИИ	59
<i>А.А. Данилова, Р.Т. Габбасов, А.В. Борисова, И.И. Ахметов</i> ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АСТН3 У ФУТБОЛИСТОВ	60
<i>И.Р. Егорова, Е.И. Кондратьева, А.А. Терентьева, Г.А. Суханова</i> СОСТОЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВТОРИЧНОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА	60
<i>А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Д.С. Лупан</i> ЛАБОРАТОРНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ОЦЕНКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ СВОБОДНЫХ АРГИНИНА И ЛИЗИНА ПРИ ФИБРИНОЛИЗЕ	61
<i>Е.В. Иванникова, А.К. Мартусевич, Ж.Г. Симонова</i> БИОГРАВИМЕТРИЯ: МЕТОДОЛОГИЯ, МЕТОДИКА, ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.	61
<i>М.Ю. Карганов, О.И. Ковалева, Н.П. Антонова, А.А. Рогова</i> ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ХАРАКТЕР ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ У ШКОЛЬНИКОВ	62
<i>Д.Г. Кисиличина, Е.В. Наумова, М.Е. Почтарь, С.А. Луговская, Б.В. Бидерман</i> ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ В-ХЛЛ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ	63
<i>Я.В. Колосовский, Э.Э. Топузов, В.К. Балашов, Ш.И. Галеев</i> РЕЗУЛЬТАТЫ ПОВТОРНЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ ПРИ СТРИКТУРАХ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ.	63
<i>А.Н. Комлевой, Ю.А. Потапчук, П.П. Ермураки</i> ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В ДИАГНОСТИКЕ СОСТОЯНИЙ ГОМЕОСТАЗА ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА	64
<i>А.Е. Кратнов, Е.С. Углов, С.Ю. Федотов, Е.Е. Углова</i> УРОВЕНЬ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ И НОРМАЛЬНЫМ ЗНАЧЕНИЕМ ТРОПОНИНА Т.	64
<i>В.И. Кресюн, В.В. Годован, О.Л. Тымчишин, Д.Ю. Андронов</i> НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ	65
<i>И.И. Крукиер, В.В. Авруцкая, Е.В. Нарезная, А.А. Никашина</i> ПРОДУКЦИЯ АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ РОСТА В ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧКАХ И ЕЕ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ	65
<i>Е.Г. Маевская</i> ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В СТАРШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЕ	66
<i>А.К. Мартусевич, А.А. Костяев, О.И. Шубина</i> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА КРИСТАЛЛОГЕННЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	66
<i>М.О. Мхеидзе</i> ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ОШИБОК МЕТАБОЛИЗМА	67
<i>А.А. Овечкин</i> АСИММЕТРИЧНЫЙ ДИМЕТИЛАРГИНИН В СОСТАВЕ ФРАКЦИИ ОСНОВНЫХ ПЕПТИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ	68
<i>Е.И. Рабинович, С.В. Поволоцкая, В.А. Турдакова, С.Н. Соколова</i> ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ	68
<i>Т.М. Рожнова</i> СКРИНИНГ-ДИАГНОСТИКА АДДИКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ	69
<i>А.К. Сироткин, П.А. Некрасов, В.В. Кузнецов</i> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН МЕТОДАМИ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ	69

Содержание

<i>Е.А. Сметюк, М.М. Чеснокова</i> ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ТОКСИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ	70
<i>Э.Г. Топузов, М.А. Рубцов, Ю.В. Князева, Я.П. Абдуллаев, Ш.И. Галеев</i> К ВОПРОСУ О ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА	70
<i>С.Н. Шатохина, В.Н. Шабалин</i> ЗНАЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НЕКЛЕТОЧНОЙ ТКАНИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	71
<i>В.Д. Якушина, О.А. Васильева</i> ГАЛЕКТИН-1 В ДИАГНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	72

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ XXI ВЕКА

В.Н. ТИТОВ

ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития РФ, Москва

Резюме. Мы предлагаем рассмотреть патогенез распространенных заболеваний в популяции человека на основании: а) теории биологических функций и биологических реакций; б) регуляции функций и метаболизма *in vivo* на трех филогенетически разных, последовательных уровнях (аутокринный, паракринный и организма) и в) становления физиологических и патологических процессов в эволюционном аспекте. В течение миллиардов лет на разных ступенях филогенеза сформировались: 1 – биологическая функция трофологии, функция питания; 2 – биологическая функция гомеостаза; 3 – биологическая функция эндоэкологии; 4 – биологическая функция адаптации; 5 – биологическая функция продолжения вида; 6 – биологическая функция локомоции и 7 – биологическая функция интеллекта. Биологические реакции функции трофологии – реакции экзотрофии и эндотрофии. «Чистоту» межклеточной среды *in vivo* (функцию эндоэкологии) реализуют биологические реакции экскреции, воспаления, транскитоза, гипертермии и биологическая реакция артериального давления (АД). Биологическую функцию адаптации реализуют биологические реакции стресса, компенсации и АД. При становлении далеко не ранней биологической функции локомоции (функции движения) произошло формирование замкнутой системы кровообращения и а) сосудисто-сердечной системы с функционально разными проксимальным (сердце – насос и демпферная система артерии эластического типа) и дистальным отделом из локальных перистальтических насосов паракринных сообществ клеток – артериол мышечного типа; б) скелетной мускулатуры и в) адипоцитов – специализированных клеток рыхлой соединительной ткани для запасания жирных кислот как субстратов для наработки митохондриями АТФ и системы инсулина (ИНС). Биологическая роль ИНС – обеспечение энергией биологической функции локомоции. ИНС сформировал систему apoB-100 липопротеинов низкой плотности, ИНС-зависимые клетки с рецепторами к ИНС и глюкозными транспортерами 4 на мембране, выражено активировать липогенез из глюкозы и ингибирует все процессы липолиза *in vivo*. Филогенетически поздний ИНС, действуя на уровне организма, не может оказать влияние на липолиз в паракринных сообществах. Сахарный диабет в первую очередь – патология метаболизма жирных кислот и во вторую – патология метаболизма глюкозы.

Ключевые слова: биологические функции, биологические реакции, патогенез, артериальная гипертензия, сахарный диабет, экскреция, воспаление.

BIOLOGICAL BASIS OF MEDICAL SCIENCE DEVELOPMENT IN XXI CENTURY

V.N. TITOV

**Federal State Institution “Russian cardiological scientific industrial complex”,
Ministry of Health and Social Development of RF, Moscow**

Summary. We suggest to discuss the pathogenesis of the most common diseases in population basing on following: a) theory of biological functions and biological reactions, b) metabolism and functions regulation *in vivo* at three subsequent, phylogenetically different levels (autocrine, paracrine and level of organism as a whole), and c) development of physiological and pathological processes in aspects of evolution

During milliards of years following functions were formed at different steps of phylogenesis: 1 – biological function of trophology/nutrition; 2 – biological function of homeostasis; 3 – biological function of endoecology; 4 – biological function of adaptation; 5 – biological function of maintaining and reproduction of the species; 6 – biological function of locomotion; 7 – biological function of intellect. Biological reaction of trophological function is related to the reactions of exotrophy and endotrophy. «Cleaningy» of intracellular medium *in vivo* (function of endoecology) is realized by biological reactions of excretion, inflammation, transcytosis, hypertermy and biological reaction of blood pressure. Biological function of adaptation is realized by the reactions of stress, compensation and blood pressure. The development of locomotion function (rather late one) was associated with the development of the blood circulation system and a) cardiovascular system with functionally different proximal (heart as a pump and dempfer system of elastic arteries) and distal part formed by local peristaltics pumps of paracrine cells communities – muscular type of arteriols; b) skeletal muscles and c) adipocytes – specialized cells of loose connective tissue for storage of fatty acids as substrate for ATP synthesis by mitochondria and insulin system. Biological role

of insulin is energy supply for locomotary function. The insulin system had formed the system of apoB-100 low density lipoproteins, insulin-dependent cells with insulin receptors and glucose transport proteins 4 on the membranes. These structures activate lipogenesis from glucose and inhibit all lipolysis processes in vivo. Insulin system is rather late phylogenetically, it acts at the level of organism and can't influence on lipolysis processes in paracrine communities. Diabetes mellitus is first of all, pathological condition related to fatty acids metabolism, and only secondary — to glucose.

Key words: biological functions, biological reactions, pathogenesis, arterial hypertension, diabetes mellitus, excretion, inflammation.

Данные для корреспонденции:

Титов Владимир Николаевич, д. м. н., профессор, руководитель лаборатории клинической биохимии липидов и липопротеинов Института клинической кардиологии
ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития,
тел.: 414-63-10, e-mail: vn_titov@mail.ru

Двадцатый век был первым, в котором со столь высокой частотой стали развиваться заболевания, которые позже назвали «метаболическими пандемиями». В настоящее время в популяции homo sapiens они являются наиболее частой причиной смертности. Это атеросклероз, эссенциальная артериальная гипертония, сахарный диабет, метаболический синдром, ожирение и неалкогольная жировая болезнь печени. В XX веке при развитии биологии, генетики и медицины мы не смогли предложить четкий патогенез ни одного из этих заболеваний; не понятно и то, что их объединяет и почему при них столь часто мы выявляем симптомы синдрома системного воспалительного ответа [27]. Для выяснения этого стали формировать новые медицинские специальности, готовить специалистов по фундаментальной медицине. Мы воспринимаем ее как раздел медицинских знаний, который призван выяснять патогенез наиболее распространенных в популяции заболеваний человека при использовании методологических приемов общей биологии и основ физической химии.

Приемами биологии являются: а) единение структуры и функции; б) единение основных этапов филогенеза; в) единая технология становления в филогенезе функциональных систем и г) общебиологический системный подход. Это означает выяснение: а) причинно-следственных отношений в становлении физиологических (патофизиологических) процессов и б) патогенеза наиболее распространенных в популяции заболеваний. Мы предлагаем дополнить перечень методологических приемов общей биологии следующим: а) преемственность становления в филогенезе биологических функций и б) биологическая субординация. Становление биологических функций на ступенях филогенеза происходило не путем формирования чего-то принципиально нового, как это происходит при мутациях, а путем последовательного совершенствования того, что сформировано на более ранних ступенях. Согласно биологической «субординации», новая регуляция in vivo органично надстраивается над ранее существующей, функционально с ней взаимодействует, но изменить регуляторное влияние филогенетически более ранних гуморальных медиаторов они не могут.

Развитие одно- и многоклеточных организмов происходило путем совершенствования биологических функций на ступенях филогенеза [4]. Столь же медленно и параллельно в филогенезе происходило формирование и патологических процессов [9]. По нашему мнению, если частота заболевания в популяции человека превышает 5–7%, а) основу патогенеза составляет нарушение биологических функций и биологических реакций и б) для каждого из заболеваний патогенез рационально выстраивать в эволюционном аспекте. Мы предлагаем по-иному рассмотреть патогенез распространенных заболеваний в популяции человека на основании:

- теории биологических функций и биологических реакций;
- регуляции функции и метаболизма in vivo на трех филогенетически разных, последовательных уровнях и
- становления физиологических и патологических процессов в эволюционном развитии.

Теория биологических функций и биологических реакций

Мы полагаем, обоснованно рассматривать становление патологических процессов одновременно со становлением в филогенезе биологических функций и биологических реакций. В течение миллиардов лет на разных ступенях филогенеза сформировались:

- биологическая функция трофологии, функция питания;
- биологическая функция гомеостаза;
- биологическая функция эндоэкологии;
- биологическая функция адаптации;
- биологическая функция продолжения вида;
- биологическая функция локомоции и
- биологическая функция интеллекта [25].

Становление функций в филогенезе происходило не одновременно; между ними, порой, в филогенезе проходили сотни миллионов лет. Это надо принимать во внимание при построении патогенеза наиболее частых заболеваний в популяции человека. Если классификатор болезней ВОЗ включает около 30 000 нозологических

форм, мы вправе рассматривать все их как нарушение биологических функций и биологических реакций. При этом станет понятно, почему столь часто при заболеваниях мы выявляем одни и те же симптомы, синдромы, количественные изменения одних и тех же физико-химических и биохимических анализов, сходные нарушения метаболизма и неспецифичные изменения биологических констант [41], общие черты патологии [1].

Реализуют *in vivo* каждую из биологических функций — биологические реакции; одна реакция может участвовать в реализации нескольких биологических функций. И если растительные клетки являются аутотрофами и сами синтезируют для себя субстраты в форме белка, жиров и углеводов, то все животные клетки являются гетеротрофами и все субстраты вынуждены получать извне при реализации биологической функции трофологии, функции питания [19]. Становление биологической функции проходило длительно; между формированием липопротеинов (ЛП) высокой и низкой плотности прошли сотни миллионов лет. Биологическую функцию трофологии (питания) реализуют две биологические реакции — реакция экзотрофии и реакция эндотрофии. Реализация реакции экзотрофии происходит в течение нескольких часов после приема пищи в период постпрандиальной гипергликемии и гиперлипидемии; инсулин (ИНС) проявляет свою активность и резистентность (РЕЗ) к ИНС развивается в биологической реакции экзотрофии. Биологическая реакция эндотрофии реализована вне приемов пищи, в ночное время и длительно во время зимней спячки животных (период гибернации). В реакции экзотрофии происходит запасание экзогенных субстратов, в реакции эндотрофии — их расходование. В биологической реакции экзотрофии митохондрии окисляют глюкозу (ГЛЮ), а в биологической реакции эндотрофии — жирные кислоты (ЖК).

Биологическую функцию гомеостаза реализуют только многоклеточные; она призвана, мы полагаем, служить осуществлению одной цели: в межклеточной среде для каждой из клеток всегда всего должно быть достаточно. Функция гомеостаза не допускает снижения анализов или физико-химических параметров ниже нижней границы физиологического интервала. Реализуют функцию гомеостаза десятки специфичных биологических (физико-химических и биохимических) реакций. Они поддерживают концентрацию анализов (вода, электролиты, микроэлементы, субстраты, глюкоза, метаболиты, витамины и т. д.) выше нижней границы физиологического интервала. Более широкую (более узкую) трактовку биологической функции гомеостаза обосновать трудно [12].

Превышение верхнего предела физиологического интервала для каждого из анализов и физико-химического параметра есть нарушение иной биологической функции — эндоэкологии, «чистоты» межклеточной среды. Любой из анализов, содержание которого оказывается выше «нормы», организм расценивает как биологиче-

ский «мусор». И если биологическую функцию гомеостаза реализуют десятки специфичных реакций, то функцию эндоэкологии реализуют всего две неспецифичные реакции: биологическая реакция экскреции и биологическая реакция воспаления. Если мол. масса «мусора» в межклеточной среде не выше 70 кДа (мол. масса альбумина, АЛБ), удаление его происходит при реализации биологической реакции экскреции в нефроне путем выведения с мочой. Если же мол. масса эндогенных флогогенов (инициаторов воспаления) или экзогенных патогенов превышает эту величину и вывести их из организма биологической реакцией экскреции невозможно, утилизация их происходит *in situ* в биологической реакции воспаления.

Со времени И.И. Мечникова неспецифичный фагоцитоз и утилизацию чего-либо функциональными фагоцитами (оседлыми макрофагами и циркулирующими мононуклеарами) мы расцениваем как биологическую реакцию воспаления. Биологическим «мусором» становятся вода, электролиты, ГЛЮ, гормоны, ферменты, иммунные комплексы, фрагменты плазматических мембран, бактерии и вирусы, да и сами клетки при гибели их как по типу апоптоза, так и некроза [16]. Независимо от особенностей этиологии и патогенеза патологического процесса, если в межклеточной среде накапливается большой «мусор», то для утилизации его *in vivo* толл-рецепторы инициируют биологическую реакцию воспаления [14]. Ее в клетках интерстициальной, рыхлой соединительной ткани (РСТ) осуществляют оседлые (резидентные) макрофаги и те, которые образуются из моноцитов. При этом микроальбуминурия есть тест на замусоривание межклеточной среды малым «мусором», а повышение содержания в плазме крови С-реактивного белка в субклиническом интервале в форме пентамера является тестом биологической реакции воспаления; формируется эта реакция и при онкологической патологии.

Биологическими реакциями, которые задействованы в реализации *in vivo* биологической функции эндоэкологии, мы полагаем, являются также:

- биологическая реакция гидродинамического (гидравлического) давления, артериального давления (АД);
- биологическая реакция физиологичной денатурации эндогенных протеинов активными формами O_2 [11];
- биологическая реакция транцитоза;
- биологическая реакция гипертермии [53, 54] и
- биологическая реакция апоптоза [45].

Чтобы активировать биологическую реакцию экскреции и удалить из межклеточной среды малый «мусор» в нефроне почек, необходимо увеличить гидродинамическое давление над базальной мембраной [58]. Поэтому накопление в межклеточной среде малого «мусора» инициирует повышение АД, которое призвано увеличить фильтрацию в гломерулах — биологическую

реакцию экскреции. Когда не сформировавшие апоВ-100 лиганд ЛПНП низкой плотности (ЛПНП) становятся в крови большим «мусором», они подлежат утилизации оседлыми макрофагами в локальном пуле интерстициальной ткани. Интерстициальной тканью для внутрисосудистого пула межклеточной среды является интима артерий эластического типа [22]. Однако чтобы толл-рецепторы на мембране макрофагов признали безлигандные ЛПНП «не своими», их надо вначале физиологично денатурировать. Эту функцию *in vivo* исполняют циркулирующие нейтрофилы в физико-химической реакции «респираторного взрыва»: они образуют и секретируют в межклеточную среду активные формы O_2 , которые на поверхности цитозольных белков и ЛПНП в крови формируют афизиологичные иммунные эпитоты. Активация окисления большого «мусора» активными формами O_2 есть часть биологической реакции воспаления, синдрома системного воспалительного ответа [51]. Активность секреции нейтрофилами активных форм O_2 вторична и субстрат-зависима от количества «мусора» в межклеточной среде, который требуется физиологично денатурировать. Основным эндогенным захватчиком активных форм O_2 является эндогенная ω -9 С 18:1 олеиновая моноеновая ЖК, а активирует ее синтез гормон надпочечника дегидроэпиандростерон [29].

Для того, чтобы безлигандные ЛПНП оказались в интима артерий, необходимо преодолеть монослой эндотелия; клетки эндотелия выводят в интиму ЛПНП при реализации биологической реакции трансцитоза. Она начала функционировать на поздних ступенях филогенеза у многоклеточных при объединении более ранних реакций эндо- и экзоцитоза. Активация биологической реакции трансцитоза происходит пропорционально количеству эндогенных флогогенов в межклеточной среде [26]. Активирует филогенетически позднюю реакцию трансцитоза столь же поздняя биологическая реакция гидродинамического давления, АД. Чем больше эндогенных флогогенов надо вывести из сосудистого русла в интиму, в интерстициальный пул РСТ, тем больше повышается АД в пределах физиологичных значений и выше. Если *in vivo* при локальном нарушении перфузии каким-то клеткам чего-то недостает (O_2 , ГЛЮ), проприоцептивная эфферентная сигнализация с периферии прямо в сосудодвигательный центр инициирует афферентное симпатическое влияние на миокард, что реализуется в повышении АД. Таким образом, биологическая реакция АД задействована в реализации биологической функции эндоэкологии и биологической функции гомеостаза.

АД эффективно при выведении чего-либо из локального внутрисосудистого пула в иные пулы межклеточной среды. Однако как активировать выведение биологического «мусора» (экзогенных инфекционных патогенов, токсинов) из локального пула межклеточной среды в пул внутрисосудистой жидкости и далее в пул первичной мочи? Как активировать биологическую ре-

акцию трансцитоза через бислой клеток (эндотелий + астроциты в гемато-энцефалическом барьере, эндотелий + трофобласты в плаценте, эндотелий + подоциты в клубочках нефрона, эндотелий + пневмоциты в легких)? Напомним, что каждый орган *in vivo* располагает собственным локальным пулом интерстициальной РСТ и оседлыми макрофагами, которые утилизируют эндогенные флогогены и экзогенные патогены *in situ*; однако иногда их функции недостаточно. Такой биологической реакцией, мы полагаем, является гипертермия [13, 28]; она изменяет физико-химические свойства липидов плазматической мембраны клеток [6], увеличивает жидкостность, проницаемость [50] и усиливает биологическую реакцию трансцитоза через мембраны бислоя клеток (токсинов и бактерий) по градиенту концентрации. Гипертермия, повышение t° тела в $40^\circ C$ [47] и выше — это, мы полагаем, биологическая реакция биологической функции эндоэкологии. Противоположной является адаптация мембран к низким температурам [8] и адаптивное краткосрочное понижение проницаемости. Биологическая реакция апоптоза удаляет из межклеточной среды и клетки [16], когда они становятся биологическим «мусором». Они или исполнили свою биологическую роль или необратимо повреждены при патологическом процессе. По типу апоптоза, через считанные часы, заканчивают свою жизнь нейтрофилы, инволюции подвергаются лимфоидные клетки тимуса. Гепатоциты, в которых при неалкогольной жировой болезни печени накапливаются триглицериды (ТГ) типа трипальмитат, также гибнут по типу апоптоза, как и ороговевающие клетки эпидермиса.

Биологическую функцию адаптации реализуют: а) биологическая реакция стресса; б) биологическая реакция компенсации; в) биологическая реакция врожденного иммунитета и г) биологическая реакция приобретенного иммунитета [32]. Заметим, что биологическая реакция стресса филогенетически ранняя, гуморально регулируемая, которую реализуют и одноклеточные. Биологические реакции компенсации *in vivo* многообразны и реализованы на уровне как клеток, так и организма:

- биологическая реакция краткосрочной адаптации, которую клетки реализуют путем синтеза спирта холестерина, конденсации его в плазматической мембране и отгораживания от временно афизиологичной внешней среды [15];
- биологическая реакция долгосрочной адаптации к понижению в филогенезе температуры окружающей среды путем синтеза клетками более длинноцепочечных, ненасыщенных ЖК и изменения физико-химических параметров плазматической мембраны [30];
- синдром компенсаторной противовоспалительной защиты [7], при котором *in vivo* происходит «контроль» соответствия биологической реакции воспаления степени «замусоривания» меж-

клеточной среды эндогенными флогогенами или экзогенными патогенами;

- синтез клетками семейства белков теплового шока, белков-шаперонов, с целью сохранения третичной и четвертичной структуры физиологично наиболее важных протеинов; это одновременно и биологическая реакция стресса и реакция компенсации; после каждой реакции стресса, даже эмоционального, остается шлейф белков-шаперонов, которые клетки РСТ утилизируют путем биологической реакции воспаления.

Биологическая реакция врожденного иммунитета имеет много общего с биологической функцией эндоэкологии. Связывание липополисахаридов — токсинов Грамм-отрицательных бактерий с липополисахарид-связующим белком есть реакция врожденного иммунитета, но далее удаление из межклеточной среды биологического «мусора» осуществляет биологическая функция эндоэкологии. Биологическая реакция патологической компенсации составляет, мы полагаем, основу патогенеза атеросклероза. При алиментарном дефиците эссенциальных полиеновых ЖК или блокаде биодоступности их для РСТ клетки начинают компенсаторный синтез *in vivo* эйкозаноидов не из физиологичных эйкозапентаеновой и арахидоновой эссенциальных полиеновых ЖК, а из эндогенной ненасыщенной дигомо- γ -линоленовой ЖК. Такие простаглицлины, тромбоксаны и лейкотриены типа один являются афизиологичными. Они нарушают регуляцию каждой из клеток *in vivo*; это и есть атеросклероз с его многообразными клиническими проявлениями [26]. Мы же за атеросклероз принимаем один из его симптомов — атероматоз [42], утилизацию безлигандных ЛПНП в локальном интерстициальном пуле РСТ в интима эластических артерий.

Биологическая функция локомоции сформировалась далеко не на ранних ступенях филогенеза, когда регуляция метаболизма, в основном, была завершена. Она оказала влияние на все биологические функции, сформировав кардинальные преобразования *in vivo*. В итоге биологическая функция локомоции определила особенности высших животных: миграцию с целью поиска, добывания пищи, адаптации к условиям внешней среды и сохранения вида. В ходе становления функции локомоции сформировались:

- замкнутая система кровообращения, сердца и артерий эластического типа;
- скелетные поперечнополосатые мышечные сократительные клетки и мускулатура;
- клетки РСТ — специализированных адипоцитов и
- система ИНС. Биологическая роль ИНС — обеспечение энергией биологической функции локомоции [23]. Система ИНС, действуя на уровне организма, органично надстроилась над аутокринной и паракринной регуляцией, тесно с ними взаимодействует, но повлиять на про-

цессы, которые сформировались на более ранних ступенях филогенеза, ИНС не может.

Результатом становления *in vivo* системы ИНС явилось:

- формирование β -клеток в островках Лангерганса, которые стали синтезировать и запасать ИНС;
- образование системы апоВ-100 ЛПНП, которые стали переносить к клеткам ЖК в форме неполярных ТГ (эфиров со спиртом глицерином) и эфиров со спиртом холестерина;
- активное поглощение клетками ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) через апоЕ/В-100 рецепторы ЖК-субстратов для наработки энергии;
- активное поглощение клетками ЛПНП путем апоВ-100 рецепторного эндоцитоза ЖК для построения мембран и синтеза эйкозаноидов;
- формирование пула ИНС-зависимых клеток, которые имеют на плазматической мембране рецепторы к ИНС и ИНС-зависимые глюкозные транспортеры GLUT4: ими являются скелетные миоциты, адипоциты и перипортальные гепатоциты.

ИНС стал:

- активировать синтез и запасать субстраты для наработки клетками энергии (синтеза АТФ);
- усиливать пассивное поглощение клетками неэтерифицированных ЖК в форме НЭЖК из ассоциатов АЛБ + НЭЖК в межклеточной среде [38];
- активировать синтез гликогена;
- усиливать ферментные реакции липогенеза — синтез из ГЛЮ пальмитиновой насыщенной ЖК (Пальм н-ЖК), мы полагаем, «гидрофобной формы» ГЛЮ;
- активировать синтез *in vivo* из Пальм н-ЖК ненасыщенной олеиновой моноеновой ЖК (моно-ЖК) и
- этерифицировать ЖК в физиологичные олеиновые ТГ. Одновременно ИНС блокирует липолиз, гидролиз ТГ с освобождением НЭЖК и β -окисление ЖК в митохондриях. Несмотря на многостороннее действие, ИНС реализует одну биологическую функцию — обеспечение энергией биологической функции локомоции. При этом атеросклероз, эссенциальная артериальная гипертензия, ожирение, сахарный диабет, метаболический синдром и неалкогольная жировая болезнь печени — нарушения одной биологической функции — локомоции.

Паракринные сообщества клеток

На ранней ступени развития многоклеточных, когда эукариоты начали функциональную специализацию, стали формироваться ассоциаты клеток — первичные многоклеточные. Как только одна из клеток оказалась

изолированной от внешней среды и сформировался пул межклеточной жидкости, сразу встали вопросы:

- как эта клетка будет реализовывать биологическую функцию трофологии, биологическую реакцию экзотрофии;
- как поддерживать «чистоту» межклеточной среды (биологическая функция эндоэкологии), и
- кто будет поддерживать в межклеточной среде оптимальную концентрацию субстратов, биологическую функцию гомеостаза и как организовать циркуляцию межклеточной среды — локальную гидродинамику [17]. Со времен Р. Вирхова мы привержены целлюлярной теории и все, что происходит *in vivo*, рассматриваем как результат функции клеток [20]. Регуляция каждой из клеток происходит на аутокринном уровне. У приматов и человека каждая из специализированных клеток сохранила те функциональные возможности, которыми она обладала, будучи одноклеточной. Каковы же были те ранние формы многоклеточных, которые в итоге сформировали функциональное многообразие органов? Этой промежуточной формой, мы полагаем, были паракринные сообщества клеток, структурные и функциональные единицы будущих органов.

Паракринное сообщество, мы полагаем, — функциональные ассоциаты трех видов клеток:

- специализированные клетки, которые определяют функцию паракринного сообщества;
- клетки локального перистальтического насоса (эндотелий + гладкомышечные клетки), которые осуществляют локальную перфузию сообщества, и
- клетки РСТ, которые а) реализуют биологическую функцию эндоэкологии и б) формируют паракринную регуляцию [2].

Субстраты для биологической функции трофологии и гомеостаза клетки сообщества пассивно поглощают из пула межклеточной среды. Ранними гуморальными медиаторами сообществ в третьем мировом океане [3] стали производные ω -3 С 20:5 эйкозапентаеновой эссенциальной полиеновой ЖК — простаноиды: простаглицлины, тромбоксаны и лейкотриены типа 3. Функцию локального перистальтического насоса регулировали оксид азота (NO) и пептид эндотелин. Функциональные потребности паракринного сообщества локально стали инициировать параметры перфузии. Паракринные сообщества не были отделены друг от друга, и чтобы гуморальные медиаторы проявляли активность в пределах одного сообщества, время их действия ограничилось долями секунды. *In vivo* нет ни одного гуморального медиатора, ни одного гормона, действие которых не было бы отработано в паракринных сообществах. После аутокринной регуляции на уровне клеток *in vivo* произошло формирование второго уровня регуляции на уровне паракринных сообществ, позже органов.

Паракринным сообществом является нефрон, но это не функционально дифференцированный по длине капилляр, как это часто изображают, а функциональное единение трех видов клеток: а) эпителий капилляра нефрона, б) афферентная и эфферентная артериолы — локальный перистальтический насос и в) паратубулярная интерстициальная ткань. Клетки юкстагломерулярного аппарата и *macula densa* — тоже часть нефрона; они регулируют локальные параметры гемо- и гидродинамики в пуле межклеточной среды (пуле первичной мочи). Из подобных по структуре паракринных сообществ состоят все органы *in vivo*, и принципы гуморальной, локальной регуляции гемодинамики в паракринных сообществах во всех органах являются одинаковыми. Миллионами лет в филогенезе разные ассоциаты паракринных сообществ функционировали в условиях незамкнутого кровообращения в едином пуле межклеточной среды; перфузию и реализацию функций обеспечивали артериолы мышечного типа. Они не имели интимы, и функцию локальных насосов регулировали паракринные сообщества. Это продолжалось миллионы лет, пока не стала формироваться биологическая функция локомоции, функция движения. В реализации ее все паракринные сообщества (органы) призваны функционировать сочетанно и интенсивно. При становлении функции локомоции сформировалась замкнутая система кровообращения, сосудисто-сердечная система.

Произошло это путем объединения миллионов локальных перистальтических насосов, артериол мышечного типа путем формирования артерий эластического типа и центрального насоса замкнутой системы — сердца. Если быть внимательным, можно увидеть: сердце — многокамерный, клапанный, циклический, конструктивно совершенный и саморегулирующийся насос, но это хотя и до неузнаваемости эволюционно измененная, но все-таки артериола мышечного типа. Единое артериальное русло стало состоять из двух функционально разных частей:

- филогенетически поздний, проксимальный отдел — сердце и артерии эластического типа; регулирует его сосудодвигательный центр продолговатого мозга; тест оценки функции — величина АД;
- филогенетически ранний, дистальный отдел — миллионы артериол мышечного типа — локальные перистальтические насосы; регулирует их функциональная активность паракринных сообществ; тестом оценки функции является определение эндотелий-зависимой (поток-зависимой) вазодилатации [21]. Пул интерстициальной ткани для а) артерий эластического типа и б) замкнутого внутрисосудистого пула межклеточной среды локализован в интима артерий эластического типа. В замкнутой системе большой «мусор» из сосудистого русла в интиму артерий эластического типа переносят клетки эндотелия,

фагоцитируют же и утилизируют его оседлые макрофаги интимы.

Функционально миокард призван в проксимальном отделе артериального русла, артериях эластического типа докачать кровь до артериол мышечного типа — до локальных перистальгических насосов, которые регулируют паракринные сообщества, определяя, как функционально перераспределить кровотоки между органами и тканями. Согласно методологическому приему биологической «субординации», филогенетически более позднее сердце и сосудодвигательный центр не могут оказывать влияние на функцию локальных перистальгических насосов; в каждый момент состояние дистального отдела артериального русла является отражением функциональной активности органов и тканей, включая и физиологичную, динамическую величину периферического сопротивления кровотоку. В биологической функции локомоции сердце, проксимальный и дистальный отделы артериального русла, все органы функционируют сочетанно при главенствующей роли сосудодвигательного центра. В спокойном состоянии, при развитии локальных афизиологичных процессов на уровне паракринных сообществ и органов, взаимоотношение проксимального и дистального отделов артериального русла (сердца и артериол мышечного типа) не столь безоблачны. Несоответствие процессов регуляции метаболизма на уровне организма и уровне паракринных сообществ есть основа столь широко распространенной в популяции человека эссенциальной артериальной гипертонии [24].

При нарушении биологической функции гомеостаза или эндоэкологии в одном или нескольких паракринных сообществах, если сами они не в силах это компенсировать, проприоцептивная информация достигает ядер продолговатого мозга, сосудодвигательного центра. В ответ симпатическая афферентная иннервация из центра достигает сердца, инициирует увеличение ударного объема и частоту сердечных сокращений, повышая АД в пределах физиологичных величин в проксимальном, далее дистальном отделах артериального русла путем системного повышения АД. Увеличение перфузии устраняет нарушение биологических функций. Однако, если при такой компенсации увеличение АД продолжается длительно, это нарушает локальную гидродинамику в паракринных сообществах почек [31], головного мозга [43] и легких [44, 52]. Возрастание гидродинамического (гидравлического) давления над мембраной гломерул активно, существенно увеличивает уровень гломерулярной фильтрации, который, в принципе, может превысить возможности пассивной реабсорбции субстратов из локального пула первичной мочи в проксимальных канальцах нефрона. В конечном итоге это может привести к потере части единого пула межклеточной среды.

Чтобы этого не произошло, тубуло-гломерулярные механизмы паракринно регулирующегося нефрона по

механизмам обратной связи начинают понижать гидродинамическое давление над базальной мембраной гломерул путем спазмирования афферентной артериолы мышечного типа — перистальгического насоса нефрона. Это восстанавливает гидродинамику нефрона, но повышает периферическое сопротивление кровотоку; последнее в еще большей мере способствует повышению АД в проксимальном отделе артериального русла. Так формируется порочный круг, в результате чего постепенно происходит формирование гломерулосклероза, гибель нефронов и интерстициального нефрита. Гуморальными медиаторами тубуло-гломерулярной обратной связи являются каскад ренин → ангиотензиноген → ангиотензин превращающий фермент → ангиотензин I → ангиотензин II → рецепторы к ангиотензину II. Подобное же происходит и в паракринных сообществах легких; повышение АД в проксимальном отделе приводит к увеличению скорости кровотока в дистальном отделе артериального русла — паракринных сообществах легких и падению диффузии газов через бислой эндотелий-пневмоциты, гипоксии и гиперкапнии. Такие же патологические изменения происходят и в паракринных сообществах головного мозга. Увеличение АД в проксимальном отделе артериального русла, в паракринных сообществах мозга приведет к увеличению давления спинномозговой жидкости, чему артериолы мышечного типа паракринных сообществ усиленно сопротивляются. Развивается синдром Кушинга, при котором повышение АД приводит к падению скорости кровотока в артериолах мозга. Заметим, что во всех паракринных сообществах *in vivo* нормализацию локальной перфузии в паракринных сообществах регулируют одни и те же гуморальные медиаторы ренин → ангиотензин II.

К какому же разделу клинической медицины относится биологическая реакция гидродинамического артериального давления? На основании того, что она является одной из основных в реализации биологических функций гомеостаза, эндоэкологии и адаптации, повышение АД в проксимальном отделе сосудистого русла относится ко всем, без исключения, разделам клинической медицины, но измеряют АД чаще кардиологи; на этом основании повышение АД относят к кардиологии. АД является в первую очередь тестом нарушенного метаболизма, той биологической реакцией, которая призвана компенсировать нарушения метаболизма путем усиления локальной перфузии, в частности и на уровне паракринных сообществ. Каково же значение физиологичного уровня АД? Мы полагаем, нормальный уровень АД означает, что *in vivo*:

- не нарушена биологическая функция гомеостаза и не активирована биологическая функция адаптации;
- не нарушена биологическая функция эндоэкологии, не происходит накопление в межклеточной среде ни малого (мол. масса < 70 кДа), ни большого биологического «мусора» (>70 кДа),

- не повышен в плазме крови уровень С-реактивного белка в субклиническом интервале [27];
- не нарушена биологическая реакция экскреции, активно регулируемый уровень фильтрации в гломерулах и пассивный процесс реабсорбции в проксимальных канальцах, нет микроальбуминурии;
- не активирована биологическая функция воспаления;
- не нарушены проницаемость монослоя эндотелия и тест эндотелий-зависимой вазодилатации, и
- не нарушена проницаемость бислойных структур на границе локальных пулов межклеточной среды (бислой эндотелий + астроциты — гематоэнцефалический барьер, эндотелий + трофобласты — плацентарный барьер, эндотелий + подоциты — почечный барьер и эндотелий + пневмоциты — легочный барьер).

Становление биологических функций на разных ступенях филогенеза

«И сотворил бог человека по образу своему, по образу Божию сотворил мужчину и женщину; сотворил их. И благословил их Бог и сказал им: плодитесь и размножайтесь... И был вечер, и было утро: день шестой» (Ветхий Завет, Первая книга Моисея. Бытие). Мы представляем себе, что человек создан единожды, сразу, «по образу и подобию». По сути же, нашими «ранними предками» миллионы лет назад явились простейшие, как известная всем сенная палочка, «туфелька», *Paramecia caudatum*. Уже в аутокринной регуляции у простейших заложены основы биологических функций, биологических реакций и дифференцированных клеток. Развитие каждой из биологических функций и реакций паракринных сообществ и органов происходило на протяжении миллионов лет, и сколько было сформировано вариантов, сказать трудно; информация о наиболее важных этапах становления структуры и функции заложена в геноме каждой из специализированных клеток. Поэтому теория патогенеза реальна, если она включает эволюционную составляющую.

На самом деле становление каждой биологической функции и биологической реакции происходило (и происходит) на протяжении миллионов лет при последовательном формировании вариантов, которые, согласно биологическому принципу преемственности в эволюции, формируются при развитии того, что сделано на более ранних ступенях филогенеза. Наиболее поздно в филогенезе начато становление биологической функции локомоции. Функция локомоции инициировала формирование а) замкнутой системы кровообращения и б) сердца как центрального насоса, в) поперечнополосатой, скелетной мускулатуры, наиболее молодых в филогенезе клеток г) адипоцитов и специализированной, гуморально регулирующей жировой ткани —

РСТ, и д) становление системы ИНС. Единая биологическая роль ИНС, мы полагаем, состоит в обеспечении субстратами энергии биологической функции локомоции. Для биологических целей, которые призван реализовать ИНС, ГЛЮ является явно неподходящим субстратом: а) энергетическая ценность ее низкая, б) ГЛЮ гидрофильна, это не позволяет сформировать активное поглощение ее клетками и в) большие количества гликогена депонировать негде. Поэтому ИНС все внимание «уделил» ЖК; они а) гидрофобны, клетки могут их активно поглощать; б) энергетическая ценность ЖК высока и в) депонировать их *in vivo* можно неограниченно. Однако углеводы часто являются основным субстратом пищи. Если ГЛЮ трудно депонировать, надо а) окислять ее в митохондриях в первую очередь и оставшееся количество б) перевести в форму, в которой ГЛЮ можно запасать. Такой формой является Пальм н-ЖК, которая далее может быть превращена в олеиновую моно-ЖК. Однако активировать окисление ГЛЮ в митохондриях не столь просто.

Если мы, с учетом ранних ступеней филогенеза, расставим все субстраты окисления митохондриями в порядке убывания а) константы скорости реакции, б) образования ацетил-КоА из ЖК и в) синтеза АТФ в цикле Кребса [55, 59], получится последовательность:

- кетоновые тела (КТ) — метаболиты самой короткой С 4 масляной ЖК — бутирата: β-гидроксибутират, ацетоацетат и ацетон;
- короткоцепочечные С 6–С 10 н-ЖК;
- среднецепочечные С 12 и С 14 н-ЖК;
- длинноцепочечная С 16:0 пальмитиновая (Пальм) н-ЖК, для которой во внутренней мембране митохондрии имеют специфичный транспортер карнитин-пальмитоил ацилтрансферазу;
- ω-9 эндогенная и ω-6 экзогенная С 18:1 олеиновая моно-ЖК, которая при двойной связи (-С=С-) в цепи имеет высокую константу скорости окисления [10], по сравнению с Пальм н-ЖК и
- ГЛЮ. Становление этой последовательности, можно полагать, произошло еще в митохондриях прокариотов, и, согласно «биологической субординации» и биологическим «запретам» эволюции [18], изменениям не подлежит.

Митохондрии — самые древние из клеточных оргanelл; они имеют еще неспирализованную ДНК, начинают окислять ГЛЮ только при условии, что в цитозоле клеток нет субстратов с более высокой константой скорости окисления. ИНС усилит не только активированное (пассивное) поглощение клетками ГЛЮ через ГЛЮТ4, но и окисление ГЛЮ в митохондриях, если в цитозоле не будет ни КТ, ни иных полярных НЭЖК. Митохондрии регулированы аутокринно; они не воспринимают медиаторы паракринных сообществ и ИНС. Поэтому для начала окисления митохондриями ГЛЮ ИНС приходится блокировать липолиз в ИНС-зави-

симых клетках (на уровне организма) и понизить содержание в цитозоле всех метаболитов ЖК с более высокой константой скорости окисления. Липолиз же на аутокринном уровне блокирует филогенетически ранняя а) гипергликемия в межклеточной среде, б) в цитозоле при в) биохимическом цикле Рендла [39]. В биологической функции экзотрофии, при постпрандиальной гипергликемии и гиперинсулинемии, ИНС а) ингибирует липолиз [35], б) лишает митохондрии возможности окислять КТ, ЖК и в) активирует поглощение клетками ГЛЮ и г) окисление ее в митохондриях. Одновременно клетки депонируют ЖК в форме ТГ для обеспечения энергией биологической функции локомоции. ИНС действует только в биологической реакции экзотрофии; в биологической реакции эндотрофии β-клетки не секретуют ИНС, а только накапливают. Следовательно, ИНС активирует окисление ГЛЮ в клетках путем регуляции метаболизма, в первую очередь, ЖК; поэтому сахарный диабет можно формально именовать патологией метаболизма ЖК. Это в полной мере подтверждают эксперименты с D,L-аминокортином [40].

Если действие ИНС реализовано в биологической реакции экзотрофии, то и резистентность (РЕЗ) к ИНС развивается только после приема пищи, а также в тесте с нагрузкой ГЛЮ. Что же есть резистентность к ИНС? Мы полагаем, это патофизиологическое состояние, при котором нет нарушений ни секреции, ни действия ИНС на уровне организма. Однако происходят афизиологические (патологические) процессы на уровне паракринных сообществ, на которые филогенетически поздний ИНС влияние не оказывает. Основными причинами РЕЗ к ИНС являются:

- нарушение биологической функции адаптации и усиление действия тиреоидных гормонов, гормона роста, катехоламинов, глюкокортикоидов и эстрогенов, которые физиологично активируют гормонзависимую липазу в пуле интерстициальной РСТ паракринных сообществ, увеличивая содержание НЭЖК в межклеточной среде сообщества и ТГ в печени [36], нарушая функциональную активность монослоя эндотелия [46];
- нарушение биологической функции эндоекологии, «замусоривание» межклеточной среды большими эндогенными флогогенами и активация биологической реакции воспаления по типу апоптоза или некроза [16] с усилением липолиза в интерстициальной ткани и повышением содержания НЭЖК в межклеточной среде паракринных сообществ [33]. Однако в условиях централизованного кровообращения межклеточная среда каждого паракринного сообщества стала частью единого пула среды, в котором и происходит повышение содержания НЭЖК.

При усилении пассивного поглощения всеми клетками НЭЖК и появлении их в цитозоле митохондрии

останавливают окисление ГЛЮ и начинают окислять НЭЖК; при этом содержание ГЛЮ в цитозоле увеличивается [56]. Поэтому клетки уменьшают и пассивное поглощение ГЛЮ из межклеточной среды с формированием гипергликемии и далее компенсаторной гиперинсулинемии. Синдром РЕЗ к ИНС формируется *in vivo* на уровне организма, когда филогенетически поздний ИНС не может:

- а) заблокировать липолиз в клетках РСТ паракринных сообществ, в которых его локально активируют филогенетически ранние гуморальные медиаторы;
- б) понизить содержание в межклеточной среде АЛБ + НЭЖК;
- в) остановить пассивное поглощение клетками НЭЖК и
- г) предотвратить снижение окисления митохондриями ГЛЮ. Даже выраженная гиперинсулинемия не может ингибировать активность гормонзависимой липазы в интерстициальной ткани паракринных сообществ; филогенетически ранние клетки не чувствительны к действию филогенетически позднего ИНС; у них нет рецепторов.

Рассмотрение этиологии и патогенеза наиболее распространенных в популяции человека заболеваний с позиций биологических функций и биологических реакций, при регуляции метаболизма *in vivo* на трех эволюционных уровнях, позволяет:

- осознать, что основой патогенеза заболеваний, частота которых в популяции человека превышает 5–7%, является нарушение биологических функций и биологических реакций;
- рассматривать общность становления в эволюции патогенеза эссенциальной артериальной гипертензии [48, 49] и РЕЗ к ИНС [37] как несоответствие регуляции процессов гидродинамического давления и метаболизма ЖК, ГЛЮ на уровне организма и в паракринных сообществах;
- оценивать диагностическое значение тестов при разных видах патологии не в рамках отдельных заболеваний [5, 34], а с позиций биологических функций и реакций: микроальбуминурия — превышение гломерулярной фильтрации над пассивной реабсорбцией в проксимальных канальцах; повышение С-реактивного белка в крови — «замусоривание» межклеточной среды *in vivo* эндогенными флогогенами (экзогенными патогенами) большой мол. массы, активация биологической реакции воспаления;
- с позиций совершенствования профилактики и лечения рассматривать сахарный диабет, в первую очередь как патологию метаболизма ЖК и во вторую — как патологию метаболизма ГЛЮ;
- понять функциональное, клиническое и диагностическое значение двух филогенетически разных отделов артериального русла, роль АД как

биологической реакции, которая вовлечена в реализацию многих биологических функций; осознать биологические основы нормализации столь часто повышенного артериального давления и — принимать во внимание положение [57], что любое биологическое исследование оказывается оправданным только в том случае, если оно имеет эволюционный выход. Патогенез каждой из распространенных в популяции человека нозологической формы заболевания имеет длительный эволюционный анамнез. При этом нет ничего более практичного, чем хорошая теория (Д.И. Менделеев). В этом свете холестеринотворная теория атеросклероза (покармлил → получил) не может быть признана реальной. Какова теория, таковы успехи в лечении, в профилактике и снижении заболеваемости в популяции homo ne всегда sapiens.

Литература

- Абрамов В.В. Возможные особенности регулирующего влияния разных видов соединительной ткани // Успехи совр. биол. — 2011. — Т. 131 (1). — С. 30–36.
- Абрамов В.В., Абрамова Т.Я. Интерлейкин-1 в цитокиновой сети: фундаментальные и прикладные аспекты // Успехи совр. биол. — 2007. — Т. 127 (6). — С. 570–579.
- Бгатов А.В. Биогенная классификация химических элементов // Философия науки. — 1999. — № 2 (6). — С. 1–12.
- Вельков В.В. Новые представления о молекулярных механизмах эволюции: стресс повышает генетическое разнообразие // Мол. биология — 2002. — Т. 36 (2). — С. 1–9.
- Волков В.С., Поселюгина О.Б. Эссенциальная артериальная гипертензия и артериальная гипертензия при метаболическом синдроме // Клиническая медицина. — 2011. — № 2. — С. 64–65.
- Выборнова И.И., Епифанов С.Ю., Каданцев В.Н., Кононенко К.М. Исследование механизмов влияния температурного и химических факторов на функционирование биологических мембран // Физиол. человека. — 1997. — Т. 23 (1). — С. 70–80.
- Галкин А.А., Демидова В.С. Роль адгезии в активации нейтрофилов и цитотоксическом взаимодействии нейтрофилов с эндотелием // Успехи совр. биол. — 2011. — Т. 131 (1). — С. 62–78.
- Климов С.В. Пути адаптации растений к низким температурам // Успехи совр. биол. — 2001. — Т. 121 (1). — С. 3–22.
- Кун Т. Структура научных революций. — М: Изд-во «Ермак», 2003. — 365 с.
- Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тишинин М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот // Бюлл. экп. биол. — 2004. — Т. 134, № 11. — С. 117–119.
- Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него бактерий // Биохимия. — 2001. — Т. 66 (5). — С. 592–609.
- Малов Ю.С. Гомеостаз — основное свойство живого организма // Медицина XXI века. — 2007. — № 5 (6). — С. 74–81.
- Мухутдинова Ф.И., Алева Г.Н., Хафизьянова Р.Х., Мухутдинов Д.А. Антипиретическая система организма // Вестник РАМН. — 2008. — № 5. — С. 44–48.
- Недоспасов С.А. Молекулярная иммунология — на стыке веков, на стыке дисциплин // Мол. биология. — 2011. — Т. 45 (1). — С. 3–6.
- Петров А.М., Касмов М.Р., Гинифтуллин А.Р., Тараканова О.И., Зефилов А.Л. Роль холестерина в процессах экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки // Рос. физиол. журнал. — 2009. — Т. 95 (7). — С. 762–772.
- Проскураков С.Я., Габай В.Л., Конопляников А.Г. Некроз — активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели // Биохимия. — 2002. — Т. 67 (4). — С. 467–491.
- Реутов В.П., Шехтер А.Н. Как в XX веке физики, химики и биологи отвечали на вопрос: что есть жизнь? // Успехи физиол. наук. — 2010. — Т. 180 (4). — С. 394–414.
- Свердлов Е.Д. Фундаментальные запреты биологии // Биохимия. — 2009. — Т. 74 (9). — С. 1157–1163.
- Скулачев В.П. Обнаружено фотосинтезирующее животное, способное месяцами жить за счет энергии света // Биохимия. — 2010. — Т. 75 (12). — С. 1729–1731.
- Сточик А.М., Пальцев М.А., Затравкин С.Н., Сточик А.А. Опровержение традиционных представлений о болезни и возникновение естественно-научных основ патологии (XVI–XIX века) // Вестник РАМН. — 2011. — № 2. — С. 40–52.
- Титов В.Н. Филогенез, структурная гетерогенность артериального русла и патогенез артериальной гипертензии // Артериальная гипертензия. — 2010. — Т. 16(3). — С. 333–342.
- Титов В.Н. Интима — биологический сорбционный фильтр. Специфичность патогенов и биологическая классификация воспалительного поражения интимы // Вестник РАМН. — 2003. — Т. 8. — С. 40–43.
- Титов В.Н. Инсулин — гуморальный фактор обеспечения энергией биологической функции локомоции // Вестник РАМН. — 2005 — № 2. — С. 3–8.
- Титов В.Н. Теория «периферического сердца» и становление в филогенезе сердечно-сосудистой (сосудисто-сердечной) системы // Вестник Санкт-Петербургского университета. — 2010. — Сер. 11, вып. 2. — С. 5–22.
- Титов В.Н. Теория биологических функций и ее применение при выяснении патогенеза распространенных заболеваний человека // Успехи совр. биологии. — 2008. — Т. 128 (5). — С. 435–452.
- Титов В.Н. Атеросклероз — проблема общей биологии: нарушение биологических функций питания и эндозеологии // Успехи совр. биологии. — 2009. — Т. 129 (2). — С. 124–143.
- Титов В.Н. Анатомические и функциональные основы эндотелий-зависимой вазодилатации, оксид азота и эндотелин. Артериолы мышечного типа как перистальтические насосы // Успехи соврем. биологии — 2010. — Т. 130 (4). — С. 360–380.
- Avery S.V., Lloyd D., Hawood J.L. Temperature-dependent changes in plasma-membrane lipid order and the phagocytotic activity of the amoeba *acanthamoeba castellanii* are closely correlated // Biochem. J. — 1995. — Vol. 312 — P. 811–816.
- Dmitriev L.F., Titov V.N. Lipid peroxidation in relation to ageing and role of endogenous aldehydes in diabetes and other age related diseases // Ageing. Res. Rev. — 2010. — Vol. 9 (2). — P. 200–210.
- Evershed R.P., Dudd S.N., Copley M.S. Chemistry of archaeological animal fats // Acc. Chem. Res. — 2002. — Vol. 35 (8). — P. 660–668.
- Farguhar M.G. The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten // J. Clin. Invest. — 2006. — Vol. 116. — P. 2090–2093.
- Finlay D., Cantrell D.A. Metabolism, migration and memory in cytotoxic T-cells // Nature. Rev. immunol. — 2011. — Vol. 11 — P. 109–117.
- Goto T., Lee J.Y., Teraminami A., Kim Y., Hirai S., Uemura T., Inoue H., Takahashi N., Kawada T. Activation of peroxisome proliferators activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes // J. Lipid. Res. — 2011. — Vol. 52. — P. 873–884.

34. Gupta V., Sachgeva S., Khan A.S., Hague S.F. Endothelial dysfunction and inflammation in different stages of essential hypertension // Saudi. J. Kidney. Dis Transpl. — 2011. — Vol. 22 (1). — P. 97–103.
35. Hamel F.G., Bennett R.G., Upward J.L., Duckworth W.C. Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes // *Endocrinology*. — 2001. — Vol. 142 (6). — P. 2702–2706.
36. Hodson L., McQuaid S.E., Humphreys S.M., Milne R., Fielding B.A., Frayn K.N., Karpe F. Greater fat oxidation in obese compared with lean men: an adaptive mechanism to prevent liver fat accumulation? // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2010. — Vol. 299 (4) — P. 584–592.
37. Holland W.L., Bikman B.T., Wang L.P., Yuguang G., Sargent K.M., Bulchand S., Knotts T.A. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice // *J. Clin. Invest.* — 2011. — Vol. 121 (5). — P. 1858–1870.
38. Holloway G.P., Bonen A., Spriet L.L. Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2009. — Vol. 89. — P. 455–462.
39. Hue L., Taegtmeier H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2009. — Vol. 297. — P. 578–591.
40. Jenkins D.L., Griffin O.W. DL-aminocarnitine and acetyl-DL-aminocarnitine. Potent inhibitors of carnitine acyltransferases and hepatic triglyceride catabolism // *J. Biol. Chem.* — 1985. — Vol. 260. — P. 14748–14755.
41. Langley-Evans S.C. Developmental programming of health and disease // *Proceedings Nutr. Soc.* — 2006. — Vol. 65. — P. 97–105.
42. Lindsay A.C., Choudhury R.P. Form to function: current and future roles for atherosclerosis imaging in drug development // *Nature*. — 2008. — Vol. 7. — P. 517–529.
43. Marks A.R. Physiological systems under pressure // *J. Clin. Invest.* — 2008. — Vol. 118 (2). — P. 41–413.
44. Minamino T., Komuro I. Regeneration of the endothelium as a novel therapeutic strategy for acute lung injury // *J. Clin. Invest.* — 2006. — Vol. 116. — P. 2316–2319.
45. Moley K.H., Mueckler M.M. Glucose transport and apoptosis // *Apoptosis*. — 2000. — Vol. 5 (2). — P. 99–105.
46. Muller-Marschhausen K., Waschke J., Drenckhahn D. Physiological hydrostatic pressure protects endothelial monolayer integrity // *Am. J. Physiol. Cel. Physiol.* — 2008. — Vol. 324–332.
47. Nelson T.E. Porcine malignant hyperthermia: critical temperatures for in vivo and in vitro responses // *Anesthesiology*. — 1990. — Vol. 73. — P. 449–454.
48. Okura T., Kurata M., Irita J., Enomoto D., Jotoku M., Nagao T., Koresawa M., Kojima S. Renal resistance index is a marker of future renal dysfunction in patients with essential hypertension // *J. Nephrol.* — 2010. — Vol. 23 (2). — P. 1175–1180.
49. Penesova A., Cizmarova E., Belan V., Blazicek P., Imrich R., Vlcek M., Vigas M., Selko D. Insulin resistance in young, lean male subjects with essential hypertension // *J. Human Hypertens.* — 2010. — Vol. 25 (6). — P. 391–400.
50. Porta A., Eletto A., Torok Z., Francescheli S., Glatz A., Vigh L., Maresca B. Changes in membrane fluid state and heat shock response cause attenuation of virulence // *J. Bacteriol.* — 2010. — Vol. 192 (7). — P. 1999–2005.
51. Quilley J. Oxidative stress and inflammation in the endothelial dysfunction of obesity: a role for nuclear factor kappa B? // *J. Hypertension*. — 2010. — Vol. 28. — P. 2010–2011.
52. Rehman J., Arcer S.L. A proposed mitochondrial-metabolic mechanism for initiation and maintenance of pulmonary arterial hypertension in fawn-hooded rats: the Warburg model of pulmonary arterial hypertension // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2010. — Vol. 661. — P. 171–185.
53. Robins H.J., Longo W. Whole body hyperthermia: simple complexities // *Intensive. Care. Med.* — 1999. — Vol. 25. — P. 898–900.
54. Shah A., Sahgal V., Subramani V. Membrane abnormality in malignant hyperthermia // *Acta. Neuropathol.* — 1989. — Vol. 78. — P. 86–89.
55. Spiekerkoeter U., Wood P.A. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models // *J. Inherit. Metab. Dis.* — 2010. — Vol. 33 (5). — P. 539–546.
56. Steinberg H.O., Tarshoby M., Monestel R., Hook G., Crolin J., Johnson A., Bayazeed B., Baron A.D. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation // *J. Clin. Invest.* — 1997. — Vol. 100. — P. 1230–1239.
57. Timofeeff-Ressovsky N.V., Zimmer K.G., Delbruk M. Studies on the phenotypic manifestation of hereditary factors. I. on the phenotypic manifestation of the genovariation radius incompletus in *DROSOPHILA FUNEBRIS* // *Genetics*. — 1927. — Vol. 12 (2). — P. 129–198.
58. Weder A.B., Schork N.J. Adaptation, allometry, and hypertension // *Hypertension*. — 1994. — Vol. 24. — P. 145–156.
59. Wolfe R.R. Metabolic interactions between glucose and fatty acids in humans // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1998. — Vol. 67. — P. 519–526.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Е.В. АБАКУШИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение Медицинский радиологический научный центр (ФГБУ МРНЦ) Минздравсоцразвития, лаборатория клинической иммунологии, г. Обнинск, Калужская область

Резюме. Клетки естественные киллеры (НК) — это субпопуляция лимфоцитов периферической крови, которые играют важную роль во врожденном иммунном ответе и не относятся ни к В-, ни к Т-лимфоцитам. Зрелые, циркулирующие в периферической крови НК-клетки имеют фенотип CD3–CD16+CD56+. Они опосредуют контакт-зависимый лизис чужеродных клеток-мишеней, не ограниченных по молекулам МНС (major histocompatibility complex) класса I, включая вирусинфицированные и опухолевые клетки. Эффекторные функции НК-клеток регулируются комплексом сигналов, полученных от различных стимулирующих и ингибирующих рецепторов, вовлеченных во взаимодействие с поверхностными лигандами клетки-мишени. «Золотым стандартом» определения цитолитической активности НК-клеток человека является тест по высвобождению радиоактивного хрома из клеток-мишеней. Этот метод нелегко выполнить в клинической практике из-за трудностей в утилизации радиоактивных отходов, короткого времени полураспада изотопов, дороговизны и сложностей в стандартизации. В статье описываются цитофлуориметрические методы для клинического определения активности НК-клеток. Эти методы позволяют избежать ряда проблем, связанных с использованием радиоактивности, кроме того, они быстрые и подлежат стандартизации.

Ключевые слова: клетки естественные киллеры (НК-клетки), фенотип, функция, цитотоксичность, проточный цитометр, цитофлуориметрические методы.

EVALUATION OF HUMAN NATURAL KILLERS ACTIVITY BY FLOW CYTOMETRY METHOD

E.V. AVAKUSHINA

Federal state budget institution “Medical radiological scientific center”, Ministry of Health care and social development, laboratory of clinical immunology, Obninsk, Kaluzsry region

Summary. Flow cytometric assay to determine human NK cell functional activity. Natural killer cells (NK cells) are a subset of non-B, non-T peripheral blood lymphocytes that appear to play a crucial role in the human innate immune response. Mature, circulating NK-cells express the CD3–CD16+CD56+ phenotype. They mediate a cell contact-dependent cytolysis non-MHC-restricted of foreign target cells, including virally infected cells, and tumor cells. The effector functions of NK cells are regulated by integrated signals across the array of stimulatory and inhibitory receptors engaged upon interaction with target cell surface ligands. The “gold standard” assay for NK cell activity has been the chromium release assay. This method is not easily performed in the clinical laboratory because of difficulties with disposal of radioactive, short reagent half-lives, expense, and difficulties with assay standardization. Here described a flow cytometric assay for the clinical measurement of NK cell activity. The assays avoid the problems associated with the use of radioactivity and are rapid and more amenable to standardization.

Key words: natural killer (NK) cells, phenotype, function, cytotoxicity, flow cytometry, flow cytometric assays.

Данные для корреспонденции:

Абакушина Е.В., 249039, Курчатова 66-15, г. Обнинск, Калужская область, тел.: (903) 814-33-82, e-mail: evabakushina@gmail.com

Иммунная система состоит из комплекса сетей клеточных и гуморальных компонентов, которые в первую очередь направлены на борьбу с чужеродными патогенами. Одним из важных компонентов этой системы являются клетки естественные киллеры (ЕК), или НК-клетки (natural killer cells) [23]. Они относятся к

большим гранулярным лимфоцитам, но не имеют на своей поверхности рецепторов Т-клеток (TCR-CD3) или В-клеток (BCR). НК-клетки выделены в особый класс лимфоцитов благодаря их уникальной способности быстро и без предварительной иммунизации лизировать вирусинфицированные и трансформированные клетки-

мишени, независимо от антител и комплемента. Они опосредуют цитолитическую реакцию в отсутствии молекул главного комплекса гистосовместимости — МНС класса I или II, на поверхности клеток-мишеней [23].

Поверхностные маркеры естественных киллеров

Использование моноклональных антител позволило идентифицировать уникальные поверхностные антигены на НК-клетках, а точнее, уникальные комбинации антигенов, которые могут встречаться и у других клеточных типов, таких как Т-клетки, миеломоноцитарные клетки и В-клетки. Основными антигенными маркерами естественных киллеров являются Fc-рецепторы для иммуноглобулинов, адгезионные молекулы, лектиноподобные рецепторы типа С (кальций-зависимые), иммуноглобулин-подобные рецепторы (KIR-killer-cell immunoglobulin-like receptor) и рецепторы для цитокинов. Циркулирующие зрелые НК-клетки имеют фенотип CD3⁻CD56⁺CD16⁺CD2^{dim} и отличаются от Т-клеток отсутствием Т-клеточного рецептора и CD3 [27]. В свою очередь, отличие от В-клеток заключается в том, что НК-клетки никогда не экспрессируют мембранные иммуноглобулины (Ig), однако за счет экспрессии FcγRIII они могут быть позитивными при окрашивании антителами.

Фенотип НК-клеток состоит из таких антигенных детерминант, как CD56⁺(N-CAM), CD16⁺(FcγRIIIA), CD122⁺ (β-цепь рецептора ИЛ-2), CD161⁺ (NKR-P1). Перечень других маркеров, экспрессируемых на своей поверхности НК-клетками, достаточно широк. Это — CD2, CD5, CD7, CD8, CD94, CD96, CD158, CD159, α-цепь рецептора ИЛ-15, семейство молекул NKG2 и многие другие. Поверхностные маркеры, экспрессируемые активированными НК-клетками, включают целый ряд молекул, таких как CD25, β1 (CD29) и β2 (CD18) интегрин, различные активационные антигены, включая HLA-DR, рецептор трансферина CD71 и CD69. В зависимости от степени активации НК-клеток поверхностные рецепторы могут изменять свою экспрессию за счет повышения или понижения [27].

Одним из основных маркеров, используемых для выявления НК-клеток, является молекула CD16. Антиген CD16 представляет собой низко-аффинный рецептор для IgG (FcγRIII). Другим антигеном является молекула CD56. Данный антиген умеренно экспрессируется на субпопуляциях клеток периферической крови, таких как большие гранулярные лимфоциты, и всех клетках с НК активностью. У человека были идентифицированы 2 субпопуляции НК-клеток. Большинство CD56^{dim} НК-клеток экспрессируют высокий уровень FcγRIII (CD16) и перфорина, в то время как CD56^{bright} НК-клетки являются CD16^{-/low} и перфорин негативными. CD56^{dim} НК-клетки обладают непосредственной цитотоксической активностью, в то время как CD56^{bright} НК-клетки приобретают ее только после добавления ИЛ-2. CD56^{bright} субпопуляция составляет приблизительно 10–20% от

общего количества НК-клеток, они преимущественно локализованы в лимфатических узлах и экспрессируют L-селектин и рецепторы хемокинов CCR5 и CCR7. CD56^{dim} НК-клетки, наоборот, практически отсутствуют в лимфатических узлах, но составляют 95% НК-клеток крови и 85% НК-клеток селезенки. Они экспрессируют рецепторы для хемокинов CCR4, CXCR1 и CX3CR1 [26].

НК-клетки обладают двумя основными функциями. Первая — это лизис опухолевых и инфицированных вирусами клеток. Вторая — регуляция врожденного и адаптивного иммунных ответов за счет секреции цитокинов (IFN-γ, TNF-α и ИЛ-10), ростовых факторов (GM-CSF, G-CSF и ИЛ-3) и хемокинов (CCL3, CCL4, CCL5, XCL1 и CXCL8) [26].

Активация НК-клеток регулируется динамическим балансом сигналов, получаемых от активирующих и ингибирующих рецепторов при взаимодействии с потенциальной клеткой-мишенью [25]. НК-клетки способны определять различную плотность поверхностных молекул, экспрессируемых на клетке-мишени. Одновременное взаимодействие множества лигандов с рецепторами НК-клеток приводит к интеграции различных внутриклеточных сигналов, совокупность которых и диктует качество и интенсивность эффекторного ответа НК-клетки. Снижение или отсутствие ингибирующих сигналов приводит к преобладанию сигналов активации, что, в конечном итоге, ведет к лизису клетки-мишени и выбросу цитокинов. С другой стороны, высокая экспрессия лигандов активации на клетках-мишенях может привести к запуску цитолитической активности НК-клеток и продукции цитокинов, несмотря на нормальную экспрессию молекул МНС класса I на клетке-мишени.

Большинство ингибирующих рецепторов на НК-клетках человека относятся к семействам иммуноглобулиноподобных рецепторов киллерных клеток — KIR и лейкоцитов — LILR (leukocyte Ig-like receptor), а также представлены лейкоцит-ассоциированным иммуноглобулин-подобным рецептором LAIR-1 (leukocyte-associated Ig-like receptor-1) и гетеродимером CD94/NKG2A, который принадлежит к семейству лектинов С-типа [24]. Все ингибирующие рецепторы распознают молекулы антигенов главного комплекса гистосовместимости первого класса.

Активирующие рецепторы НК-клеток включают молекулу CD16, а также лектиноподобный рецептор NKG2D, гетеродимер CD94/NKG2C, рецепторы естественной цитотоксичности NCR (natural cytotoxicity receptors) — NKp46, NKp30, NKp44, NKp80, молекулу адгезии DNAM1 и 2B4 (CD244) [24]. Некоторые рецепторы ЕК-клеток также были обнаружены на αβТ-клетках и γδТ-клетках.

В основе цитотоксической активности НК-клеток лежат литические механизмы и перфорация мембраны клетки-мишени. Механизм цитотоксичности лимфоцитов связан с активирующими мембранными рецепторами, которые индуцируют секреторный процесс

в НК-клетках, где локализуются цитоплазматические везикулы, которые содержат ферменты сериновые эстеразы (гранзим А и В). Они высвобождаются локальным экзоцитозом в пространство между эффекторной клеткой и ее мишенью.

Специализированный механизм киллинга у НК-клеток, также как и у цитотоксических Т-лимфоцитов связан с содержимым гранул, которые обладают литической активностью. Они способны делать трансмембранные поры в клетке-мишени за счет перфорина [12]. Сразу после связывания цитотоксического лимфоцита с клеткой-мишенью в мембране клетки-мишени образуются поры, происходит экзоцитоз гранул НК-клеток и выход их содержимого — гранзимов. Далее в клетке-мишени запускается каскад литических процессов, что приводит к деградации ДНК и последующей клеточной смерти [21].

В периферической крови НК-клетки составляют от 5 до 20% циркулирующих лимфоцитов. Существует взаимосвязь между изменением активности НК-клеток и их количеством с клиническими признаками заболеваний у людей. Так, относительное количество НК-клеток и их активность существенно изменяются не только при опухолевых процессах и вирусной инфекции, но и при гнойном воспалении, нарушении функций центральной нервной системы, аутоиммунных заболеваниях и др. [27]. Вероятно, что в результате применения более тонких и точных методов исследований, таких как проточная цитометрия и многопараметрический анализ, будут выявлены и другие изменения в субпопуляциях этих клеток при иных патологиях.

До недавнего времени специфичность НК-клеток к мишеням определялась в функциональном тесте *in vitro* по высвобождению радиоизотопа Cr^{51} из меченых клеток-мишеней. В настоящее время с применением современных методов проточной цитометрии использование радиоактивных изотопов утрачивает свою популярность. Цитофлуориметрический анализ дает результаты цитотоксической активности НК-клеток, сравнимые с тестами по высвобождению радиоактивного Cr^{51} с высокой корреляцией ($r = 0,85$), также метод зарекомендовал себя как быстрый и более простой [13].

Проточная цитометрия является мощным инструментом системного мультипараметрического анализа клеточных популяций и продуктивно используется в клеточной биологии, иммунологии и медицинской диагностике. Цитофлуориметры позволяют исследовать тысячи клеток в секунду и дают достоверную информацию о морфологии клеток, их поверхностных антигенах, активности внутриклеточных ферментов, содержании ДНК и т. д. Большой выбор предлагаемых моноклональных антител, меченных различными флуорохромами, позволяет подобрать такое их сочетание, чтобы в одном исследовании получить максимальную информацию сразу о нескольких поверхностных антигенах, что дает возможность в одной пробе определить субпопуляцион-

ный состав исследуемого образца и судить о наличии или отсутствии различных патологий.

В настоящее время для локализации и характеристики НК-клеток наиболее широко используют двухпараметрический анализ экспрессии CD16 и/или CD56 на CD3-негативных клетках (рис. 1). Данная комбинация моноклональных антител позволяет локализовать общую популяцию НК-клеток и количественно ее охарактеризовать, однако двухпараметрический анализ не охватывает субпопуляции естественных киллеров или их подтипы.

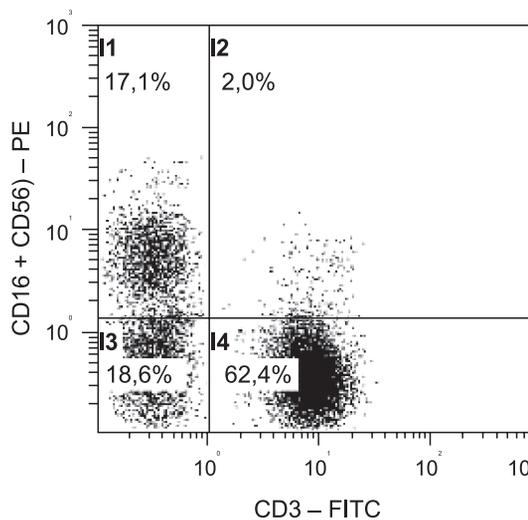


Рис. 1. Гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител против CD3 меченых FITC и CD16+CD56 меченых PE.

На данной гистограмме отображены только CD45 позитивные лимфоциты.

Квадранты: I1 — НК-клетки; I2 — НКТ-клетки; I3 — негативные по CD3 и CD16+CD56 лимфоциты; I4 — CD3+ Т-клетки

Достаточно часто НК-клетки экспрессируют на своей поверхности α -цепь CD8 (рис. 2), но в более низкой

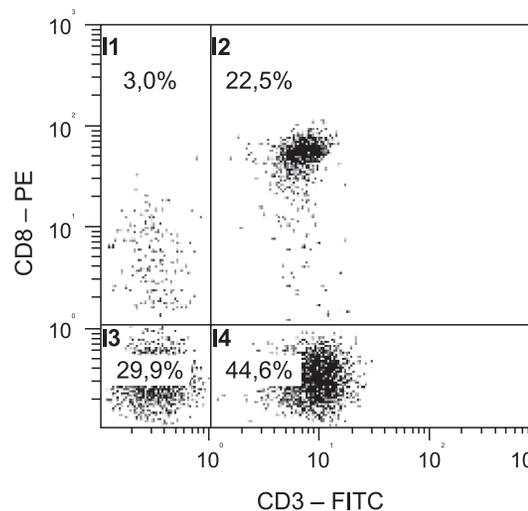


Рис. 2. Гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител против CD3 и CD8, меченных FITC и PE. На данной гистограмме отображены только CD45 позитивные лимфоциты. В зоне I1 находятся CD8+ НК-клетки

плотности, чем цитотоксические Т-клетки. Было показано, что субпопуляции НК-клеток человека, экспрессирующие $\alpha\alpha$ гомодимер CD8, обладают большей цитотоксичностью, чем CD8⁻ НК-клетки.

В последние годы исследователи уделяют большое внимание экспрессии CD38 на поверхности НК-клеток. Молекула CD38 — это мембранный гликопротеин, представляющий собой фермент, регулирующий концентрацию цитоплазматического кальция, также обладает АДФ-циклазой и НАД-гидролазной активностью. Данная молекула также играет роль рецептора, модулируя межклеточные взаимодействия, и является переносчиком трансмембранных сигналов. Молекула CD38 экспрессируется на активированных Т-, В-, НК-клетках и некоторых других типах клеток. В ряде работ приведены данные о том, что обработка CD38⁺ НК-клеток антителами против CD38 приводит к активации их литической способности. Однако это происходило только в тех случаях, когда было возможно взаимодействие CD38 со специализированными сигнальными молекулами. В случае НК-клеток роль такой молекулы играет CD16.

Таким образом, для наиболее полной характеристики НК-клеток необходимо определить на CD3-негативных клетках следующие поверхностные маркеры: CD16, CD56, CD38 и CD8. Следует отметить, что CD38 и CD8 позволяют оценить цитотоксическую активность НК-клеток пациента и, как следствие этого, более корректно представлять картину, происходящую на данном этапе развития иммунного ответа. Для этих целей рекомендуют использовать следующие комбинации антител: CD3/CD16/CD56/CD45 и CD3/CD8/CD38/CD45 [4].

Как было сказано, применение двухцветного окрашивания лимфоцитов с использованием комбинации антител CD3, CD56⁺CD16 позволяет локализовать

НК-клетки и оценить их абсолютное и относительное количество (рис. 1). Однако в этом случае отсутствует возможность определить подтипы НК-клеток.

Другим вариантом окрашивания лимфоцитов для выявления НК-клеток является использование комбинации антител CD16 и CD56. На рисунке 3А представлена двухпараметрическая гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител против CD16 и CD56, меченных FITC и PE. Но в этом случае результат получается несколько завышенным, поскольку дополнительный вклад вносят Т-клетки, так как они могут экспрессировать на своей поверхности молекулы CD56 и CD16. Это особенно ярко проявляется при наличии различных патологий, когда резко возрастает количество Т-клеток, экспрессирующих данные структуры. Данную задачу позволяет решить применение многоцветного анализа и следующей комбинации моноклональных антител CD3/CD16/CD56/CD45. В данном анализе антитела к CD3 позволяют исключить из анализа Т-клетки (рис. 3Б).

Для локализации CD38⁺CD8⁺ НК-клеток возможно использовать двухпараметрический анализ (рис. 4), но более корректно применять трех- и четырехцветный анализ (CD3/CD8/CD38 и CD3/CD8/CD38/CD45) [4].

Ранее сообщалось, что CD38⁺CD8⁺ НК-клетки обладают высокой цитолитической активностью. Таким образом, знание о наличии данной субпопуляции, ее относительном и абсолютном количестве имеет важное диагностическое значение. В случае использования комбинации CD3/CD8/CD38 для выделения лимфоцитов используют морфологические параметры, но в результате этого существует вероятность исключить из анализа часть больших гранулярных лимфоцитов, которые

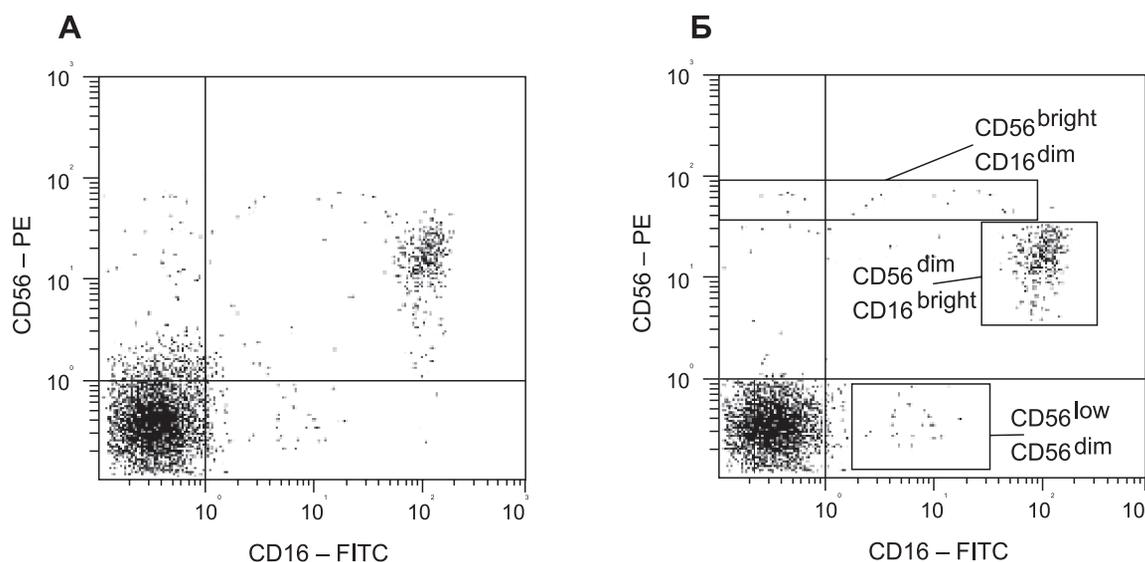


Рис. 3. Гистограммы распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител против CD16 и CD56, меченных FITC и PE.

На гистограмме А отображены все CD45⁺ позитивные лимфоциты.

На гистограмме Б отображены только CD45⁺CD3⁻ лимфоциты

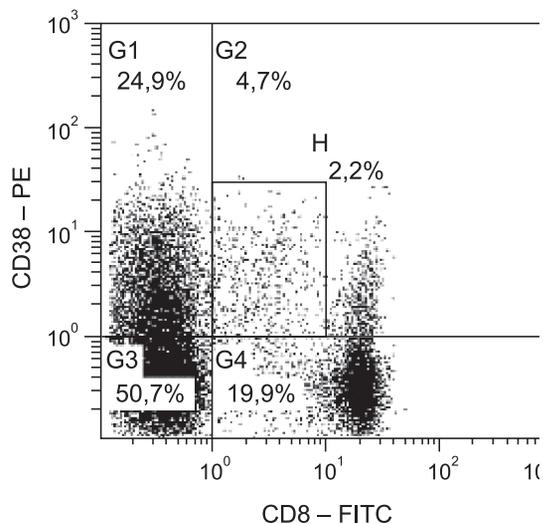


Рис. 4. Гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител против CD8 и CD38, меченных FITC и PE. На данной гистограмме отображены только CD45 позитивные лимфоциты. Область H содержит CD8⁺CD38⁺ NK-клетки

могут не попасть в выделенную зону при гейтировании. Использование антител к CD45 для локализации всей популяции лимфоцитов является более корректным.

Комбинация моноклональных антител CD3/CD8/CD38/CD45 и многоэтапное позитивное и негативное гейтирование позволяет четко выделить активированные NK-клетки. На рисунке 5А представлена двухпараметрическая гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител против CD3.

Дальнейший анализ проводят на отдельных гистограммах с использованием логических ограничений в зонах, позитивных и негативных по CD3. На гистограмме, полученной с использованием гейтирования по CD3⁺, в зоне второго квадранта находятся активированные цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD8^{bright}CD38⁺ (рис. 5В). Гейтирование по зоне CD3⁻ негативных клеток позволяет выявить активированные NK-клетки с фенотипом CD8^{dim}CD38⁺ (рис. 5Б). Данное утверждение правомерно, поскольку CD8 экспрессируется не только на Т-клетках, но и на части популяции CD3⁻ негативных клеток, а именно на NK-клетках.

Таким образом, используя данную комбинацию антител, возможно в одном образце определить активированные цитотоксические Т-клетки и активированные NK-клетки.

В связи с получением большого количества фактического материала и развитием различных направлений современной иммунологии стано-

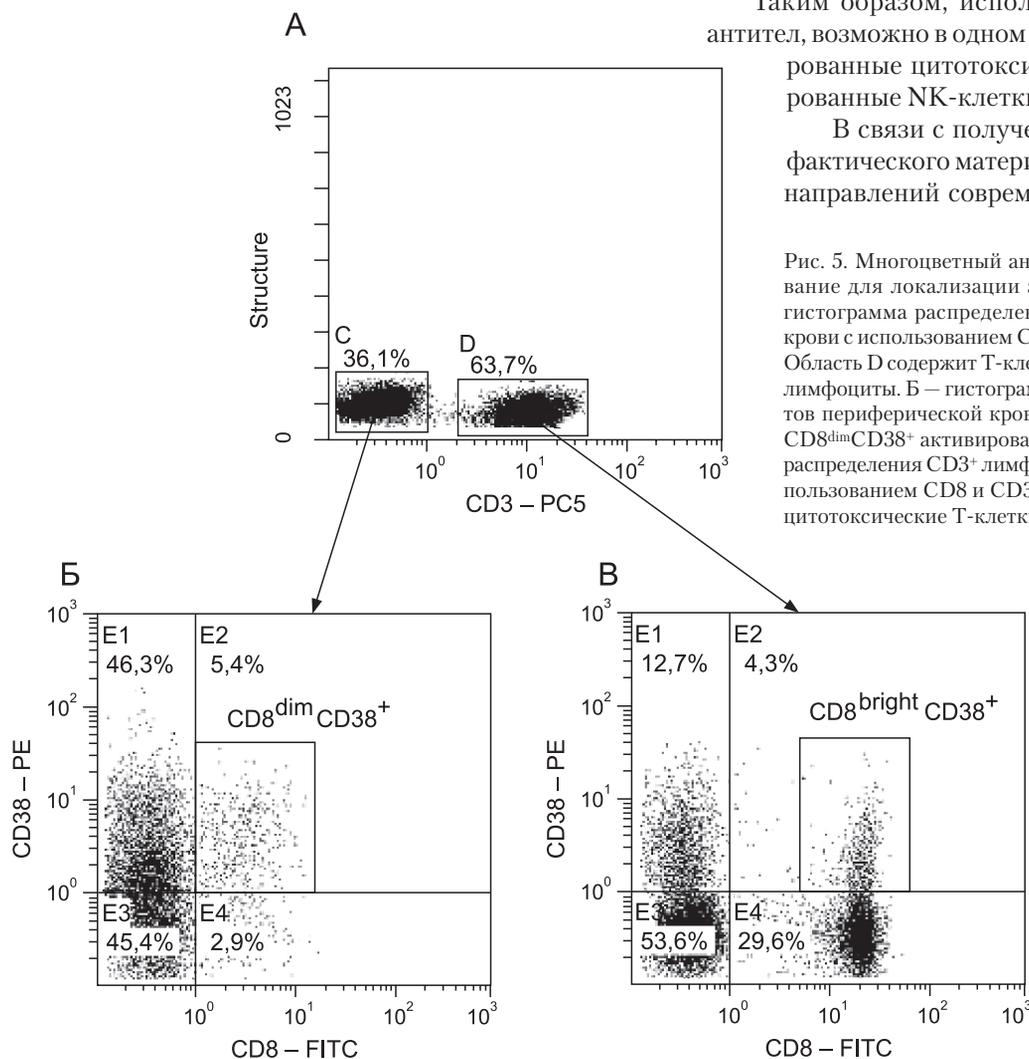


Рис. 5. Многоцветный анализ и последовательное гейтирование для локализации активированных NK-клеток. А — гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием CD3 и светорассеяния под углом 90°. Область D содержит Т-клетки, а область С — CD3 негативные лимфоциты. Б — гистограмма распределения CD3⁻ лимфоцитов периферической крови с использованием CD8 и CD38. CD8^{dim}CD38⁺ активированные NK-клетки. В — гистограмма распределения CD3⁺ лимфоцитов периферической крови с использованием CD8 и CD38. CD8^{bright}CD38⁺ активированные цитотоксические Т-клетки

вится очевидной необходимость при типировании НК-клеток выявлять как общее количество, так и содержание отдельных их субпопуляций, а также определять их функциональную активность.

В последнее время были определены новые методологические подходы для определения функциональной активности НК-клеток, включая методы двойной люминесценции живых и мертвых клеток [17] или анализ литических гранул мембранного протеина CD107a с помощью проточного цитометра [20].

Zimmermann et al. классифицировал цитотоксические тесты, описанные в литературе, на следующие категории: 1. Выявление умерших клеток-мишеней по высвобождению субстрата или с помощью визуализации клеток. 2. Обнаружение выживших клеток-мишеней, поглотивших/удержавших вещества, или с помощью визуализации клеток. 3. Определение эффекторной активности клеток по высвобождению веществ или с помощью визуализации клеток [28].

Клеточно-опосредованная цитотоксичность с использованием флуоресцентных красителей диоктадецилоксакробоцианин перхлората (DiO₁₈) и пропидиум йодида (PI)

Данный метод был описан в начале 90-х годов [9, 11]. Он основан на встраивании зеленого липофильного флуоресцентного красителя DiO₁₈ (Molecular Probes, США) в мембрану клеток-мишеней, растущих в культуре. Этот краситель позволяет быстро выделять субпопуляцию клеток-мишеней от клеточной суспензии клеток-эффекторов с помощью проточного цитофлуориметра. Второй красный краситель — пропидиум йодид (PI, Sigma) проникает внутрь клетки только через поврежденные мембраны и связывается с ядерной ДНК, таким образом указывая на мертвые клетки [22]. Анализ двойной флуоресценции позволяет определить процент клеток-мишеней, поврежденных НК-клетками, и вычислить их цитотоксическую активность.

Приготовление клеток-мишеней. Для постановки цитотоксического теста использовали стандартные для естественных киллеров клетки-мишени эритролейкемической линии K562, растущие в культуре 3 дня с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) до исследования и пересаженные в полную питательную среду (ППС) без сыворотки за 24 ч до эксперимента. Клетки K562 были отмыты в фосфатном буферном растворе (PBS) и ресуспендированы в концентрации 10⁶ клеток в 1 мл PBS. Перед использованием клетки метили, добавляя 10 мкл 30 mM DiO растворенного в ДМСО на 1 мл суспензии. Затем клетки-мишени инкубировали при 37° С в 5% CO₂ в течение 20 мин и дважды отмывали в PBS. После этого ресуспендировали в конечной концентрации 10⁶ клеток в 1 мл среды RPMI-1640 без фенолового красного или в PBS.

Приготовление клеток-эффекторов. В качестве эффекторов использовали мононуклеарные клетки (МНК)

из периферической крови человека, выделенные по стандартной методике на градиенте плотности из гепаринизированной крови. Клетки-эффекторы дважды отмывали в PBS и ресуспендированы в конечной концентрации 3,85 × 10⁶ клеток в 1 мл культуральной среды RPMI-1640 без фенолового красного или в PBS.

Постановка цитотоксического теста. Клетки-мишени (10 мкл) в стандартной концентрации и 130 мл клеток-эффекторов (МНК) в разведении 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8 были добавлены в пробирки (12 на 75 мм) для достижения различных соотношений эффектор/мишень от 50:1 до 6,25:1. В каждую пробирку добавляли по 130 мкл PI, предварительно разведенного 10 мг на 100 мл, и центрифугировали 30 сек 1000 g, чтобы сформировать плотный контакт клеток в присутствии PI. Клеточные смеси инкубировали в течение 2 ч при 37° С в 5% CO₂. Контрольные пробирки содержали только клетки-мишени, меченные PI, и только клетки-эффекторы, меченные PI. Это позволяло определить спонтанный лизис клеток-мишеней или нежизнеспособные эффекторы, соответственно. После совместной инкубации клетки были ресуспендированы и анализированы на проточном цитофлуориметре FACScan (BD). Данные собраны с использованием программы Consort30 и обработаны с помощью программы Lysis (BD) [13].

На рисунке 6 представлены результаты фенотипирования клеточной смеси клеток-эффекторов и клеток-мишеней (в соотношении 50:1) как dot plot FL1 (флуоресценция FITC) против FL2 (флуоресценция PI) для идентификации клеток, меченных DiO (живые), и PI (мертвые).

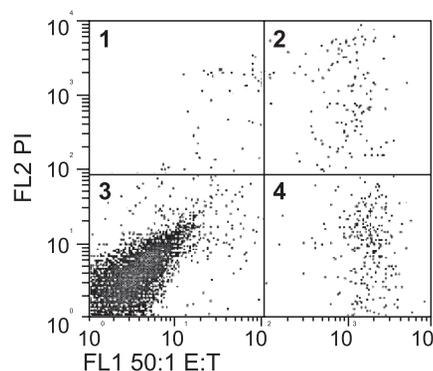


Рис. 6. Двухпараметрический dot plot (FL1 [флуоресценция FITC] и FL2 [флуоресценция PI]) флуоресценции клеток-эффекторов (МНК) и клеток-мишеней, меченных DiO.

Квадрант 1 — мертвые клетки-эффекторы, квадрант 2 — мертвые клетки-мишени, квадрант 3 — живые клетки-эффекторы и живые клетки-мишени, квадрант 4 — живые клетки-мишени

Процент лизиса определяли по формуле:

Лизис (%) = [кол-во событий в квадранте 2 / (сумма событий в квадрантах 2 и 4)] × 100.

Спонтанный лизис вычитали из реального лизиса для каждой пробы, состоящей из смеси клеток-мишеней и эффекторов в различных концентрациях. Каждый образец анализировали в дублях.

Клеточно-опосредованная цитотоксичность с использованием флуоресцентных красителей кальция AM (САМ) и этидиума гомодимера-1 (Eth-1)

Для постановки цитотоксического теста были использованы стандартные для естественных киллеров клетки-мишени эритролейкемической линии K562 и клетки В-лимфомы Raji. В качестве эффекторов использовали мононуклеары периферической крови человека без прилипающих клеток и В-лимфоцитов, выделенные по стандартной методике на градиенте плотности [1].

Цитолитическую активность НК-клеток оценивали цитофлуориметрически, используя специальный кит для цитотоксических тестов, содержащий два вида красителей для живых и мертвых клеток-мишеней (L-3224) “Live/Dead” (Molecular Probes, США) (рис. 7). Кальций AM (САМ) окрашивает живые клетки, этидий гомодимер-1 (Eth-1), проникая в ядро, окрашивает мертвые клетки [19]. Литическую активность НК-клеток против клеток-мишеней оценивали в различных соотношениях.

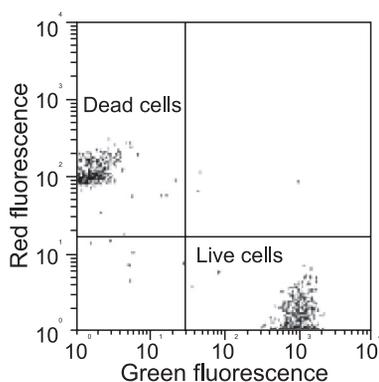


Рис. 7. Цитофлуориметрический анализ (488 нм) живых и мертвых клеток с использованием кита “Live/Dead”. Смесь живых и фиксированных спиртом В-клеток (1:1), окрашенных кальцием-AM и Eth-1. Двухпараметрическая гистограмма показывает четкое разделение живых клеток с зеленой флуоресценцией (530 нм) от мертвых клеток с красной флуоресценцией (585 нм)

Реакцию цитотоксичности проводили в полной питательной среде с 2% ЭТС в конечном объеме 400 мкл при 37° С в атмосфере с 5% CO₂, инкубируя клетки-мишени и клетки-эффекторы в определенных соотношениях в течение 2 часов. В опытные лунки вносили такие количества клеток, чтобы достигались соотношения эффектор : мишень 40:1, 20:1 и 10:1, из расчета на 70 тыс. мишеней [3]. Для оценки жизнеспособности клетки-мишени предварительно окрашивали САМ. Для этого в клеточную суспензию (10⁶ кл/мл) вносили САМ в конечной концентрации 40 нМ и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин с последующей отмывкой в PBS. После проведения цитотоксического теста в течение 2 часов клетки (эффекторы и мишени) обрабатывали красителем Eth-1 для выявления мертвых клеток. Eth-1 вносили в клеточную суспензию в конечной концентрации 100 нМ и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. В дальнейшем экспериментальные образцы подвергали цитофлуориметрическому анализу. Живые мишени флуоресцировали в зеленой области спектра, мертвые эффекторы — в красной области, а мертвые клетки-мишени светились одновременно в зеленой и красной областях спектра. Последние были дискриминированы в отдельном квадрате с заданными границами.

Оценка апоптоза клеток-мишеней, индуцированная НК-клетками через запуск внутриклеточных каспаз

Для цитофлуориметрической оценки цитолитической функции НК-клеток по активации каспазы-6 в клетках-мишенях использовали набор “CyToxiLux” (OncoImmunin, США) [18] (рис. 8).

Клетки-мишени линии K562 (2 × 10⁶ кл/мл) были предварительно окрашены красителем TFL2 в течение 30 мин, однократно отмывты в буфере и ресуспендированы до конечной концентрации 1 × 10⁶ кл/мл. После этого клетки-мишени инкубировали с очищенной магнит-

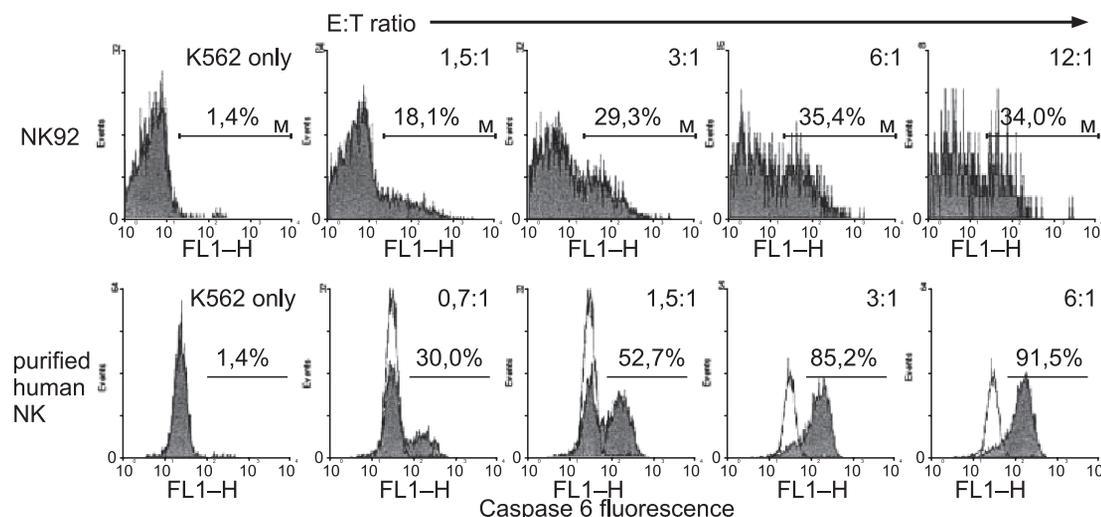


Рис. 8. Анализ активации каспазы-6 у клеток-мишеней K562 после инкубации с клетками линии NK-92 (вверху) и очищенной популяцией NK-клеток (внизу). На гистограммах слева контрольные клетки-мишени, правее увеличение соотношения эффектор: мишень от 0,7:1 к 6:1. На каждой гистограмме показано соотношение эффекторов и мишеней и процент лизированных клеток-мишеней

ной сепарацией популяцией NK-клеток или с клетками NK92 в различных соотношениях в течение 60 мин при 37° С в атмосфере с 5% CO₂. Затем клеточную смесь смешивали с раствором флуоресцентномеченого субстрата для каспазы-6 на 45 мин при 37° С с последующей отмывкой [2, 15]. Анализ активности каспазы-6 проводили с помощью проточного цитометра при длине волны 488 нм, при этом оценивали долю клеток-мишеней с активированной каспазой-6 среди TFL-2-позитивных клеток. Флуоресценция субстрата для каспазы-6 была измерена через канал FL1 (фильтр 530/30 нм), а окрашенные TFL2 клетки-мишени через канал FL2 (фильтр 575/26 нм).

Оценка функциональной активности NK-клеток по выявлению маркеров дегрануляции (CD107)

В NK-клетках здоровых доноров молекула CD107а колокализирована с перфорином, поэтому по ее обнаружению на клеточной поверхности можно судить о процессе лизиса клеток-мишеней [5, 6]. Экспрессия молекул CD107а соотносится с внутриклеточным содержанием перфорина и гранзимов, в то время как экспрессия молекулы CD63 не свидетельствует об этом [6]. Оценить дегрануляцию NK-клеток можно путем постановки двухчасового цитотоксического теста с использованием стандартных клеток-мишеней и МНК [6, 10]. Отклонения в экспрессии CD107 могут наблюдаться при различной патологии [16].

В качестве эффекторов использовали МНК из периферической крови человека, выделенные по стандартной методике на градиенте плотности из гепаринизированной крови. Клетки-эффекторы были дважды отмывты 400g 10 мин в PBS и ресуспендированы в конечной концентрации 5 × 10⁶ клеток в 1 мл культуральной среды RPMI-1640 без фенолового красителя или в PBS.

МНК ресуспендировали в ППС в концентрации 2 × 10⁶ клеток в 1 мл. Если используется очищенная популяция NK-клеток, то в концентрации 1 × 10⁶ клеток в 1 мл. Клетки-мишени ресуспендировали в ППС в концентрации 2 × 10⁶ клеток в 1 мл и добавляли стимулирующе-

щие моноклональные антитела в концентрации 5 мкг/мл для постановки антителозависимой клеточной цитотоксичности. Клетки-мишени 100 мкл и эффекторы 100 мкл смешивали в 96-луночном V-образном планшете, центрифугировали 30 g 3 мин. Клеточную суспензию инкубировали 2 часа при 37° С. После центрифугирования 450 g 3 мин отбирали супернатант и добавляли в подготовленные лунки 50 мкл смеси флуорохром-конъюгированных антител CD3-PerCP, CD56-PE и CD107a-FITC в разведении 1:50. Образцы инкубировали в темноте при 4° С в течение 30 мин. Вновь центрифугировали 450 g 3 мин, отбирали супернатант и добавляли в лунки по 200 мкл фиксирующего раствора, вновь ресуспендировали клетки и переносили в пробирки для цитофлуориметрического анализа (рис. 9).

Проточная цитофлуориметрия

Анализ флуоресценции клеток (не менее 5000 событий в секторе живых клеток-мишеней в экспериментах по цитотоксичности и не менее 10000 событий в экспериментах по анализу экспрессии поверхностных маркеров) проводили на лазерном проточном цитофлуориметре EPICS “ELITE” (Coulter Electronics Inc., Великобритания) или FACScan (Becton Dickinson, США). Интенсивность флуоресценции клеток наблюдали при длине волны возбуждения 488 нм и регистрации 525 нм для FITC и 580 нм для PE. Для исключения из зоны анализа частиц, не соответствующих по размерам и гранулярности живым клеткам, вводили логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому и 90-градусному светорассеянию. Ре-

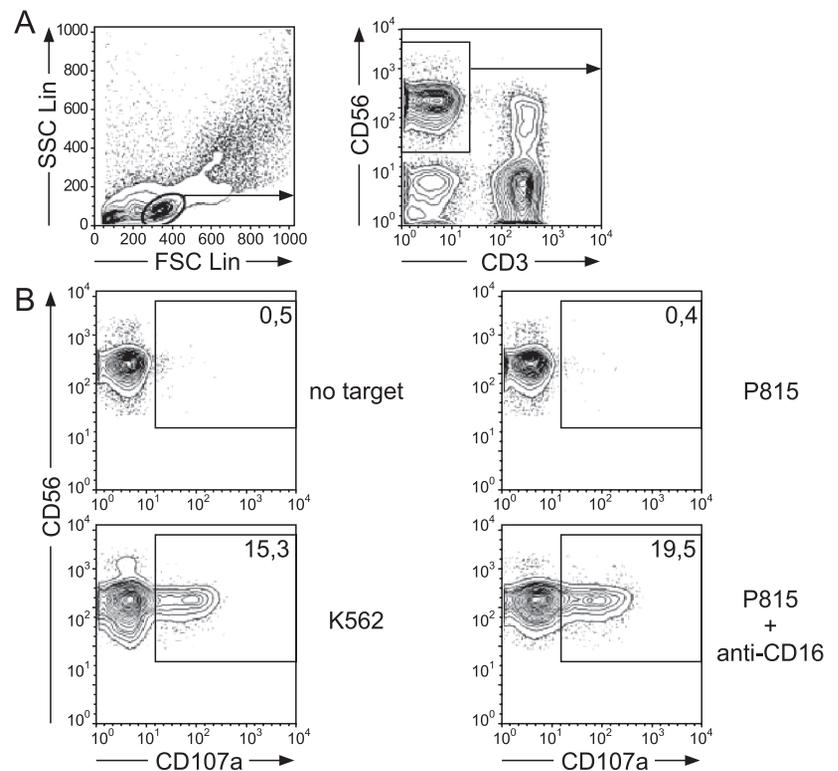


Рис. 9. Цитофлуориметрический анализ дегрануляции NK-клеток человека. МНК были инкубированы с клетками-мишенями 2 часа при 37° С, после чего окрашены антителами анти-CD3-PerCP, анти-CD56-PE и анти-CD107a-FITC.

А — Для идентификации CD3⁻ CD56⁺ NK-клеток показано боковое светорассеяние (SSC) против прямого (FCS) и CD56 против CD3 с использованием программы FlowJo. В — Экспрессия молекул CD56 против CD107а на CD3⁻ CD56⁺ NK-клетках донора после инкубации МНК с клетками-мишенями K562 и P815

зультаты подвергали математической обработке с использованием программы MultiGraph и IMMUNO 4 (Coulter Electronics Inc., Великобритания) или с помощью программы "CellQuest" (Becton Dickinson, США).

Заключение

Результаты исследований последних лет показали, во-первых, ведущее значение НК-клеток и их цитотоксической функции при опухолевых и вирусных процессах. Во-вторых, наличие регуляторной функции у отдельных субпопуляций НК-клеток ставит вопрос об их клиническом и патогенетическом значении. В-третьих, данные о наличии активирующих рецепторов НК-клеток позволяют по-новому оценить их функциональную активность, не ставя трудоемких и дорогостоящих экспериментов по киллингу клеток-мишеней. В-четвертых,

появилась возможность оценить степень воздействия лекарственной терапии на НК-клетки как в норме, так и при патологии. Это позволяет значительно расширить возможности клинической фармакологии по поиску средств, напрямую влияющих на данную группу клеток (химиотерапия опухолей, антивирусная терапия и др.). И, в-пятых, изучение субпопуляций НК-клеток и их функциональной активности может повлиять на наши представления о природе патологических процессов. Это весьма важно как для известных патологий, где значение НК-клеток уже определено, так и для других процессов, при которых значимость врожденных и приобретенных механизмов иммунитета недостаточно изучена. Как следствие этого, новые данные могут способствовать более корректной иммунотерапии различных патологических состояний с учетом ее влияния на данные клетки.

Литература

1. Абакушина Е.В. Влияние углеводов, представленных на поверхности клеток-мишеней, на цитолитическую активность естественных киллеров человека: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.36 / Елена Вячеславовна Абакушина. — М., 2002. — 124 с.
2. Коваленко Е.И., Стрельникова Ю.И., Коневский Л.М., Абакушина Е.В. Влияние стресс-индуцируемой молекулы МІСА на активность НК-клеток человека // Омский научный вестник. — 2007. — № 3 (61). — С. 29–31.
3. Саидов М.З., Ковальчук Л.В. Использование принципа серийных клеточных разведений для диагностики нарушения активности естественных киллеров человека // Иммунология. — 1986. — № 4. — С. 76–78.
4. Хайдуков С.В. Многоцветный анализ в проточной цитометрии для медико-биологических исследований: автореферат дис. ... докт. биол. наук : 14.00.46, 14.00.36 / Сергей Валерьевич Хайдуков. — СПб., 2008. — 52 с.
5. Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity // J. Immunol. Methods. — 2004. — 294. — P. 15–22.
6. Bryceson Y.T., March M.E., Barber D.F. et al. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells // J. Exp. Med. — 2005. — 202. — P. 1001–1012.
7. Bryceson Y.T., Rudd E., Zheng C. et al. Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients // Blood. — 2007. — 110. — P. 1906–1915.
8. Bryceson Y.T., Fauriat C., Nunes J.M. et al. Functional analysis of human NK cells by flow cytometry // Methods Mol. Biol. — 2010. — 612. — P. 335–352.
9. Chang L., Gusewitch G.A., Chritton D.B.W et al. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity // J. Immunol. Methods. — 1993. — 166. — P. 45–54.
10. Gonzalez V.D., Björkström N.K., MalMBERG K.J. et al. Application of nine-color flow cytometry for detailed studies of the phenotypic complexity and functional heterogeneity of human lymphocyte subsets // J. Immunol. Methods. — 2008. — 330. — P. 64–74.
11. Hatam L., Schuval S. and Bonagura V. R. Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay // Cytometry. — 1994. — 16. — 59–68.
12. Henkart P.A. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity // Ann. Rev. Immunol. — 1985. — 3. — 31–58.
13. Kane K.L., Ashton F.A., Schmitz J.L., Folds J.D. Determination of natural killer cell function by flow cytometry // Clin. Diagnost. Lab. Imm. — 1996. — Vol. 3, N3. — 295–300.
14. Klöß S., Bochennek K., Huenecke S. et al. A novel five-colour flow cytometric assay to determine NK cell cytotoxicity against neuroblastoma and other adherent tumour cells // J. Imm. Methods. — 2007. — 325. — P. 140–147.
15. Kovalenko E.I., Abakushina E.V., Telford W. et al. Clustered carbohydrates as a target for natural killer cells: A model system // Histochem. Cell Biol. — 2007. — Vol. 127, N3. — P. 313–326.
16. Marcenaro S., Gallo F., Martini S. et al. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease // Blood. — 2006. — 108. — P. 2316–2323.
17. Ogbomo H., Hahn A., Geiler J. et al. NK sensitivity of neuroblastoma cells determined by a highly sensitive coupled luminescent method // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2006. — 6. — 339 (1). — P. 375.
18. Packard B.Z., Telford W.G., Komoriya A., Henkart P.A. Granzyme B activity in target cells detects attack by cytotoxic lymphocytes // J. Immunol. — 2007. — 179. — P. 3812–3820.
19. Paradopoulos N.G., Dedoussis G.V.Z., Spanakos G. et al. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry // J. Immunol. Methods. — 1994. — 177. — P. 101–111.
20. Penack O., Gentilini C., Fischer L. et al. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets // Leukemia. — 2005. — 19 (5). — P. 835.
21. Podack E.R. The molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis // Immunol. Today. — 1985. — 6. — P. 21–27.
22. Riley R.S., Mahin E.J., Ross W. Clinical applications of flow cytometry. — N.Y.: Igaku-Shoin, 1993. — P. 198–200.
23. Trincheri G. Biology of natural killer cells // Adv. Immunol. — 1989. — 47. — P. 187–376.
24. Vivier E., Tomasello E., Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? // Curr. Opin. Immunol. — 2002. — 14. — P. 306–311.
25. Vivier E., Nunes J.A., Vely F. Natural killer cell signaling pathways // Science. — 2004. — 306. — P. 1517–1519.
26. Walzer T., Dalod M., Robbins S.H. et al. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force" // Blood. — 2005. Oct 1. — 106 (7). — P. 2252–2258.
27. Whiteside T.L., Herberman R.B. Role of human natural killer cells in health and disease // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 1994, Mar. — 1 (2). — P. 125–133.
28. Zimmermann S.Y., Esser R., Rohrbach E. et al. A novel four-colour flowcytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemia cells in peripheral or bone marrow specimens containing greater than 20% of normal cells // J. Immunol. Methods. — 2005. — 296 (1–2). — P. 63.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОЙ И ОСТРОЙ РЕНАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

В.В. ВЕЛЬКОВ, О.И. РЕЗНИКОВА

ЗАО «ДИАКОН», г. Пушкино, Московская область, Россия

Резюме. Весьма актуальной задачей лабораторной диагностики в области нефрологии является ранняя дифференциальная диагностика заболеваний почек. При этом важная роль в определении выраженности гломерулярной и тубулярной дисфункции принадлежит цистатину С, уровень которого в крови коррелирует с выраженностью ренальной патологии. Как маркер скорости клубочковой фильтрации сывороточный цистатин С значительно превосходит сывороточный креатинин и клиренс креатинина, так как способен диагностировать самые ранние изменения, в том числе гиперфильтрацию и ранние стадии гипофильтрации, отслеживать быстрые изменения скорости клубочковой фильтрации при острой почечной недостаточности, точно оценивать ренальные функции у педиатрических пациентов и гериатрических пациентов, прогнозировать сердечно-сосудистые и другие осложнения функции почек.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, гломерулярная и тубулярная ренальная дисфункция, маркеры, цистатин С, NGAL.

NEW POSSIBILITIES FOR LABORATORY DIAGNOSIS OF CHRONIC AND ACUTE RENAL DYSFUNCTION

V.V. VELKOV, O.I. REZNIKOVA

“DIAKON”, Pushino, Moscow region, Russia

Summary. Early differential diagnosis of renal diseases is very important problem of modern laboratory diagnosis. The role of cystatin C in determination of glomerular and tubular dysfunction is very important. The blood level of this marker directly correlates with the severity of renal disease. As marker of glomerular filtration rate (GFR) cystatin C is more informative than blood creatinine and creatinine clearance, because it detects the most early changes including hyperfiltration and early stages of hypofiltration, rapid changes of GFR in acute renal failure. Cystatin C gives possibility to evaluate the renal function in pediatric and heriatric patients as well as has prognostic value for evaluation of risks of cardiovascular and other complications.

Key words: laboratory diagnosis, glomerular and tubular renal dysfunction, markers, cystatin C, NGAL.

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

Весьма актуальными задачами лабораторной диагностики в области нефрологии являются: А. Ранняя дифференциальная диагностика хронических патологий, в частности: 1) гломерулярных, 2) тубулярных, 3) преренальных; 4) ренальных; 5) постренальных, и Б. Ранняя диагностика острой почечной недостаточности (ОПН).

Цистатин С — ранний маркер гломерулярной и тубулярной дисфункции

Цистатин С — это негликозилированный белок с молекулярной массой 13,4 кДа, который: 1) с постоянной скоростью синтезируется всеми клетками, содержащими ядра, 2) свободно фильтруется через клубочковую мембрану, 3) метаболизируется в почках, но 4) не секре-

тируется проксимальными почечными канальцами. Относится к семейству ингибиторов цистеиновых протеиназ.

Сывороточные уровни цистатина С обусловлены: 1) постоянной скоростью синтеза, практически не зависящей от возраста, пола, веса, 2) постоянной скоростью выведения из организма, которая зависит от преимущественно ренальных функций, 3) повышением уровней из-за ренальной патологии, 4) повышением синтеза при сердечной недостаточности и острых коронарных синдромах. Чем тяжелее ренальная патология, тем хуже цистатин С фильтруется в почках и тем выше его уровень в крови. Однократное измерение уровня цистатина С в крови позволяет с помощью формул вычислить скорость клубочковой фильтрации (СКФ).

Как маркер СКФ сывороточный цистатин С значительно превосходит сывороточный креатинин и клиренс креатинина, так как способен:

- диагностировать самые ранние изменения СКФ (гиперфильтрацию при гипертензии и диабетической нефропатии и ранние стадии гипофильтрации);
- отслеживать быстрые изменения СКФ при развитии ОПН;
- точно оценивать ренальные функции у педиатрических пациентов и гериатрических пациентов;
- прогнозировать сердечно-сосудистые и другие осложнения функции почек.

и-Цистатин С — маркер тубулярной дисфункции (и-CysC, и — *urinary, мочево́й*)

Ранее полагалось, что в значимых количествах цистатин С в моче обнаруживаться не должен. В дальнейшем было обнаружено, что при нарушении тубулярной функции концентрации и-цистатина С в моче могут возрастать до 200 раз, особенно при остром повреждении почек (ОПП).

Согласно многочисленным исследованиям: 1) повышенный уровень и-цистатина С — маркер нарушения эффективности реабсорбции в проксимальных канальцах; 2) верхний референтный предел для и-цистатина С не зависит от пола, возраста; это измерение является точным.

Уровни и-цистатина С: в норме — $0,096 \pm 0,044$ мг/л; при тубулярных заболеваниях — $4,31 \pm 3,85$ мг/л; при гломерулярных заболеваниях — $0,106 \pm 0,133$ мг/л.

Цистатин С в отделении неотложной терапии

Сывороточный цистатин С диагностирует ОПН, связанные с гломерулярными заболеваниями, цистатин С в моче — ОПН, связанные с тубулярными заболеваниями.

«Измерение и-цистатина С может быть элегантно и точным методом для диагностики и мониторинга тубулярной дисфункции, даже в случаях гломерулярно-тубулярных заболеваний», «поскольку измерение и-цистатина С можно проводить на автоматических биохимических анализаторах, его определение можно легко применять в комплексе со стандартными панелями, которые используются для выявления ренальных патологий, даже в неотложных ситуациях» [2].

«Измерение уровней цистатина С в сыворотке и в моче позволит врачу провести быстрый скрининг ренальных функций, так как измерение цистатина С в сыворотке с большой чувствительностью и специфичностью отражает СКФ, а измерение цистатина С в моче — это хорошее отражение тубулярных функций. Все это позволяет врачу назначать измерение цистатина С в моче в неотложных ситуациях, когда сбор суточной мочи невозможен из-за необходимости срочного получения результатов» [3].

Сывороточный цистатин С также является: 1) эффективным маркером тяжести острой сердечной недостаточности и острых коронарных синдромов. Особенно эффективно его применение для оценки тяжести ОКС без элевации ST-сегмента в комплексе с натрийуретическими пептидами и кардиальными тропонинами [7–9], 2) ранним маркером преэклампсии, позволяющим оценивать риск ее возникновения в первом триместре беременности [5, 11, 12].

Цистатин С — маркер преклинической фазы ренальной патологии

Основной вклад, который внесло изучение цистатина С в медицинскую науку, — это новое понимание того, что является «нормальной функцией почек». Так, «если примем, что на всем диапазоне СКФ между конкретными значениями СКФ и риском летальности у пожилых лиц имеется непрерывная линейная зависимость (без резких пороговых значений), это приведет к новой парадигме того, что понимается под нормальной функцией почек. Одно из главнейших диагностических значений цистатина С состоит в том, что он позволяет количественно определять градиент ренальной функции у лиц, которые не попадают в рамки общепринятых критериев клинических ренальных патологий» [10]. Именно поэтому был предложен термин «преклиническое заболевание почек», характеризующий лиц: а) без клинических заболеваний почек, б) с показателем СКФ по креатинину > 60 мл/мин/1,73 м² и в) с повышенным уровнем сывороточного цистатина С ($\geq 1,0$ мг/мл) [10]. Полагается, что *преклиническое заболевание почек независимо от других факторов предсказывает развитие клинических заболеваний почек и риск ССЗ*. Термины, аналогичные преклиническому заболеванию почек — *прегипертензия и преддиабет*. «*Пожалуй, наиболее многообещающее применение цистатина С — использование его как маркера преклинических или ранних заболеваний почек среди лиц, у которых СКФ, определенная по креатинину, находится в нормальном диапазоне ≥ 60 мл/мин/1,73 м², но цистатин С повышен*» [10].

Показания к измерению цистатина С

1. Скрининг ренальной дисфункции и связанных с ней ССЗ у всех лиц от 55 лет и старше.
2. Быстрая диагностика и стратификация пациентов в ОНТ и ОИТ.
3. Оценка ренальной дисфункции любой этиологии и стратификация ее тяжести при: 1) гипертензии, 2) СД и/или метаболическом синдроме, 3) патологии почек, 4) диабетической нефропатии, 5) трансплантации почек и печени, 6) операциях с применением аппарата искусственного кровообращения (АИК) и 7) у педиатрических пациентов.
4. При беременности — для оценки риска преэклампсии.

5. При сердечной недостаточности (особенно рекомендуется в сочетании с NTpro-BNP, тропонином):
1) при ОКС, особенно без повышения ST сегмента,
2) при ИМ без повышения ST-сегмента.

Специфические белки мочи — маркеры преренальной, ренальной и постренальной патологии

Ренальная протеинурия — один из наиболее важных признаков заболеваний почек. Она может быть вызвана поражением клубочков и/или канальцев нефрона. Неренальная протеинурия может быть преренальной и постренальной (рис. 1).

Преренальная протеинурия возникает при отсутствии патологического процесса в почках, она обусловлена заболеваниями или патологическими состояниями, которые приводят к изменению концентрации белка в плазме крови (гемоглобин при выраженном гемолизе, миоглобин при синдроме разможнения и др.) или к появлению патологических белков (белок Бенс-Джонса и другие парапротеины при миеломной болезни).

Постренальная протеинурия обусловлена выделением с мочой слизи и белкового экссудата при воспалении мочевых путей или кровотечении.

Основные механизмы развития почечной протеинурии:

1) **гломерулярная протеинурия** — увеличение фильтрации белков при повреждении гломерулярного фильтра; 2) **тубулярная протеинурия** — снижение реабсорбции профильтрованных белков клетками почечных канальцев; 3) **смешанная протеинурия** — сочетание гломерулярной и тубулярной протеинурии.

Два типа гломерулярной протеинурии: 1) **селективная гломерулярная протеинурия:** через гломерулярный барьер проходят альбумин и трансферрин; 2) **неселективная гломерулярная протеинурия:** через гломерулярный барьер проходят альбумин, трансферрин и иммуноглобулин G.

Тубулярная протеинурия. Дисфункция проксимальных канальцев нарушает реабсорбцию профильтрованных белков, в моче появляются: α_1 -микроглобулин, β_2 -микроглобулин, ретинол-связывающий белок, в норме проходящие через нормальный клубочковый фильтр, но не реабсорбирующиеся в проксимальных канальцах.

Измерение концентраций указанных белков в моче с помощью иммунотурбидиметрических наборов фирмы АРТЕС (Бельгия) позволяет проводить надежную диф-



Рис. 1. Специфические белковые маркеры мочи для дифференциальной диагностики патологической протеинурии

ференциальную диагностику гломерулярной и тубулярной протеинурии и их подтипов [13].

Липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL — *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) — ранний маркер острого повреждения почек

Острое повреждение почек (ОПП) — новый термин, которым обозначается внезапное прекращение или резкое снижение функций почек (ранее ОПН). ОПП может происходить как без видимых предшествующих признаков надвигающейся почечной дисфункции, так и при развитии осложнений при ХПН. Важнейший традиционный маркер ОПП — повышение сывороточного креатинина.

При ОПП: 1) сывороточный креатинин повышается через 24–48 ч после отказа ренальной функции; 2) цистатин С в сыворотке и/или в моче повышается через 6–8 ч после начала развития ОПП, 3) NGAL повышается в сыворотке и в моче через 2 ч после начала развития ОПП.

«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» [4].

NGAL, или липокалин 2, впервые выделен из супернатанта активированных нейтрофилов человека, однако, как впоследствии было показано, он может синтезироваться в разных органах и выходит в циркулирующую кровь. Функции NGAL: 1) стимулирование пролиферации поврежденных клеток, в особенности эпителиальных и 2) противодействие бактериальным инфекциям (является бактериостатиком). В норме NGAL стимулирует дифференцировку и структурную реорганизацию ренальных эпителиальных клеток. При развитии ренальных заболеваний уровни NGAL в сыворотке постепенно возрастают и коррелируют с тяжестью патологии.

При развитии ОПП:

- повышается синтез NGAL в печени, легких, нейтрофилах, макрофагах и других клетках иммунной системы;
- в сыворотке повышаются уровни s-NGAL (s-segum, сывороточный);
- повышенные уровни NGAL поступают в почки и реабсорбируются в проксимальных канальцах.

Функция повышенного при ОПП сывороточного NGAL — ограничение и/или уменьшение тяжести повреждений в проксимальных канальцах.

- в почках, в дистальных частях нефрона в течение нескольких часов после их повреждения, происходит локальный массовый синтез NGAL *de novo*; функции u-NGAL (u-urinary), синтезированного в почках при ОПП:

- антиинфекционное бактериостатическое действие на дистальный урогенитальный тракт,
- стимулирование выживания и пролиферации клеток в дистальном сегменте, обычно подвергающемся апоптозу при ишемическом ОПП.

Таким образом, s-NGAL, u-NGAL — ранние маркеры развития ОПП при разных типах ренальных повреждений. Четко и многократно показано: при повреждении ренальных канальцев происходит повышение уровня s-NGAL в 7–16 раз, u-NGAL в 25–1000 раз! [4]

Комплексное измерение s-NGAL и u-NGAL дает весьма ценную, специфичную и, самое главное, прогностическую информацию о развитии острого повреждения почек.

NGAL — индикатор ренальных повреждений трансплантационной почки. Мониторинг s-NGAL после трансплантации почки может свидетельствовать либо о восстановлении ренальных функций (быстрое снижение уровней s-NGAL), либо, при медленном снижении или повышении s-NGAL: 1) о развитии осложнений, 2) об их тяжести, 3) об отсроченной функции трансплантата и 4) необходимости диализа [6].

NGAL и ишемические ренальные повреждения при операциях, связанных с сердечно-легочным шунтированием. Ишемическое повреждение почек, вызываемое хирургическими операциями, с применением аппарата искусственного кровообращения, — весьма частая причина ОПП.

«Измерение u-NGAL через короткие промежутки времени после АИК — отличный маркер последующего развития ОПП и его осложнений. Степень подъема u-NGAL позволяет легкое проведение стратификации риска; u-NGAL при этом связан с ключевыми клиническими факторами: длительностью госпитализации, количеством дней в состоянии ОПП, необходимостью диализа и смертностью. Применение этого многообещающего раннего биомаркера позволяет своевременно начинать лечение» [1].

В целом, NGAL — это эффективный ранний маркер и предиктор:

- хронических заболеваний почек,
- диабетической нефропатии,
- волчаночного нефрита,
- ОПП, связанного с разными причинами,
- тяжести ОПП при сепсисе,
- дисфункции почек у пациентов в отделениях неотложной терапии,
- поврежденных трансплантатов почки,
- отсроченной функции трансплантата и необходимости диализа,
- ренальной дисфункции при трансплантации печени,
- ишемических ренальных повреждений при операциях с АИК,
- нефротоксичности фармпрепаратов,

- нефропатии, связанной с нефротоксичными рентгено-контрастными препаратами,
- инфекций мочевого тракта,
- при беременности s-NGAL является ранним маркером гестационного диабета и преэклампсии.

Основная ценность NGAL состоит в том, что он является ранним маркером ОПП при операциях с АИК и при трансплантациях. В этих случаях измеряют u-NGAL до и после операции и получают однозначный ответ. Весьма информативно сочетанное измерение уровней u-NGAL и s-NGAL. Если s-NGAL повышается после операции — это дополнительное указание на ренальное повреждение.

Показания к измерению NGAL:

- 1) пациенты отделений неотложной и интенсивной терапии,
- 2) тяжелые ренальные патологии, трансплантации,
- 3) хирургия с АИК,
- 4) применение нефротоксичных контрастеров.

Литература

1. Bennett M., Dent C.L., Ma Q. et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. — 2008. — 3 (3). — P. 665–673.
2. Conti M., Moutereau S., Esmilaire L. et al. Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin // Clin. Chem. Lab. Med. — 2009. — 47(12). — 1553–1556.
3. Conti M., Moutereau S., Zater M. et al. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction // Clin. Chem. Lab. Med. — 006. — 44 (3). — P. 288–291.
4. Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury // Expert Opin. Med. Diag. — 2008. — 2, 4. — P. 387–398.
5. Franceschini N., Qiu C., Barrow D.A. et al. Cystatin C and preeclampsia: a case control study // Ren. Fail. — 2008. — 30 (1). — P. 89–95.
6. Haase M., Bellomo R., Devarajan P. et al. Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis // Am. J. Kidney Dis. — 2009. — 54 (6). — P. 1012–1024.
7. Manzano-Fernández S., Boronat-García M., Albaladejo-Otón M.D. et al. Complementary prognostic value of cystatin C, N-terminal pro-B-type natriuretic Peptide and cardiac troponin T in patients with acute heart failure // Am. J. Cardiol. — 2009. — 103 (12). — P. 1753–1759.

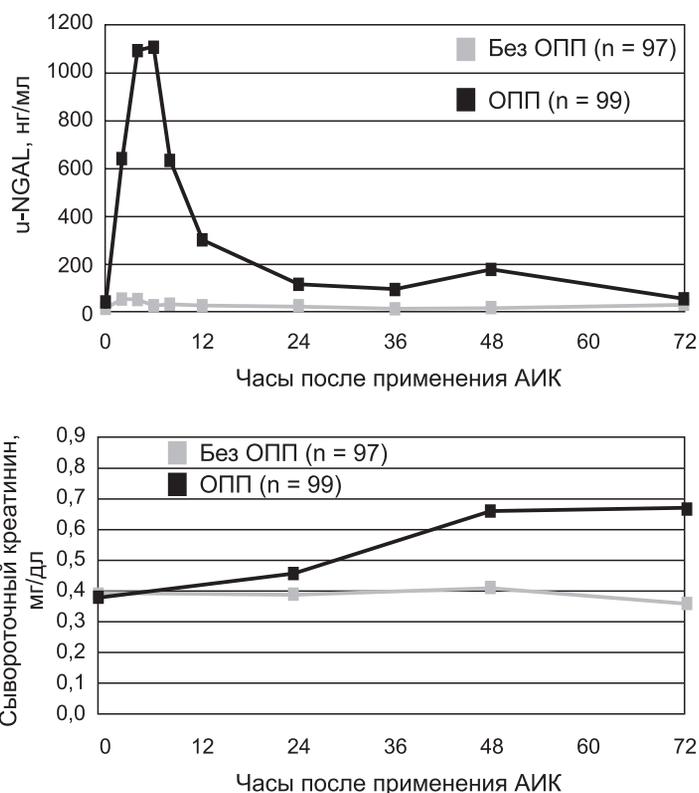


Рис. 2. Динамика уровней NGAL в моче и креатинина в сыворотке после применения АИК

8. Moran A., Katz R., Smith N.L. et al. Cystatin C concentration as a predictor of systolic and diastolic heart failure // J. Card. Fail. — 2008. — 14 (1). — P. 19–26.
9. Naruse H. et al. Cystatin C in acute heart failure without advanced renal impairment // Am. J. Med. — 2009. — 122. — P. 566–573.
10. Shlipak M.G. Cystatin C: research priorities targeted to clinical decision making // Am. J. Kidney Dis. — 2008. — 51. — P. 358–361.
11. Strevens H., Wide-Svensson D., Grubb A. Serum cystatin C is a better marker for preeclampsia than serum creatinine or serum urate // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 2001. — 61 (7). — P. 575–580.
12. Thilaganathan B., Ralph E., Papageorgiou A.T. et al. Raised maternal serum cystatin C: an early pregnancy marker for preeclampsia // Reprod. Sci. — 2009. — 16 (8). — P. 788–793.
13. Новоселова О.В., Волинчик Е.П., Кононова С.В и др. Клиническое значение качественного и количественного анализа белкового состава мочи // ЛАБОРАТОРИЯ, журнал для врачей. — 2006. — № 1. — С. 7–9.

ЦИСТАТИН С: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И НОВЫЕ ЗАДАЧИ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ (ЧАСТЬ 3)

В.В. ВЕЛЬКОВ

ЗАО «ДИАКОН», г. Пушкино, Московская область, Россия

Резюме. Обзор, касающийся применения цистатина С в лабораторной диагностике ренальных заболеваний, их сердечно-сосудистых и других осложнений.

В статье приводятся данные многочисленных исследований, отражающих уровни цистатина С в сыворотке крови в состоянии здоровья и при развитии патологического процесса. В норме сывороточные уровни цистатина С обусловлены: 1) постоянной скоростью его синтеза, практически не зависящей от возраста, пола, веса и 2) постоянной скоростью его выведения из организма, которая определяется преимущественно ренальными функциями.

При патологии уровень цистатина С в крови повышается. Чем тяжелее ренальная патология, тем хуже цистатин С фильтруется в почках и тем выше его уровень в крови.

Цистатин С представлен как 1) самый точный эндогенный маркер скорости клубочковой фильтрации, по своим диагностическим характеристикам значительно превосходящий креатинин; 2) высокочувствительный маркер тяжести сердечно-сосудистых событий, независимый от таких кардиомаркеров, как кардиальные тропонины, натрийуретические пептиды, С-реактивный белок и др.; 3) ранний маркер преэклампсии и 4) перспективный маркер инвазивности некоторых злокачественных заболеваний.

Ключевые слова: цистатин С, скорость клубочковой фильтрации, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания почек, почечная недостаточность.

CYSTATIN C: THE NEW OPPORTUNITIES AND NEW GOALS FOR LABORATORY DIAGNOSTICS (PART 3)

V.V. VELKOV

“DIAKON”, Pushchino, Moscow region, Russia

Summary. The review concerns the use of cystatin C in laboratory diagnosis of renal diseases and their cardiovascular and other complications. The results of numerous investigations devoted to the influence of pathological process on serum cystatin C are discussed. The normal values of cystatin C reflect: 1. constant velocity of its synthesis, which doesn't depend on the age, sex and weight and 2. constant velocity of its excretion, determined mostly by the renal functions. In pathologic conditions the cystatin C level is elevated. The increase of renal disease severity leads to worse filtration of cystatin C in kidneys and increase of its level in blood. Thus, cystatin C is: 1. the best endogenous marker of glomerular filtration rate having higher than creatinin diagnostic significance; 2. highly sensitive marker of cardiovascular diseases, which is independent on other cardiac markers as cardiac troponins, natriuretic peptides, C-reactive protein etc.; 3. early marker of preeclampsy and perspective marker of the invasion degree of the malignancies.

Key words: cystatin C, glomerular filtration rate, cardiovascular diseases, renal diseases, renal failure.

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

Цистатин С: ранний маркер преэклампсии

Цистатин С не проходит через плацентарный барьер

У 50 здоровых беременных женщин и у их новорожденных детей (в течение первых пяти дней жизни) определяли в сыворотке цистатин С, креатинин и мочевины. Обнаружено, что у беременных женщин уровень цистатина С составлял $1,52 \pm 0,39$ мг/л ($0,69-2,30$ мг/л), креатинина — $58,9 \pm 11,5$ ммоль/л, мочевины — $3,117 \pm$

$0,729$ ммоль/л. У новорожденных при рождении уровни цистатина С составляли $2,29 \pm 0,52$ мг/л ($1,17-4,84$ мг/л), через 5 дней уровни цистатина С понизились. Креатинин у детей при рождении составлял $80,08 \pm 14,26$ ммоль/л. Была обнаружена разница между материнским и неонатальным цистатином С и креатинином, но корреляции между материнскими и неонатальными уровнями цистатина С установлено не было ($r = 0,05$). При этом корреляция между материнским и неонатальным креатинином составляла $r = 0,45$. Авторы сделали вывод:

«предварительные результаты показывают, что цистатин С не проходит через плацентарный барьер. Поэтому уровень неонатального цистатина С действительно отражает его концентрацию у новорожденных» [229]. Впоследствии такой вывод был подтвержден при наблюдении 27 здоровых женщин с неосложненной беременностью, но подвергшихся кесареву сечению в нормальный гестационный срок [230].

Цистатин С при нормальной беременности

Является ли цистатин С надежным маркером СКФ при беременности? Наблюдали 48 здоровых женщин с первой беременностью и 12 здоровых небеременных женщин (контроль). Определялись уровни цистатина С и креатинина, СКФ измерялась с помощью «золотого стандарта». Как оказалось, уровни цистатина С и креатинина были связаны с показателями СКФ, как у беременных, так и у небеременных женщин. Однако корреляция между цистатином С и реальными значениями СКФ у беременных и небеременных женщин была разной. Авторы полагают, что «существуют физиологические различия между фильтрацией у беременных и небеременных женщин» и считают, что «сывороточный цистатин С надежно отражает СКФ у беременных, небеременных, здоровых и гипертензивных женщин» [231].

Каковы же референтные значения цистатина С при беременности? При наблюдении 197 здоровых беременных было обнаружено, что:

- 1) в первом триместре средние сывороточного значения цистатина С составляют $0,82 \pm 0,184$ мг/л,
- 2) уровни цистатина С снижаются во втором триместре и составляют $0,651 \pm 0,14$ мг/л,
- 3) в третьем триместре они повышаются до $0,82 \pm 0,191$ мг/л.

После родов уровень цистатина С составляет $0,94 \pm 0,12$ мг/л. Между уровнями цистатина С и креатинина наблюдается сильная корреляция. Между СКФ («золотой стандарт») и уровнем цистатина С обнаружена линейная зависимость. В первом триместре СКФ (по «золотому стандарту») составляла $128,06 \pm 29,7$ мл/мин, во втором триместре — $155,2 \pm 29,59$ мл/мин. Интересно, что цистатин С имел сильную отрицательную корреляцию со сроками беременности ($r = -0,663$). Авторы делают вывод, что «при беременности средние сывороточ-

ные уровни цистатина С не зависят от возраста, роста, веса и уровня глюкозы в крови. Цистатин С можно использовать для ранней диагностики ренальных нарушений при беременности. Цистатин С — это надежный, полезный и многообещающий маркер СКФ у беременных женщин» [232].

Действительно ли в течение беременности СКФ меняется? При наблюдении 398 здоровых беременных женщин (контрольная группа 58 здоровых небеременных) в сыворотке измерялись: цистатин С, креатинин, мочевая кислота, бета-2-микроглобулин. Измерения проводились в первом, втором, в начале и в конце третьего триместра. По сравнению с контролем уровни креатинина были понижены во всех измерявшихся точках. Уровни мочевой кислоты были снижены в первом и втором триместрах, но повысились к концу третьего триместра. Такая же закономерность была обнаружена для цистатина С и бета-2-микроглобулина. В целом, результаты свидетельствуют о повышении СКФ во время беременности, в особенности в первом и втором триместрах, и о снижении СКФ в конце третьего триместра [233].

В другом исследовании СКФ определяли по креатинину (MDRD) и по цистатину С у 52 здоровых беременных женщин, начиная с 10 недели беременности и до родов [234]. Образцы сыворотки были сгруппированы согласно срокам беременности: 7–16, 18–24, 24–28, 28–31, 34–38 недель, 0–14 дней до и после родов и через 6 недель после родов. СКФ определялась по креатинину (формула MDRD) и по цистатину С (по формуле Ларсона). Найдено, что медианные значения СКФ по креатинину были (мл/мин/1,73 м²) > 120 в течение всех триместров. Наименьшее значение СКФ было после родов — 87 мл/мин/1,73 м². Нижний предел референтного интервала СКФ во время беременности был в нормальном диапазоне, характерном для небеременных женщин. Медианные значения для СКФ по цистатину С в первые два триместра также составляли > 120 мл/мин/1,73 м², однако конкретные значения СКФ по цистатину С были выше таковых для СКФ по креатинину. В последнем триместре наблюдалось очевидное снижение СКФ по цистатину С, но не по креатинину. А значения СКФ по цистатину С после родов были выше таковых, определенных по креатинину (табл. 1).

Таблица 1. Динамика СКФ при беременности [234]

Неделя	СКФ (креатинин)		СКФ (цистатин С)	
	2,5 перцентиль	97,5 перцентиль	2,5 перцентиль	97,5 перцентиль
7–16	94 (90–98)	175 (166–185)	158 (153–164)	286 (265–308)
18–24	102 (100–105)	195 (178–212)	132 (125–139)	248 (241–255)
24–28	95 (89–102)	213 (185–241)	119 (114–123)	238 (215–260)
28–31	105 (101–109)	209 (185–234)	107 (102–111)	220 (212–227)
31–34	102 (99–105)	190 (176–204)	83 (78–87)	216 (190–241)
34–38	100 (92–107)	197 (181–213)	55 (50–59)	176 (156–197)
Перед родами	81 (70–91)	218 (175–261)	38 (27–49)	156 (122–189)
После родов	66 (60–72)	131 (118–143)	80 (71–89)	194 (169–219)

Более того, достоверной корреляции между СКФ по цистатину С и креатинину не обнаружено ни в одном периоде беременности. Авторы заключают, что *«измерение СКФ у здоровых беременных женщин по цистатину С и креатинину дает разные результаты, и разница зависит от срока беременности. Поэтому при определении СКФ у беременных с помощью указанных маркеров следует учитывать, что разные маркеры имеют разные референтные уровни, которые, в случае цистатина С, сильно зависят от срока беременности»* [234]. Отметим, что измерение СКФ с помощью «золотого стандарта» в данной работе не проводилось.

Цистатин С — предиктор преэклампсии

Преэклампсия — это системное осложнение, характеризующее гипертензией и протеинурией, происходящее во второй половине беременности и связанное со значительной фетальной заболеваемостью и летальностью. Ренальная дисфункция и ишемия плаценты — существенные компоненты преэклампсии. Преэклампсия опасна переходом в эклампсию, которая проявляется судорогами и комой и может приводить к задержке развития плода и к преждевременным родам.

Уровни цистатина С, креатинина и мочевой кислоты определялись у 45 пациенток с преэклампсией (диастолическое давление > 90, экскреция альбумина в мочу > 300 мг/л, контрольная группа — 100 здоровых беременных женщин). У пациенток все три маркера были существенно повышены и составляли: цистатин С — $1,55 \pm 0,29$ против $1,05 \pm 0,19$ мг/л в контроле, креатинин — 70 ± 23 против $56 \pm 9,7$ мкмоль/л в контроле и мочевая кислота — 413 ± 128 против 305 ± 61 мкмоль/л в контроле. Анализ AUC ROC показал, что для диагностики преэклампсии сывороточные уровни цистатина С имели самую большую точность [235].

В другом исследовании наблюдали 36 беременных женщин (третий триместр) с гипертензией, у которых проводили ренальную биопсию, определяли тяжесть эндотелиоза и средние показатели гломерулярного объема. Обнаружена линейная корреляция между тяжестью эндотелиоза и цистатином С и между цистатином С и гломерулярным объемом ($r = 0,60$). Уровни креатинина и мочевой кислоты также повышались с тяжестью эндотелиоза, но не выше референтных значений. Авторы делают вывод: *«цистатин С можно использовать не только как маркер ренальной дисфункции, но и как маркер тяжести гломерулярного эндотелиоза и повышения гломерулярного объема при беременности»* [236].

А вот результаты наблюдения 198 беременных с гипертензией, проведенного в клинике короля Эдуарда VIII в Дурбане, Южная Африка. В качестве стандарта использовали клиренс креатинина (24 ч). 72 из 198 пациенток имели преэклампсию. Как оказалось, уровни цистатина С отрицательно коррелировали с клиренсом креатинина ($r = -0,486$). Как считают авторы, «сывороточный цистатин С отражает СКФ у гипертен-

зивных беременных, что позволяет избежать неточностей, связанных со сбором суточной мочи» [237].

В следующем исследовании участвовали 57 беременных с преэклампсией и 218 женщин с нормальной беременностью в третьем триместре. Как оказалось, плазменные уровни цистатина С и бета-2-микроглобулина у пациенток с преэклампсией были значительно повышены. Верхний предел референтного уровня (97,5 перцентиль) составлял $2,57$ мг/л для бета-2-микроглобулина и $1,37$ мг/л для цистатина С. Авторы полагают, что *«бета-2-микроглобулин и цистатин С могут использоваться как маркеры ренальных нарушений при преэклампсии»* [238].

Насколько реально оценить риск преэклампсии в количественных терминах? Наблюдали 100 случаев преэклампсии и 100 случаев нормальной беременности. Исходно все наблюдавшиеся женщины не имели гипертензии, СД и ренальной патологии и были беременны одним ребенком. Плазменный цистатин С определяли при родах. Найдено, что при преэклампсии средний уровень цистатина С составлял $1,38 \pm 0,04$ против $1,22 \pm 0,03$ мг/л при нормальной беременности. После всех поправок установлено, что *риск преэклампсии при цистатине С в четвертой квартили повышен в 12 раз по сравнению с нижней квартилью* [239].

Можно ли оценить риск преэклампсии на ранних сроках беременности? Вот что показало измерение цистатина С в первом триместре у 120 беременных, 30 из которых впоследствии имели преэклампсию. У женщин с последующим развитием преэклампсии медианные уровни цистатина С были повышены и составляли $0,65$ мг/л против $0,57$ мг/л. Из 30 женщин с последующей преэклампсией 14 (47%) имели уровень цистатина С выше 80-и центили ($0,76$ мг/л). Авторы считают, что *«на ранних сроках беременности сывороточные концентрации цистатина С могут иметь значение для выявления женщин с высоким риском развития преэклампсии»* [240].

Весьма показательны результаты наблюдения 45 беременных женщин с последующей преэклампсией, у которых на 14,7 неделе беременности (медианное значение) измерялись: цистатин С, бета-2-микроглобулин, сывороточный амилоидный белок А, СРБ и неоптерин. Те же маркеры измерялись на 16,3 неделе (медианное значение) у 125 женщин с нормальной беременностью. Как оказалось, у женщин с последующей преэклампсией были повышены: цистатин С, бета-2-микроглобулин, СРБ и неоптерин. Наилучшие предиктивные характеристики имела комбинация: цистатин С и СРБ (AUC ROC = 0,825 против AUC ROC = 0,725 только для цистатина С) [241]. В другом небольшом исследовании наблюдали 15 беременных, у 6 из которых в третьем триместре развилась преэклампсия, а 9 оставались нормотензивными. У женщин с последующей преэклампсией во втором триместре средние уровни цистатина С составляли $0,76$ ($0,50-1,26$) против $0,53$ ($0,41-0,55$) мг/л

в контроле. В уровнях креатинина значимой разницы выявлено не было — 76,1 против 65,5 мкмоль/л [242].

Итак, сывороточные уровни цистатина С повышаются на поздних стадиях беременности и на ранних сроках при преэклампсии. Является ли такое повышение цистатина С при преэклампсии результатом только ренальной дисфункции? Или этому могут быть и какие-то другие причины?

С помощью ПЦР, гибридизации *in situ*, иммуноблоттинга и иммуногистохимии синтез мРНК и белка цистатина С определяли в плаценте у 13 женщин с нормальной беременностью и у 22 с преэклампсией. Синтез мРНК цистатина С при преэклампсии был повышен и особенно высоким он был в ее тяжелых случаях. Та же картина была получена и для синтеза белка цистатина С, кроме того, цистатин С был обнаружен и в амниотической жидкости. Авторы полагают, что «синтез и секреция цистатина С в плаценте могут давать вклад в повышение его плазменных уровней при преэклампсии» [243].

Преэклампсия и сердечно-сосудистые осложнения при беременности

Дисфункция миокарда, в частности, левого желудочка — одна из серьезных сердечно-сосудистых патологий, связанных с осложненной беременностью. Наблюдали 40 беременных с преэклампсией и 40 — с нормальной беременностью с гестационным сроком $35,2 \pm 4,0$ недель и $36,8 \pm 1,3$ недель в контроле. У 22 женщин была диагностирована тяжелая преэклампсия, у 88 — умеренная. При преэклампсии диастолическое давление составляло 103 ± 15 против 70 ± 8 (в контроле), а систолическое — 156 ± 20 против 111 ± 11 . В контрольной группе протеинурия не обнаруживалась, но была высокой в группе с преэклампсией. Уровни сывороточного цистатина С составляли $1,44 \pm 0,35$ нг/мл при умеренной преэклампсии и $1,80 \pm 0,50$ при тяжелой. При этом цистатин С был повышен в 52% случаев преэклампсии, а креатинин — только в 18%. Что касается сердечного тропонина I, то и он был положительно связан с тяжестью преэклампсии и составлял $0,61$ против $0,78$ мг/л при тяжелой преэклампсии. Авторы делают вывод, что «сывороточные тропонин I и цистатин С — чувствительные и специфические маркеры для мониторинга состояния кардиальных миоцитов и ренальных функций при преэклампсии» [244].

У 35 беременных с преэклампсией (контрольная группа — 30 женщин с нормальной беременностью) в течение гестационного периода и через 3,6 месяца после родов с помощью функциональной диагностики оценивались кардиальные функции и измерялись уровни NT-proBNP и цистатина С. Как оказалось, у женщин с ранним развитием преэклампсии (до 34 недели) уровни NT-proBNP были выше, чем у женщин, у которых преэклампсия развилась после 34 недели либо после родов. Такая же закономерность наблюдалась и для уровней

цистатина С. Авторы приходят к выводу, что «при беременности, осложненной преэклампсией, особенно на ранних сроках, нарушена диастолическая функция левого желудочка и повышены уровни NT-proBNP и цистатина С» [245].

Таким образом, при беременности уровни цистатина С повышены, при этом в разные периоды по-разному. Более высокие, по сравнению с таковыми при нормальной беременности, уровни цистатина С являются ранним маркером риска развития преэклампсии и сердечно-сосудистых осложнений, с ней связанных.

Цистатин С и онкологические заболевания

Является ли цистатин С онкомаркером?

Указания на то, что повышенные уровни сывороточного цистатина С могут наблюдаться при злокачественных заболеваниях, появились в 2000 г. и с тех пор находятся в центре многих исследований. При измерении перед хирургическим вмешательством сывороточного цистатина С у 345 пациентов с колоректальным раком было обнаружено, что уровни цистатина С (по сравнению с контролем) *повышены* в 1,4–1,6 раза. При этом наблюдалась корреляция между повышенным уровнем цистатина С и снижением выживаемости [246]. В другом исследовании оказалось, что *сниженные* в 1,18 раза уровни сывороточного цистатина С связаны с инвазивным поведением плоскоклеточной карциномы головы и шеи, а повышенный цистатин С у таких больных был связан с их повышенной выживаемостью. Полагалось, что это связано с последующим вслед за повышением цистатина С ингибированием цистеиновых протеиназ, участвующих в процессии инвазивности [247].

В хирургическом материале, полученном от пациентов с раком яичников, определялись (с помощью иммуногистохимии, иммуноблоттинга) цистатин С и катепсин S (катепсин S — основная из цистеиновых протеиназ, мишень для ингибирующего действия цистатина С). Концентрации цистатина С и катепсина S также измерялись и в образцах сыворотки. Оказалось, что цистатин С и катепсин S действительно обнаруживаются в раковых клетках и связаны со стромальными тканями, однако в доброкачественных опухолях такого не отмечено. Что касается сывороточных уровней катепсина S, то никакой достоверной разницы между доброкачественными и злокачественными случаями обнаружено не было. Однако сывороточные уровни цистатина С были весьма повышены при доброкачественных опухолях. Авторы полагают, что «инвазия раковых клеток супрессуруется цистатином С, и эта супрессия зависит от дозы цистатина С». Авторы делают вывод, что полученные ими результаты «делают убеждающе очевидным, что катепсин S и цистатин С участвуют в механизме инвазии рака яичников» [248]. Однако исследование 21 пациента с первичным раком мочевого пузыря показало, что «прямой корреляции между сывороточным

цистатином *C* и прогрессирующим карциномы мочевого пузыря не имеется» [249].

Так можно ли использовать сывороточные уровни цистатина *C* и катепсина *S* для прогнозирования инвазивности злокачественных опухолей и мониторинга их химиотерапии?

Наблюдались 42 пациента с тяжелыми стадиями немелкоклеточного рака легких и 15 практически здоровых добровольцев. Образцы периферической крови отбирались до и после четырех циклов химиотерапии.

У больных цистатин *C* был выше, чем у здоровых, по катепсину *S* отличий не было. Не было и корреляции между уровнями цистатина *C* и катепсина *S*. Пациенты с более тяжелой стадией рака (T4) имели уровни цистатина *C*, *сниженные* по сравнению с таковыми у пациентов со стадией T2. Корреляции между цистатином *C*, катепсином *S* и химиотерапией не наблюдалось. Однако у пациентов с положительной реакцией на химиотерапию уровни цистатина *C* положительно коррелировали с сывороточными уровнями креатинина ($r = 0,535$). Прогнозирующей ценностью цистатин *C* и катепсин *S* не обладали. Авторы делают окончательный вывод: «По сравнению со здоровыми лицами пациенты с раком легкого имеют повышенные уровни сывороточного цистатина *C*. На наш взгляд, определение концентраций катепсина *S* и цистатина *C* не имеет клинического значения для прогнозирования сроков выживаемости при раке легкого» [250].

Но вот что говорит наблюдение 157 пациентов с впервые диагностированной множественной миеломой, 28 больных с ее рецидивом, подвергавшихся химиотерапии с помощью препарата бортезомиб (bortezomib), и 52 лиц контрольной группы. У первично диагностированных больных уровни цистатина *C* были повышены и коррелировали с тяжестью заболевания, бета-2-микроглобулином, высоким креатинином сыворотки и низким клиренсом креатинина. Статистический анализ выявил, что только цистатин *C* и лактатдегидрогеназа (ЛДГ) имели независимое прогностическое значение в отношении выживаемости пациентов. Сочетанное определение цистатина *C* и ЛДГ позволило выявить три группы пациентов с разными прогнозами. Группа с высоким риском: повышены и цистатин *C*, и ЛДГ, выживаемость — 24 месяца (медианное значение). Промежуточная группа: повышены или цистатин *C*, или ЛДГ, выживаемость — 48 месяцев. Группа с низким риском: низкие уровни и цистатина *C*, и ЛДГ, срок выживаемости пока не установлен. Что касается пациентов с рецидивами, то у них цистатин *C* был более высокий, чем у первично диагностированных больных. У пациентов с благоприятным ответом на бортезомиб уровни цистатина *C* снижались. Авторы заключают: «Цистатин *C* — не только чувствительный маркер ренальных нарушений, но также отражает тяжесть прогрессирующего опухоли при миеломе и имеет прогностическое значение. Его снижение при терапии бортезомибом отра-

жает антимиеломную активность препарата и, вероятно, его прямое действие на ренальные функции [251].

Вот результаты еще одного исследования. Наблюдались больные с раком молочной железы (РМЖ) и с метастазами в костной системе и пациенты с раком простаты (РП), подвергавшиеся химиотерапии с помощью золедроновой кислоты (ЗК, zoledronic acid). В сыворотке измерялись уровни цистатина *C* и ИЛ-6. Оказалось, что по сравнению с контролем средние уровни цистатина *C* повышены у больных с РМЖ и у пациентов с первичным остеопорозом, причем у больных с РМЖ повышение цистатина *C* было более высоким, чем при первичном остеопорозе. У пациенток с РМЖ корреляции между уровнями цистатина *C* и ИЛ-6 не было. Однако средние уровни ИЛ-6 были повышены у пациентов с РП и у больных с доброкачественной гиперплазией простаты. При этом у пациентов с РП наблюдалась положительная корреляция между ИЛ-6, количеством метастазов в костной системе и уровнями ПСА. Уровни цистатина *C* и ИЛ-6 с указанными параметрами не коррелировали. Введение ЗК пациентам с метастазами в костной системе приводило к статистически достоверному повышению ИЛ-6 и цистатина *C* только у пациентов с РП и с метастазами. По мнению авторов, «эти результаты указывают на то, что ИЛ-6 и цистатин *C* могут рассматриваться как новые мишени для терапии рака и как маркеры повышенной остеобластической активности, связанной с действием бифосфоната на пациентов с РП и с метастазами в костной системе» [252].

Итак, возможно ли отличить изменения уровней цистатина *C*, которые непосредственно связаны с тяжестью злокачественного заболевания, от изменений, связанных с нефротоксичностью антираковых препаратов и/или с ренальной дисфункцией, ассоциированной с другими причинами? Может ли цистатин *C* быть не только онкомаркером, но и индикатором скорости клубочковой фильтрации у онкологических пациентов?

Цистатин *C* и СКФ у онкологических пациентов

Наблюдались 176 пациентов с солидными опухолями и гематологическими злокачественными заболеваниями, у которых определялись сывороточные уровни цистатина *C* и креатинина и определялись показатели СКФ. Найдено, что медианные показатели СКФ, согласно креатинину, составляли 88 мл/мин/1,73 м² (MDRD), по формуле Кокрофта–Гаулта — 89 мл/мин/1,73 м²; концентрация креатинина составляла 0,9 мг/дл, а цистатина *C* — 0,9 мг/л. У пациентов со второй стадией ХБП уровни креатинина и цистатина *C* составляли 1 мг/дл и 1,1 мг/л соответственно. Пациенты с пониженной СКФ < 60 мл/мин/1,73 м² (MDRD) имели повышенный относительный риск 9,2 одновременного наличия высоких уровней NT-proBNP [253].

У 102 онкологических пациентов СКФ определялась по креатинину и рассчитывалась с применением 8 раз-

личных формул, учитывающих антропометрические показатели, полученные результаты сравнивались со значениями СКФ согласно клиренсу креатинина. В итоге авторы пришли к выводу, что индивидуальные значения СКФ не могут быть удовлетворительно точно определены с помощью только одной формулы. Оптимальный алгоритм расчета СКФ у онкологических пациентов может включать: 1) сначала расчет по формуле MDRD, 2) затем расчет СКФ в верхнем и нижнем диапазоне с помощью формулы Райта (Wright) и 3) с помощью модифицированной формулы Салазара–Коркорана (Salazar–Corcoran). Авторы отмечают, что приемлемость данного алгоритма должна быть проверена в наблюдении большего количества пациентов [254].

Наблюдались 82 пациента с онкологическими заболеваниями, 39 больных без онкозаболеваний, 206 пациентов с ренальными заболеваниями различной тяжести и 31 индивид контрольной группы, у которых измерялись цистатин С, креатинин и клиренс креатинина. Статистический анализ показал, что «сывороточные уровни цистатина С не всегда являются надежным маркером СКФ у пациентов со злокачественными заболеваниями» [255].

СКФ и цистатин С при химиотерапии

Весьма показательны результаты сравнительно небольшого исследования, в котором наблюдались 19 пациентов с острым лимфобластным лейкозом, острым миелоидным лейкозом и хроническим миелоидным лейкозом, которым после трансплантации костного мозга назначались нефротоксичные антираковые препараты. Уровни цистатина С, мочевины, креатинина и клиренса креатинина определялись за 24 ч перед трансплантацией и через одну, две и три недели после. Перед трансплантацией цистатин С был повышен, но уровни мочевины, креатинина и клиренса креатинина от контроля не отличались. Через неделю после трансплантации уровни цистатина С были *снижены* (по сравнению с предоперационными), но повышены по сравнению с контролем; уровни мочевины, креатинина и клиренса креатинина от контрольных достоверно не отличались. Через две–три недели после трансплантации уровни цистатина С оставались повышенными, а показатели креатинина, мочевины и клиренса креатинина были сходны с контрольными. Авторы полагают, что «цистатин С не может быть надежным маркером при мониторинге нефротоксичности препаратов, применяемых при трансплантации костного мозга» [256].

У 41 пациента уровни цистатина С, креатинина и клиренсинулина измерялись до и после получения цисплатина (cisplatin). Показано, что «цистатин С представляет собой более чувствительный клинический маркер для ранней оценки нарушений СКФ, вызванных цисплатином, чем сывороточный креатинин. При этом изменения сывороточного цистатина С хорошо коррелируют со снижением СКФ, измеряемым по клиренсу инулина» [257].

Метотрексат (МТС) (methotrexate, MTX) — эффективный препарат для терапии ревматоидного артрита (РА), однако у некоторого количества пациентов, его получающих, развиваются осложнения, в частности, миелосупрессия, одним из факторов риска которой является почечная недостаточность. В этих случаях оценка ренальной дисфункции с помощью креатинина является неудовлетворительной. 78 пациентов с РА (в возрасте 50 лет и старше) получали МТС и наблюдались в течение года. Как оказалось, повышение уровней цистатина С было связано с миелотоксичностью. Авторы полагают, что «пожилые пациенты с РА потенциально имеют субклиническую ренальную недостаточность, определяемую согласно сывороточной концентрации цистатина С. Повышенные уровни цистатина С — более чувствительный индикатор, предсказывающий миелотоксичность, вызываемую МТС, чем сывороточный креатинин» [258].

Итак, похоже, что измерение у онкологических пациентов сывороточных уровней цистатина С имеет большие научные перспективы. Однако при рутинном измерении цистатина С для диагностики ренальной дисфункции у онкобольных могут возникнуть проблемы с интерпретацией результатов, которые могут зависеть от типа злокачественного заболевания, от степени его инвазивности, от эффективности химиотерапии, от нефротоксичности лекарственных препаратов и от сопутствующей сердечной недостаточности.

Гипо- и гипертиреоз и цистатин С

Нарушения тиреоидных функций могут существенно влиять на сывороточные уровни цистатина С, что следует учитывать. Так, при определении уровней цистатина С у 26 лиц с субклиническим гипотиреозом и у 14 пациентов с субклиническим гипертиреозом до и после коррекции к норме было обнаружено, что у пациентов с гипотиреозом при коррекции уровни цистатина С повышались, у больных с гипертиреозом после коррекции уровни цистатина С снижались [259]. В другом исследовании было получено подтверждение того, что уровни цистатина С действительно связаны с тиреоидным статусом. Полагается, что сывороточные уровни цистатина С могут возрастать с увеличением скорости метаболизма, вероятно, по причине интенсивности клеточного обмена [260]. Показано также, что применение глюкокортикоидов связано с более высокими концентрациями цистатина С [261, 262]. В целом 1) тиреоидная дисфункция связана с изменением сывороточных уровней цистатина С и 2) синтез цистатина С стимулируется высокими дозами кортикостероидов.

И еще об одном направлении применения цистатина С, которое может показаться неожиданным.

Цистатин С — маркер социально-экономического статуса

Недавно предложено включить измерение важнейших биомаркеров в исследования социально-эконо-

мических процессов, которые традиционно проводятся на основе опросов населения и анализа соответствующих демографических, экономических и др. статистических данных. В частности, для выявления взаимосвязи между социально-экономическим статусом, состоянием здоровья населения и уровнем здравоохранения рекомендуется включать в программы массовых социально-экономических исследований измерение: 1) общего холестерина, 2) ЛПВП, 3) гликозилированного гемоглобина, 4) С-реактивного белка и, наконец, 5) *цистатина С*. Разумеется, результаты таких массовых измерений будут иметь не только большое научное значение для выработки оптимальных экономических и политических решений, но и будут крайне важны для страховой медицины и ее пациентов [267].

Итак, цистатин С сыворотки:

- наиболее точный эндогенный маркер СКФ,
- ренальной дисфункции и

- ее сердечно-сосудистых осложнений и смертности,
- ранний маркер диабетической нефропатии и ее прогрессирования,
- ранний маркер преэклампсии,
- при ОКС — маркер его тяжести, в особенности в случаях без элевации ST-сегмента, и предиктор его исходов.

и-Цистатин С:

- маркер тубулярной дисфункции и
- тубулярных интерстициальных заболеваний.

Благодарности. Автор считает своей приятной обязанностью поблагодарить О.И. Резникову (ЗАО «ДИА-КОН») за большую помощь в работе над текстом.

Список литературы имеется в редакции.

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

- **размещение рекламы**

в научно-практическом журнале
«Клинико-лабораторный консилиум»

Директор ООО «АкваТест СПб»

Игнатик Игорь Николаевич

195220, Санкт-Петербург,

пр. Гражданский, д. 11.

Тел./факс: (812) 600-22-74, 777-05-59.

E-mail: akvatest@akvatest.ru, akvatest@mail.ru

Сайт: www.cystatin.ru

ГИПЕРФРУКТОЗЕМИЯ КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

М.В. РЕШЕТНЯК

ФГУЗ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова»
МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Полагают, что увеличение употребления фруктозы в пищу является главной причиной эпидемии метаболического синдрома (МС), сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета. Объективным показателем избыточного употребления фруктозы может служить повышение ее концентрации в плазме крови. Частота гиперфруктоземии у пациентов с МС составила 75%, а у пациентов без метаболического синдрома — 50%. Средняя концентрация фруктозы в плазме крови натощак у пациентов с метаболическим синдромом составила $(0,228 \pm 0,261)$ ммоль/л, а у пациентов без МС — $(0,105 \pm 0,151)$ ммоль/л ($p = 0,016$). Тощаковая концентрация фруктозы в плазме крови коррелировала со среднесуточным уровнем систолического ($r = 0,351, p < 0,001$) и диастолического ($r = 0,209, p = 0,019$) артериального давления, концентрацией мочевой кислоты ($r = 0,179, p = 0,044$), глюкозой через 120 мин. после нагрузки ($r = 0,535, p = 0,001$) и адипонектина ($r = -0,255, p = 0,005$). Таким образом, гиперфруктоземия может рассматриваться как биохимический маркер МС.

Ключевые слова: фруктоза, гиперфруктоземия, метаболический синдром.

HYPERFRUCTOSEMY AS BIOCHEMICAL MARKER OF METABOLIC SYNDROME

M.V. RESHETNYAK

Federal State Health Care Institution "All-Russia A.M. Nikiforov Center of disaster and radiation medicine" Ministry of Emergency Situations, Saint-Petersburg, Russia

Summary. It is suggested that high-fructose diet is the main cause of the epidemic of the metabolic syndrome (MS), cardio-vascular disease and diabetes mellitus. Hyperfructosemia was detected in 75% of patients with MS and in 50% patients without MS. Elevated fructose concentrations in plasma can reflect excessive dietary fructose intake. The mean fasting plasma fructose concentration was $(0,228 \pm 0,261)$ mmol/l in patients with MS, while in patients without MS it was $(0,105 \pm 0,151)$ mmol/l ($p = 0,016$). The fasting plasma fructose concentration was correlated with average daily systolic ($r = 0,351, p < 0,001$) and diastolic ($r = 0,209, p = 0,019$) blood pressure, plasma uric acid concentration ($r = 0,179, p = 0,044$), plasma glucose concentration at 120 min after glucose load ($r = 0,535, p = 0,001$) and plasma adiponectin concentration ($r = -0,255, p = 0,005$). Thus, hyperfructosemia can be considered as a biochemical marker of MS.

Key words: fructose, hyperfructosemia, metabolic syndrome.

Данные для корреспонденции:

Решетняк М.В., тел. (812) 294-50-45, e-mail: reshetnyak.m@mail.ru

В последние десятилетия наблюдается драматический рост заболеваемости сахарным диабетом и сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), которые являются лидирующей (29%) причиной смерти во всем мире. В 2004 г. от ССЗ умерло 17,1 миллиона человек, а к 2030 г., по прогнозам, от ССЗ умрет 23,6 миллиона человек [3]. В настоящее время в мире насчитывается около 220 млн больных с установленным диагнозом СД, а по прогнозам, за период 2005–2030 гг. число случаев смерти от диабета удвоится [2]. Развитию эпидемии ССЗ и сахарного диабета в значительной мере поспособствовали произошедшие за последние десятилетия измене-

ния в поведении и образе жизни людей, которые привели к широкому распространению метаболического синдрома, достигающему 20% в России [23].

МС является патологическим состоянием, при котором значительно повышен риск развития сахарного диабета и ССЗ [29], и представляет собой совокупность факторов риска ССЗ (абдоминальное ожирение, атерогенная дислипидемия, нарушения углеводного обмена, артериальная гипертензия), имеющих единую патофизиологическую основу — инсулинорезистентность [25]. Среди возможных причин МС выделяют эндогенные (генетические) факторы, к которым относятся различ-

ные мутации гена инсулинового рецептора и пострецепторные дефекты, и экзогенные, или факторы среды [26]. Однако истинные причины развития инсулинорезистентности не ясны. В условиях жизни современного человека главенствующую роль приобретают экзогенные факторы, особенно те из них, которые участвуют в развитии абдоминального ожирения, — гиподинамия, психоэмоциональное напряжение и, в особенности, избыточное питание. Исследования последних лет свидетельствуют о том, что переизбыток способствует развитию не только классических компонентов МС, но и ряда других обменных нарушений, которые могут играть значимую роль в патогенезе инсулинорезистентности и МС. В частности, увеличение употребления в пищу фруктозы, прежде всего в виде сахарозы и глюкозо-фруктозных сиропов, по мнению многих ученых, является главной причиной наблюдаемого увеличения частоты метаболических нарушений и эпидемии сердечно-сосудистых заболеваний [15, 24].

Употребление сахарозы или фруктозы (в отличие от употребления эквивалентных количеств крахмала или глюкозы), способствует увеличению веса и развитию основных компонентов МС как в эксперименте на животных [A causal role for uric acid, 2006, p. 627–628], так и в непродолжительных исследованиях на здоровых добровольцах [11]. Биохимическим маркером избыточного употребления фруктозы может, вероятно, послужить повышение концентрации фруктозы в плазме крови натошак.

Цель: изучить распространенность гиперфруктоземии у мужчин с ССЗ и оценить ее диагностическую значимость при МС.

Материалы и методы. Исследованы 123 мужчины с ССЗ в возрасте от 34 до 79 лет, из них 97 — с МС, 25 — без МС. Диагноз МС устанавливался согласно критериям диагностики, предложенным Всероссийским научным обществом кардиологов в 2009 г. [1]. Для выявления нарушений углеводного обмена и определения их типа всем пациентам был проведен стандартный пероральный глюкозотолерантный тест.

Определение концентрации фруктозы в плазме крови проводилось колориметрическим методом на многофункциональном фотометре “Victor2™” (Perkin Elmer, Финляндия) с использованием набора для определения фруктозы Fructose Assay Kit (BioVision, США). В основе метода лежит ферментативное превращение свободной фруктозы в β-глюкозу, которая затем при участии глюкозооксидазы окисляется с образованием перекиси водорода. Далее перекись водорода в присутствии пероксидазы хрена взаимодействует с N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазином, в результате чего образуется окрашенный продукт — резоруфин (λ = 570 нм). Параллельно аналогичным образом, но без добавления в реакционную смесь фруктозоконвертирующего фермента, выполнялось определение глюкозы в образце. Истинное значение концентрации фруктозы в плазме крови

получали путем вычитания второго значения из первого полученного значения. В качестве референтного интервала использовались значения фруктозы менее 0,03 ммоль/л [4].

Определение концентрации в плазме крови глюкозы, мочевой кислоты, общего холестерина, холестерина ЛПВП и триглицеридов проводилось на биохимическом анализаторе “Synchron CX9 Pro” (Beckman Coulter International, США) с использованием оригинальных наборов реагентов. Концентрацию холестерина ЛПНП вычисляли по формуле Friedwald [12]. Определение концентрации НЭЖК в плазме крови проводилось на полуавтоматическом биохимическом анализаторе “BTS330” (BioSystems, Испания) с использованием набора для определения неэтерифицированных жирных кислот NEFA (Randox, Великобритания).

Определение концентрации лептина в плазме крови проводилось на многофункциональном фотометре “Victor2™” (Perkin Elmer, Финляндия) с использованием иммуноферментной тест-системы для определения лептина (“DBC”, Канада). Определение концентрации адипонектина в плазме крови проводилось на многофункциональном фотометре “Victor2™” (Perkin Elmer, Финляндия) с использованием иммуноферментной тест-системы для определения адипонектина (“BioVendor”, Чехия).

Определение содержания гликозилированного гемоглобина в плазме крови проводилось на полуавтоматическом биохимическом анализаторе “BTS330” (BioSystems, Испания) с использованием набора для определения гликозилированного гемоглобина (хроматография/колориметрия) (Biosystems, Испания). Определение концентрации инсулина в плазме крови проводилось на иммунохимическом анализаторе “Access2” (Beckman Coulter International, США) с использованием оригинального набора реагентов. Индекс инсулинорезистентности НОМА-IR рассчитывался по формуле [22]:

$$\text{НОМА IR} = \frac{\text{Инсулин (мЕД / л)} \times \text{Глюкоза (ммоль / л)}}{22,5}$$

где инсулин — инсулин плазмы натошак; глюкоза — глюкоза плазмы натошак.

Среднесуточное артериальное давление определяли с помощью суточного мониторирования АД аппаратом «Кардиотехника-04-АД-3»(м) (Инкарт, Россия). Индекс массы тела вычислялся по формуле Кетле.

Для статистического анализа использовали U-критерий Манна–Уитни и коэффициент корреляции Спирмена. Данные представлены в виде: среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Различия достоверны при p < 0,05.

Результаты. Гиперфруктоземия натошак у пациентов без МС наблюдалась в 50%, у пациентов с МС — в 75% случаев. Минимальная концентрация как у пациентов с МС, так и без МС составила 0,010 ммоль/л,

а максимальная концентрация достигала 0,700 ммоль/л у пациентов без МС и 0,888 ммоль/л у пациентов с МС.

Средняя концентрация фруктозы в плазме крови у пациентов с МС составляла $(0,228 \pm 0,261)$ ммоль/л и в 7 раз превышала нормальные показатели, а у пациентов без МС средняя концентрация фруктозы составила $(0,105 \pm 0,151)$ ммоль/л, что было в 3,5 раза выше верхней границы нормы. Выявленные различия оказались статистически значимыми ($Z = 2,41$; $p = 0,016$) (рис. 1).

У пациентов с МС была выявлена положительная корреляционная связь между базальной (тощачевой) концентрацией фруктозы в плазме крови и уровнем систолического ($r = 0,351$, $p < 0,001$) и диастолического АД ($r = 0,209$, $p = 0,019$), концентрацией глюкозы в плазме крови через 120 мин. после стандартной нагрузки глюкозой ($r = 0,535$, $p = 0,001$), а также с концентрацией мочевины ($r = 0,179$, $p = 0,004$). Наблюдалась отрицательная корреляционная связь между концентрацией фруктозы в плазме крови натощак и концентрацией адипонектина ($r = -0,255$, $p = 0,005$). Достоверных корреляционных связей с другими исследуемыми метаболическими параметрами выявлено не было (табл. 1).

По результатам стандартного перорального глюкозотолерантного теста пациенты с МС были разделены

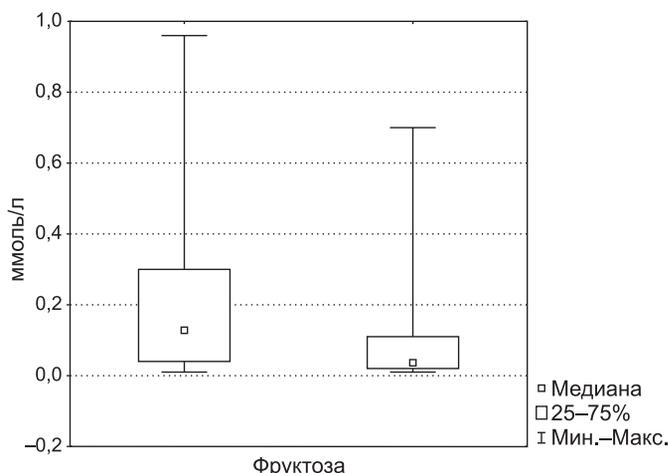


Рис. 1. Средние концентрации фруктозы в плазме крови у пациентов с метаболическим синдромом и без метаболического синдрома

на 3 группы: у пациентов без нарушений углеводного обмена ($n = 44$) средняя концентрация фруктозы в плазме натощак составила $(0,158 \pm 0,183)$ ммоль/л, при наличии нарушенной гликемии натощак или нарушения

Таблица 1. Корреляционные взаимосвязи между концентрацией фруктозы в плазме крови натощак и компонентами метаболического синдрома

Показатель	Коэффициент корреляции, r	Уровень значимости, p
Вес	0,060	0,517
Индекс массы тела	0,043	0,637
Окружность талии	0,146	0,124
Среднесуточное систолическое АД	0,351	< 0,001
Среднесуточное диастолическое АД	0,209	0,019
Мочевая кислота	0,179	0,044
Общий холестерин	-0,007	0,934
Триглицериды	-0,018	0,842
Холестерин ЛПВП	-0,071	0,429
Холестерин ЛПНП	0,074	0,410
Холестерин ЛПОНП	-0,009	0,921
Индекс атерогенности	0,104	0,248
Неэтерифицированные жирные кислоты	-0,004	0,960
Глюкоза натощак	0,127	0,452
Глюкоза через 60 мин. ¹	0,343	0,059
Глюкоза через 120 мин. ¹	0,535	0,001
Инсулин	-0,217	0,126
Индекс НОМА-IR	-0,213	0,137
Гликозилированный гемоглобин	0,063	0,655
Лептин	-0,008	0,927
Адипонектин	-0,255	0,005

¹ После стандартной нагрузки глюкозой (75 г).

толерантности к глюкозе ($n = 28$) — $(0,244 \pm 0,285)$ ммоль/л, а при наличии сахарного диабета 2-го типа ($n = 25$) — $(0,284 \pm 0,316)$ ммоль/л, однако различия между этими показателями оказались статистически незначимыми ($p > 0,05$).

Обсуждение. Сегодня употребление продуктов питания, содержащих столовый сахар (сахарозу) или глюкозо-фруктозные сиропы (фруктозу), наблюдается практически во время каждого приема пищи. Эти подсластители, помимо использования по прямому назначению, также широко применяются в качестве «добавленного сахара» для усиления вкуса, придания выпечке текстуры и цвета, сохранения таких продуктов, как джемы и желе, балансирования кислого вкуса в продуктах, содержащих уксус и помидоры, брожения — процесса, необходимого при производстве алкоголя и выпечки. При этом «добавленный сахар» увеличивает калорийность продукта. В результате анализа данных исследования NHANES III, проведенного в США, было установлено, что среднее употребление фруктозы составляет 54,7 г/день и насчитывает 10,2% от общей калорийности потребляемой пищи. Наибольшее употребление фруктозы наблюдается среди подростков (12–18 лет) — до 72,8 г/день (12,1% от общей калорийности). Самым крупным источником фруктозы являются безалкогольные напитки с сахаром (30%), затем продукты из зерна — хлеб, каши, торты, пироги и закуски (22%), фрукты и фруктовые соки (19%) и сладости (10,8%) [9]. Потребление же фруктозы из натуральных источников — фруктов и овощей, составляет лишь 15 г/день [18]. На основании этого большинство исследователей считают увеличение употребления фруктозы главным этиологическим фактором в развитии эпидемии МС и ССЗ [24].

Этиологическая роль избыточного употребления фруктозы в развитии всех компонентов МС продемонстрирована у грызунов [6]. Однако результаты подобных исследований у человека менее однозначны, отчасти потому, что в них зачастую используются чересчур большие количества фруктозы и, как правило, в течение непродолжительного периода времени. Суждение о долгосрочном влиянии на метаболизм человека избыточного употребления фруктозы базируется, главным образом, на результатах эпидемиологических исследований, в которых данные о количестве употребляемой фруктозы собираются путем анкетирования, поэтому носят субъективный характер. В этой ситуации для более точной оценки влияния фруктозы на обмен веществ предпочтительнее было бы использовать объективный маркер, в роли которого может, по-видимому, выступать повышение базальной (тощачковой) концентрации фруктозы в плазме крови.

Результаты проведенного исследования указывают на значимое превышение нормальных концентраций фруктозы у обследуемых, несмотря на то, что в норме это — довольно редкое явление из-за высокой скорости ее метаболизма, главным образом, в печени. Такое повы-

шение концентрации фруктозы, видимо, обусловлено неспособностью кишечных и печеночных ферментов полностью метаболизировать ее чрезмерные количества, поступающие с пищей. Таким образом, гиперфруктоземия может косвенно свидетельствовать об избыточном употреблении фруктозы.

Стоит отметить, что превышение верхней границы нормы, установленной 2–3 десятилетия назад, наблюдается как у пациентов с МС, так и у пациентов без МС, правда, с меньшей частотой. По-видимому, в последние годы имеет место общая тенденция к увеличению употребления фруктозы в пищу, что диктует необходимость в пересмотре референтных значений для фруктозы.

Значительная вариабельность концентрации фруктозы в плазме крови натощак у обследуемых, по всей вероятности, обусловлена индивидуальными особенностями организма: разной скоростью ее всасывания в кишечнике и разной скоростью метаболизма в печени. Степень же неблагоприятного воздействия фруктозы на метаболизм человека определяется количеством поглощенной фруктозы и индивидуальной переносимостью.

Выявленная достоверная положительная взаимосвязь между исходной (базальной) концентрацией фруктозы натощак и постпрандиальной (через 120 мин. после нагрузки глюкозой) концентрацией глюкозы ($p < 0,05$) может свидетельствовать о неблагоприятном влиянии избыточного употребления фруктозы на гомеостаз глюкозы. Употребление фруктозы традиционно считалось полезным, особенно для больных сахарным диабетом, поскольку ее проникновение в клетку осуществляется без участия инсулина, а продукты питания, содержащие фруктозу, обладают меньшим гликемическим индексом, чем продукты с глюкозой [19]. Поэтому многие врачи считают фруктозу менее «опасным» углеводом, чем глюкоза и сахароза, особенно для людей с нарушениями углеводного обмена, и рекомендуют употреблять ее вместо других простых углеводов. Однако многие пациенты зачастую бесконтрольно употребляют продукты с фруктозой, поскольку не информированы о том, что безопасными для организма считаются лишь небольшие ее количества.

Оказывается, что избыточное поступление в организм фруктозы может способствовать развитию или усугублению имеющегося нарушения толерантности к глюкозе [20], а также развитию и прогрессированию сахарного диабета и его осложнений [27, 18]. Кроме того, избыточное употребление фруктозы способствует повышению концентрации глюкозы и инсулина в плазме крови натощак [8] и развитию инсулинорезистентности [10], однако в проведенном исследовании эти факты не подтвердились. Достоверных корреляционных связей между концентрацией фруктозы в плазме крови и концентрацией глюкозы и инсулина, а также содержанием гликозилированного гемоглобина и индексом инсулинорезистентности НОМА-IR выявлено не было ($p > 0,05$).

Следует отметить, что еще одним возможным механизмом развития инсулинорезистентности на фоне избыточного употребления фруктозы в пищу может быть снижение концентрации адипонектина [15], в пользу чего свидетельствует выявленная достоверная отрицательная корреляционная связь между концентрацией фруктозы и адипонектина в плазме крови ($p < 0,05$).

Несмотря на то, что неблагоприятное влияние избыточных количеств фруктозы, в частности, на уровень триглицеридов в плазме крови описано во многих исследованиях [7], тем не менее, достоверной взаимосвязи между концентрацией фруктозы в плазме крови и показателями липидного обмена в результате проведенного исследования выявлено не было.

Патогенетическая роль фруктозы в развитии артериальной гипертензии наиболее спорна. В большинстве, но далеко не во всех исследованиях на крысах с диабетом и без диабета, получавших пищу с большим содержанием фруктозы, наблюдалось значительное повышение АД и частоты сердечных сокращений [16]. Употребление фруктозы здоровыми молодыми людьми также приводило к быстрому повышению АД [14]. Однако длительное употребление фруктозы у людей, в отличие от крыс, не приводит к повышению АД [13], поэтому на настоящий момент очевидных доказательств в пользу патогенетической роли длительного избыточного употребления фруктозы в развитии гипертензии у человека не существует. В результате проведенного исследования была выявлена достоверная положительная корреляционная связь между концентрацией фруктозы в плазме крови натощак и уровнем среднесуточного систолического и диастолического АД ($p < 0,05$), что косвенно свидетельствует о влиянии избыточных количеств фруктозы на развитие гипертензии.

Фруктоза — углевод, способствующий повышению концентрации мочевой кислоты в плазме крови [6] как за счет повышенного ее образования, так и сниженной скорости ее экскреции [6]. Повышение синтеза мочевой кислоты обусловлено быстрым фосфорилированием в гепатоцитах избыточных количеств поступившей с пищей фруктозы при участии фермента фосфофруктокиназы. В ходе этой реакции образуется фруктозо-1-фосфат, а аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) отдает фосфат и превращается в аденозиндифосфорную кислоту (АДФ), а затем в аденозинмонофосфорную кислоту (АМФ), при этом негативного регуляторного механизма для предотвращения дефицита АТФ нет. Возникший дефицит неорганического фосфата и повышение под влиянием фруктозы активности аденозинмонофосфатдезаминазы стимулируют распад АМФ через ряд промежуточных продуктов до мочевой и молочной кислоты. Более того, лактат является конкурентным ингибитором экскреции уратов, поэтому повышенное образование этого вещества на фоне избыточного употребления фруктозы будет способствовать снижению скорости экскреции мочевой кислоты и развитию гиперурикемии [17].

Фруктозоиндуцированная гиперурикемия способствует развитию эндотелиальной дисфункции и инсулинорезистентности за счет снижения биодоступности NO, на основании чего ряд авторов высказывает предположение, что основным звеном в патогенезе фруктозо-индуцированного метаболического синдрома выступает гиперурикемия [6]. Выявленная в результате проведенного исследования достоверная корреляционная связь между концентрацией фруктозы и концентрацией мочевой кислоты в плазме крови подтверждает наличие тесной биохимической взаимосвязи между этими метаболитами и может свидетельствовать об этиологической роли повышенного употребления фруктозы в развитии гиперурикемии.

Что же касается развития ожирения, то данные эпидемиологических исследований свидетельствуют о том, что увеличение употребления фруктозы в составе сахарозы и глюкозо-фруктозных сиропов может быть причиной наблюдаемой в настоящее время эпидемии ожирения [28]. Однако данные экспериментальных исследований, посвященных этой теме, противоречивы. Так, например, в ряде исследований продемонстрировано, что употребление фруктозы способствовало увеличению массы висцерального жира и развитию ожирения [15, 8]. С другой стороны, результаты недавно проведенного мета-анализа свидетельствуют о том, что употребление фруктозы в дозе менее 100 г/день значимого влияния на массу тела не оказывает [21]. Это не противоречит полученным в ходе проведенного исследования результатам, свидетельствующим об отсутствии достоверных корреляционных связей между базальной концентрацией фруктозы в плазме крови и массой тела, индексом массы тела и окружностью талии.

Выводы

1. В связи с тем, что у пациентов с МС гиперфруктоземия встречается чаще, а концентрации фруктозы в плазме крови достоверно выше, чем у пациентов без этого синдрома ($p < 0,05$), а также с учетом корреляционных связей между концентрацией фруктозы в плазме крови и некоторыми компонентами метаболического синдрома (такими как уровень АД, постпрандиальные концентрации глюкозы, концентрация мочевой кислоты и адипонектина), гиперфруктоземия может рассматриваться в качестве дополнительного биохимического маркера МС.
2. Учитывая высокий уровень потребления фруктозы в пищу современными людьми целесообразно пересмотреть референтные интервалы для концентрации фруктозы в плазме крови натощак, для чего необходимы дополнительные исследования с вовлечением условно-здоровых людей.

Литература

1. Диагностика и лечение метаболического синдрома: Российские рекомендации (второй пересмотр) / ВНОК, комитет экспер-

- тов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2009. — 8, № 6, Приложение 2. — 29 с.
2. Информационный бюллетень № 312 [электронный ресурс] / Центр СМИ, ВОЗ. — Электрон. данные. — январь 2011. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/ru/>, свободный. — Загл. с экрана.
3. Информационный бюллетень № 317 [электронный ресурс] / Центр СМИ, ВОЗ. — Электрон. данные. — январь 2011. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/ru/>, свободный. — Загл. с экрана.
4. Хмелевский Ю.В. Основные биохимические константы человека в норме и при патологии / Ю.В. Хмелевский, О.К. Усатенко. — К.: Здоров'я, 1987. — 160 с.
5. A 4-wk high fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans / K.A. Lê [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2006. — Vol. 84, N 6. — P. 1374–1379.
6. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome / T. Nakagawa [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* — 2006. — Vol. 290, N 3. — P. F625–631.
7. Basciano H. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia / H. Basciano, L. Federico, K. Adeli // *Nutr. Metab. (Lond)*. — 2005. — Vol. 2, N 1. — P. 5.
8. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans / K.L. Stanhope [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2009. — Vol. 119, N 5. — P. 1322–1334.
9. Dietary fructose consumption among US children and adults: The Third National Health and Nutrition Examination Survey / M.B. Vos [et al.] // *Medscape J. Med.* — 2008. — Vol. 10, N 7. — P. 160. [электронный ресурс: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2525476/?tool=pubmed>]
10. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men / D. Faeh [et al.] // *Diabetes*. — 2005. — Vol. 54. — P. 1907–1913.
11. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses / K.L. Teff [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2009. — Vol. 94, N 5. — P. 1562–1569.
12. Forman J. Fructose and vitamin C intake do not influence risk for developing hypertension / J. Forman, H. Choi, G. Curhan // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2009. — Vol. 20, N 4. — P. 863–871.
13. Friedwald W.T. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use the preparative ultracentrifuge / W.T. Friedwald, R.I. Levy, D.S. Fredrickson // *Clin. Chem.* — 1972. — Vol. 18, N 6. — P. 499–502.
14. Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans / C.M. Brown, A.G. Dulloo, G. Yepuri, J.-P. Montani // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2008. — Vol. 294, N 3. — P. R730–R737.
15. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome / S.S. Elliott [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2002. — Vol. 76, N 5. — P. 911–922.
16. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats / L.G. Sanchez-Lozada [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2007. — Vol. 292, N 1. — P. F423–F429.
17. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose / J. Hallfrisch // *J. Faseb.* — 1990. — Vol. 4, N 9. — P. 2652–2660.
18. Gaby A.R. Adverse Effects of Dietary Fructose / A.R. Gaby // *Altern. Med. Rev.* — 2005. — Vol. 10, N 4. — P. 294–306.
19. Gerrits P.M. Diabetes and fructose metabolism / P.M. Gerrits, E. Tsalikian // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1993. — Vol. 58, N 5 (suppl.). — P. 796S–799S.
20. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats / S.R. Blakely, J. Hallfrisch, S. Reiser, E.S. Prather // *J. Nutr.* — 1981. — Vol. 111, N 2. — P. 307–314.
21. Livesey G. Fructose consumption and consequences for glycation, plasma triacylglycerol, and body weight: meta-analyses and meta-regression models of intervention studies / G. Livesey, R. Taylor // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2008. — Vol. 88, N 5. — P. 1419–1437.
22. Matthews D.R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man / D.R. Matthews [et al.] // *Diabetologia*. — 1985. — Vol. 28. — P. 412–419.
23. Metabolic syndrome prevalence in Russia: Preliminary results of a cross-sectional population study / M.N. Mamedov [et al.] // *Diab. Vasc. Dis. Res.* — 2007. — Vol. 4 (Suppl. 1). — P. S46–S47.
24. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease / R.J. Johnson [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2007. — Vol. 86, N 4. — P. 899–906.
25. Reaven G.M. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition / G.M. Reaven // *Annu. Rev. Med.* — 1993. — Vol. 44, N 2. — P. 121–131.
26. Roche H.M. The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics // H.M. Roche, C. Phillips, M.J. Gibney // *Proc. Nutr. Soc.* — 2005. — Vol. 64, N 3. — P. 371–377.
27. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women / M.B. Schulze [et al.] // *JAMA* 2004. — Vol. 292, N 8. — P. 927–934.
28. Tappy L. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity / L. Tappy, K.A. Le // *Physiol. Rev.* — 2010. — Vol. 90, N 1. — P. 23–46.
29. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men / H.M. Lakka [et al.] // *JAMA*. — 2002. — Vol. 288, N 21. — P. 2709–2716.

АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ЧЕЛОВЕКА IN VIVO И IN VITRO В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

М.В. ФИЛАТОВ, С.Б. ЛАНДА, Т.А. ШТАМ, Р.А. КОВАЛЕВ

Учреждение РАН «Петербургский институт ядерной физики»

Резюме. Экзосомы, являющиеся объектом данного исследования, представляют собой РНК-содержащие липо-протеиновые наночастицы, обеспечивающие удаление из клеток ненужных белков и избыточного холестерина, а также участвующие в процессах взаимодействия с поверхностью других клеток. Возросший в последнее время интерес к экзосомам связан, большей частью, с их участием в межклеточных взаимодействиях. Предполагается, что такой тип межклеточной передачи информации может обеспечиваться не только экзосомальными белками, но и молекулами РНК и сигнальными липидами, которые способны влиять на реципиентные клетки.

В экзосомах обнаружено более 2000 разных белков, около 900 РНК и 274 микро-РНК и ряд сигнальных липидов. Сравнительный анализ состава экзосом в норме и патологии может стать основой для диагностических тестов ряда заболеваний, в частности, для раннего обнаружения злокачественных новообразований.

Для характеристики экзосом используются различные комбинации традиционных биохимических и биофизических методов. Проведенный нами анализ экспериментальных приемов и методов исследования экзосом показал, что для решения поставленных в проекте задач сочетание иммунологических методов с методами масс-спектрометрии является оптимальным. Дополнительно мы предлагаем использовать лазерную корреляционную спектроскопию и атомную силовую микроскопию.

Ключевые слова: клеточная биология, молекулярная биология, экзосомы, протеомный подход, межклеточная сигнализация, клеточная трансформация, канцерогенез.

ANALYSIS OF EXOSOMES FROM CELL CULTURES AND HUMAN BIOLOGICAL FLUIDS IN VIVO AND IN VITRO UNDER NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

M.V. FILATOV, S.B. LANDA, T.A. SHTAM, R.A. KOVALEV

St. Petersburg Institute of Nuclear Physics, Russian Academy of Sciences

Summary. The study concerned exosomes, RNA-containing lipoprotein nanoparticles that mediate elimination of excessive proteins and cholesterol from the cells, along with participation in surface-to-surface interactions with other cells. Recently, an increasing interest to exosomes is connected, mostly, with their potential role in intracellular signaling. This mode of intercellular information transfer may be mediated not only by exosomal proteins, as well as by RNA molecules and signal lipids which are able to influence the target cells.

A total of 2000 various proteins were revealed in exosomes, as well as about 900 RNAs, 274 micro-RNAs, and several signal lipids. Comparative compositional analysis of exosomes in normal and transformed cells may serve as basis for development of diagnostic tests in different disorders, including early detection of malignant diseases.

Different combinations of biochemical and biophysical methods are used for characterization of exosomes. A set of analytical experimental approaches and techniques of studying the exosomes has revealed that a combination of immunological methods and mass-spectrometry seems to be optimal. In addition, we propose application of correlation spectroscopy and atomic-force microscopy to these purposes.

Key words: cell biology, molecular biology, exosomes, proteomic analysis, intracellular signaling, cell transformation, carcinogenesis.

Данные для корреспонденции:

Ланда Сергей Борисович, к. б. н., с. н. с.

Учреждение РАН «Петербургский институт ядерной физики», г. Гатчина,

тел.: (905) 229-32-71, e-mail: landa@gmail.com

Список сокращений

ЛКС (QELS, DLS)	— лазерная корреляционная спектроскопия (Quasi-elastic/Dynamic Light Scattering)
МВТ (MVB)	— мультивезикулярные тела (multivesicular bodies)
мРНК (mRNA)	— матричная РНК
миРНК (miRNA)	— микроРНК
АВ	— апоптотические тела или пузыри (apoptotic blebs)
ВМР	— бис(моноацилглицеро)фосфат (bis(monooacylglycero)phosphate)
ЕрСАМ	— эпителиально-клеточный адгезионный белок
ESCRT	— необходимый для транспорта эндосомальный сортировочный комплекс (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport)
ICAM-1	— межклеточные адгезионные молекулы 1-го типа
HLA-ABC	— главный комплекс гистосовместимости человека 1-го типа
LBPA	— лиозобисфосфатидная кислота (lysobisphosphatidic acid)
LFA-1	— антиген, ассоциированный с лейкоцитарными функциями 1-го типа
SMV	— микропузырьки, теряющиеся с поверхности клеток (shedding microvesicles)

До последнего времени считалось, что межклеточные и межтканевые взаимодействия осуществляются главным образом через растворимые молекулярные лиганды (гормоны, цитокины, ростовые факторы и т. д.), которые узнаются клеточными рецепторами. Недавно, однако, была экспериментально подтверждена возможность принципиально другого пути влияния клеток на своих удаленных партнеров. Было обнаружено, что самые разные клетки способны секретировать микропузырьки, содержащие биологически активные белки наряду со специфическими мРНК и миРНК, и таким образом оказывать влияние на клетки других тканей [1]. Это вызвало повышенный интерес к различным микрочастицам, продуцируемым клетками, и выявлению их потенциальной роли. Номенклатура этих ограниченных мембраной малых образований остается пока несколько противоречивой. Используемые термины включают: экзосомы, микрочастицы, наночастицы, микровезикулы, теряющиеся, или слущивающиеся (shedding) микровезикулы, эктосомы, экзосомоподобные пузырьки, апоптотические тела, промининосомы, простасомы, дексосомы, тексосомы, эпидидимосомы, агросомы, онкосомы [2]. Неразбериха с терминологией в ряде случаев может приводить к трудности интерпретации результатов, касающихся свойств и роли продуцируемых клетками микрообразований различной природы.

Большинство эукариотических клеток способно продуцировать субмикронного размера микрочастицы. Для соматических клеток животных это часто сопряжено с их

активацией или апоптозом. Первые описания этого явления относятся к шестидесятым годам XX века и связаны с процессом активации тромбоцитов [3]. В ходе исследования оказалось, что продуцируемые тромбоцитами микрочастицы не только играют роль в продукции тромбина, но и действуют как межклеточные активаторы на другие тромбоциты и клетки эндотелия [4]. В конце прошлого тысячелетия микровезикулы были описаны в нормальной плазме крови человека и различных тканях [5, 6, 7, 8]. Была также обнаружена продукция микрочастиц злокачественно трансформированными клетками [9, 10]. В последнее десятилетие число публикаций, посвященных роли микровезикул, неуклонно растет, распространяясь на такие различные области как онкология, кардиоваскулярная биология, ангиогенез, регуляция иммунного ответа, воспаление и различные типы межклеточной активации.

Исследование выделяемых клетками в окружающую среду субмикронного размера частиц представляет собой относительно новую область науки, позволяющую лучше понять механизмы межклеточного взаимодействия. Есть серьезные основания полагать, что количественная и качественная характеристика микрочастиц, продуцируемых клетками различных тканей, в норме и при патологии может дать существенную диагностическую и прогностическую информацию и служить биомаркером для различных заболеваний от онкологии до сердечно-сосудистых патологий [11].

Наибольшее внимание привлекает один из видов микрочастиц, получивший название «экзосомы». Этот термин используется для обозначения везикул размером менее 100 нм, происходящих из внутриклеточных мультивезикулярных тел (МВТ, MVB) [12] (рис. 1). Во избежание путаницы нужно отметить, что термин «экзосомы» в настоящее время используется также в другом смысле: для обозначения мультибелковых комплексов, способных деградировать различные типы РНК в клетках [13].

Считается, что молекулярный состав экзосом отражает их происхождение из эндосом. Однако в дополне-

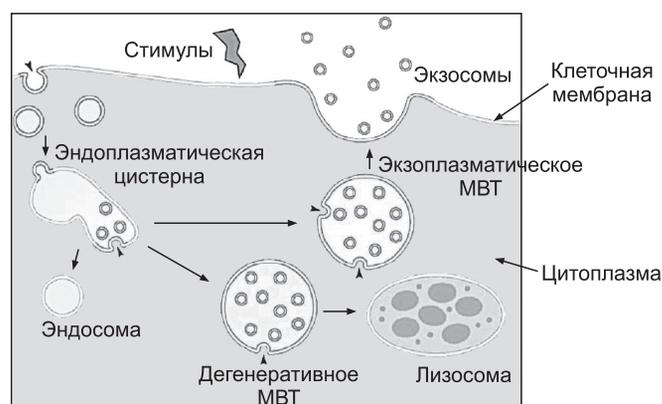


Рис. 1. Возможный механизм образования и секреции экзосом [12]

ние к обычному набору мембранных и цитозольных молекул экзосомы несут уникальные наборы белков, сопряженных с выполнением функций, свойственных конкретному типу клеток. Экзосомная секреция изначально рассматривалась как функция удаления избыточных для клетки белков и других компонентов. Однако возрастающий объем экспериментальных данных указывает, что экзосомы могут представлять собой способ межклеточной коммуникации [14]. Общепринято, что мультивезикулярные тела (МВТ) и содержащиеся в их просветах микровезикулы вовлечены в секвестрацию белков, предназначенных для деградации в лизосомах [15]. Однако альтернативная судьба МВТ может состоять в их слиянии с плазматической мембраной, что приводит к освобождению из клетки микровезикул размером менее 100 нм, которые и представляют собой экзосомы [16, 17]. Экзосомы формируются внутриклеточно, когда сегмент клеточной мембраны спонтанно инвагинирует и эндцитируется. Поглощенный сегмент разрушается на мелкие везикулы, представляющие собой будущие экзосомы, обнаруживаемые во множестве внутри поздних эндосом. Если происходит слияние эндосом с клеточной мембраной, то содержащиеся в них предшественники экзосом освобождаются во внеклеточную среду. Освобожденные экзосомы, по существу, представляют собой липидные рафты (микродомены липидного бислоя клеточной мембраны, обогащенный холестерином, сфинголипидами и насыщенными фосфолипидами) с погруженными в них белками, свойственными клеточным мембранам.

Первоначально экзосомы были описаны как эндосомальные частицы, экскретируемые при эритроцитарной дифференцировке ретикулоцитов [18, 19]. В последующем было обнаружено, что везикулы с характерными признаками экзосом продуцируются самыми различными типами клеток, таких как В-лимфоциты [20], дендритные клетки [21], тучные клетки [22], Т-лимфоциты [23], тромбоциты [24], клетки кишечного эпителия [25], Шванновские клетки [26], нейроны [27], клетки злокачественных опухолей [28]. Кроме того, экзосомы были обнаружены во всех физиологических жидкостях: плазме крови [29, 30], моче [31, 32, 33, 34], злокачественном плевральном выпоте [35], бронхиальной промывочной жидкости [36], глазной жидкости [37], семенной жидкости [38, 39], амниотической жидкости [40], слюне [41, 42], женском молоке [43], сыворотке беременных [44], синовиальной жидкости [45].

Считается, что при образовании экзосом происходит сортировка белков и липидов, в результате в них скапливается специфический набор биологических молекул. Распространенным мнением является, что процесс сортировки и формирования предшественников экзосом требует узнавания содержащихся в них белков серий мультитебелковых комплексов, формирующих ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport, необходимый для транспорта эндосомальный сортиро-

вочный комплекс) молекулярную машину. ESCRT вовлечен в процесс биогенеза и деградации МВТ, сопряженных с убиквитилированием белков [46, 47, 48]. Трехмерные структурные исследования ключевых связей между компонентами ESCRT, фосфолипидами и убиквитином дают исходную информацию, позволяющую приблизиться к пониманию механизмов образования МВТ и их транспорта [49]. Однако недавние исследования показывают, что машина, которая управляет формированием предшественников экзосом в мультивезикулярном компартменте, оказалась более разнородной, чем предварительно считалось. Хотя ESCRT белки, безусловно, требуются для того, чтобы направлять слияние с лизосомами и, соответственно, запускать деградацию содержимого мультивезикулярных тел, их роль в формировании везикул, которые в дальнейшем будут секретироваться в виде экзосом, остается менее ясной. Несмотря на то, что обнаружение в экзосомах различных компонентов ESCRT и убиквитилированных белков [50, 51, 52, 53] поддерживает гипотезу о роли ESCRT в сортировке экзосомального содержимого, более поздние работы продемонстрировали, что некоторые экзосомальные белки освобождаются из клетки путем, не зависящим от ESCRT [54, 55]. Один из этих путей требует церамидов (липидов, составленных из сфингозина и жирной кислоты) [56, 57]. Церамиды имеют много структурных и физических свойств, которые могут облегчать биогенез везикул [58]. Они могут вызывать спонтанно возникающую негативную кривизну мембранного бислоя, способствующую мембранной инвагинации. Белки, такие как тетраспанины, могут скапливаться в этих доменах. Также возможно, что тетраспанины являются частью сортировочной системы, так как они формируют олигомеры, взаимодействуя с другими тетраспанинами, а также с различными трансмембранными и цитозольными белками [59]. Исследования механизмов формирования экзосом находятся сегодня еще на ранней стадии. Агрегация и сортировка содержимого ограниченных мембраной вакуолярных образований в эндосомах, кажется, является движущей силой для нагрузки и отпочковывания везикул внутри мультивезикулярных тел. Вероятным кажется предположение, что высокоупорядоченная олигомеризация, в частности таких характерных для экзосом белков как тетраспанины, может быть механизмом, определяющим сортировку содержимого экзосом и их освобождения. Причем этот процесс, вероятно, может обходиться без ESCRT машины. Существует растущее число аргументов за то, что агрегирование содержимого экзосом является важным фактором их образования. Так, вызванная специфическими антителами агрегация трансфериновых рецепторов на ретикулоцитах, или главных комплексов гистосовместимости на лимфоцитах, или CD43 белков на Т-клеточной перевиваемой линии Jurkat повышает их секрецию в составе экзосом [60, 61]. Более того, добавление гомоолигомеризующихся доменов к ацилирован-

ным репортерным белкам усиливает их выброс из клеток в составе экзосом [62]. Олигомеризация экзосомальных компонентов, видимо, ведет к сборке и стабилизации экзосомальных мембранных доменов. Если такой рост превышает критические размеры, возможно, запускается выпоковывание и образование микровезикул [63]. Нужно также иметь в виду, что экзосомы обогащены липидами, свойственными мембранным рафтам, и одной из ведущих сил в образовании экзосом может быть линейное натяжение на границе между упорядоченными и неупорядоченными липидными доменами, что способствует отпочковыванию. При этом функция ESCRT машины не кажется необходимой. Существуют некоторые примеры белков, которые могут использовать этот путь для избирательной загрузки в везикулярные предшественники экзосом [64].

Различные типы клеток используют секрецию экзосом для решения разных задач. Экзосомы, выбрасываемые ретикулоцитами, освобождают клетки от ставших ненужными белков, таким образом принимая участие в дифференцировке в эритроциты. Наряду с этой очистительной функцией, наличие на экзосомах белков со специфическими адгезионными свойствами позволяет приписывать им другую роль. Фенотипический и функциональный анализ экзосом, происходящих из клеток иммунной системы, поддерживает идею о том, что они вносят вклад в межклеточные взаимодействия. Апоикальная и базо-латеральная секреция экзосом эпителиальными клетками используется не только для элиминации из клеток нежелательных молекул, но и для передачи антигенного материала к иммунной системе слизистой оболочки.

В связи с предполагаемыми специфическими функциями экзосом и других микровезикул, продуцируемых клетками, высказывается даже мнение, что их можно рассматривать как внеклеточные органеллы, которые выполняют разнообразные биологические функции [65].

Физические свойства экзосом позволяют отличать их от мембранных образований другого происхождения. Так, их плавучая плотность 1,10–1,21 г на мл значительно разнится с таковой других везикулярных структур (как правило более 1,23 г на мл). Это дает возможность избирательно выделять экзосомы с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [66].

Существует значительное разнообразие микровезикул, продуцируемых клетками. На сегодняшний день на основании различий в способе происхождения мембранных везикул, помимо экзосом, в качестве отдельных образований принято выделять микропузырьки, теряющиеся с поверхности клеток (shedding microvesicles — SMV), и апоптотические тела, или пузырьки (apoptotic blebs — AB) [65]. Первые из них представляют собой большие (более 100 нм в диаметре) мембранные везикулы, которые происходят из поверхностных мембран различных клеток [67]. После наружного выпячивания плазматической мембраны образуется перетяжка и про-

исходит открепление образовавшегося цитоплазматического выроста с образованием независимой везикулы [70]. В регулировании этого процесса участвует целый ряд ферментов, таких как: калпаин, флиппаза, флоппаза, скрамблаза и гельсолин (calpain, flippase, floppase, scramblase and gelsolin) [71]. Апоптотические тела, в соответствии с их названием, происходят из апоптотических, или умирающих клеток. Обычно они образуются на поздних стадиях. Апоптотические тела также имеют значительно больший размер, чем экзосомы (50–500 нм), и, в отличие от них, гетерогенны по форме и размеру [73]. Биологические жидкости часто содержат смесь экзосом, SMV и AB [74]. В связи с этим для изучения экзосом, их состава, структуры и биохимических свойств необходимо использовать разнообразные стратегии выделения, позволяющие избежать примесей других микровезикулярных структур [75].

Основные характеристики свойств различных классов продуцируемых клетками микровезикул могут быть суммированы следующим образом:

Экзосомы:

- Размер (диаметр): 20–100 нм.
- Плавучая плотность (скоростное зональное центрифугирование): 1,10–1,19 г/мл.
- Морфология: чашеобразные (при электронной микроскопии с негативным окрашиванием) или округлые частицы (при наблюдении в криоэлектронный микроскоп).
- Липидный состав: лиозобисфосфатидная кислота (lysobisphosphatidic acid — LBPA), низкое содержание фосфатидилсерина, холестерин, церамиды, сфингомиелин.
- Характерные белки: Alix, TSG101, HSC70, CD63, CD81, CD9.
- Место происхождения: мультивезикулярные тела (МВТ).
- Механизм освобождения из клетки: экзоцитоз МВТ
- Состав: белки, мРНК, мРНК.

Микропузырьки, теряющиеся с поверхности клеток (shedding microvesicles — SMV):

- Размер (диаметр): 100–1000 нм.
- Плавучая плотность (скоростное зональное центрифугирование): неизвестна.
- Морфология: различной формы.
- Липидный состав: высокое содержание фосфатидилсерина, холестерин.
- Характерные белки: селектины, интегрины, CD40, металлопротеазы.
- Место происхождения: плазматическая мембрана.
- Механизм освобождения из клетки: отпочковывание от плазматической мембраны.
- Состав: белки, мРНК, мРНК.

Апоптотические тела (apoptotic blebs — AB):

- Размер (диаметр): 50–500 нм.

- Плавающая плотность (скоростное зональное центрифугирование): 1,16–1,28 г/мл.
- Морфология: гетерогенная.
- Липидный состав: высокое содержание фосфатидилсерина.
- Характерные белки: гистоны.
- Механизм освобождения из клетки: клеточная гибель и сжатие.
- Состав: белки, ДНК, миРНК, мРНК.

Белковый состав экзосом из разнообразных клеточных типов и различных биологических жидкостей анализировался набором методов, включающим: масс-спектрометрию, Вестерн-блоттинг, флуоресцентную цитометрию и иммуоэлектронную микроскопию. Протеомные исследования выполнены для экзосом из дендритных клеток [76], из клеток меланомы [77], из мочи [78, 79], микроглии [80], тучных клеток [81], клеток рака толстой кишки [82, 83], мезотелиальных клеток [84], раков мозга [85], олигодендроцитов [86], трахеобронхиальных клеток [87], гепатоцитов [88], нейроглиальных клеток [89], плазмы [90], молока [91], клеток рака молочной железы [92], слюнной железы [93], эмбриональных фибробластов [94, 95]. База данных о содержащихся в экзосомах белках и РНК представлена на Интернет-сайте ExoCarta (<http://exocarta.ludwig.edu.au/#>) [95]. ExoCarta составлена на основе 75

предварительных протеомных и транскриптомных исследований. Всего 2624 белка, 901 мРНК и 274 миРНК из 4 различных организмов представлены в этом собрании (рис. 2). Некоторые из этих молекул могут рассматриваться как надежные экзосомные маркеры, позволяющие идентифицировать присутствие экзосом в биологических препаратах. Белковый состав варьирует в зависимости от источника получения и клеточного типа, продуцирующего экзосомы. Вместе с тем существует консервативный набор белков, относительно мало зависящий от источника их происхождения, включающий такие белки как: Alix, TSG101, клатрин, HSP70 и тетраспанины CD63, CD81 и CD9. Alix был выявлен в 68% исследований, TSG101 и клатрин в 37%. Белок теплового шока HSP70 обнаружен в экзосомах в 89% протеомных исследований.

Класс цитозольных белков, часто встречающихся в экзосомах, представлен Rabs семейством малых ГТФаз, регулирующих взаимодействие экзосом и слияние мембран [96]. Исследования с использованием меченных зеленым белком Rab ГТФаз продемонстрировали существование механизмов избирательной сегрегации этих белков в мембранные домены с различными функциями [97]. ExoCarta представляет 40 Rab белков, выявляемых в разных работах, посвященных протеому экзосом. Экзосомы также богаты аннексинами (аннексины I, II, IV, V, VI, VII и X1), белками, способствующими транспор-

ту и слиянию мембран [98]. Особый интерес представляет наличие в большинстве экзосом тетраспанинов (CD63, CD81 and CD9), мембранных белков, участвующих в подавлении и провоцировании метастазирования, что происходит благодаря их способности связывать различные молекулы, которые они рекрутируют в специальные мембранные микродомены. Транспонины в избытке присутствуют в экзосомах, происходящих из злокачественно трансформированных клеток, принимающих участие в межклеточных взаимодействиях, что позволяет предполагать участие индивидуальных тетраспанинов в провоцировании или подавлении способности к метастазированию [99]. Совсем недавно была описана связь роли тетраспанинов в формировании экзосом и подавлении прогресса опухолей. Обнаружилось, что повышенная экспрессия тетраспанинов CD9 и CD82 редуцирует Wnt сигнальный путь, существенный для роста многих опухолей. Происходит это путем активации выброса из клеток важного компонента этого сигнального пути: β -катенина. Осуществляется это путем включения его в секретируемые экзосомы [100]. Это указывает на то, что экзосомы и тетраспанины CD9 и CD82 в данном случае представляют собой альтернативный механизм регулирования уровня β -катенина, Wnt сигнального пути и прогрессии опухолей.

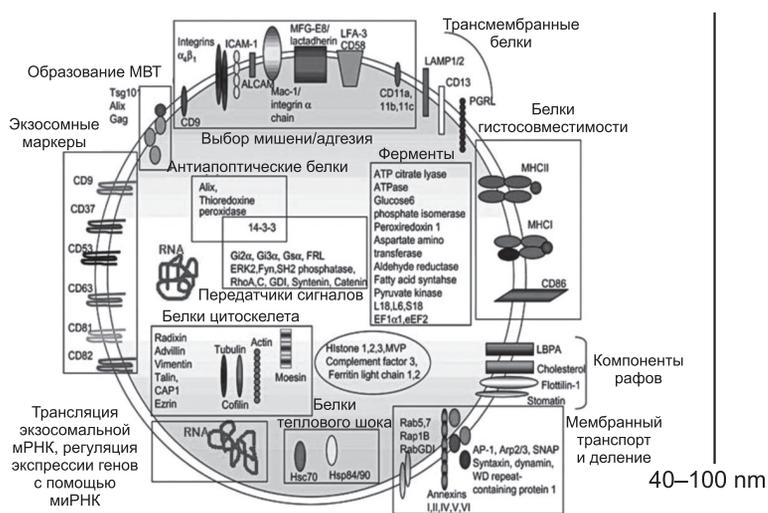


Рис. 2. Состав экзосом, по [95]

Помимо белкового, липидный состав экзосом также является характеристикой клеточного происхождения последних и играет важную роль в их биогенезе [101]. Липидный состав был изучен в экзосомах, происходящих из дендритных и тучных клеток [102], ретикулоцитов [103], В-лимфоцитов [104]. Экзосомы, как и внутриклеточные мембраны мультивезикулярных тел, обогащены лиосбисфосфатидной кислотой (lysobisphosphatidic acid), которая играет важную роль в биогенезе первых [105]. Характерной чертой экзосом является их обогащенность липидами, присущими мембранным

рафтам, такими как холестерин, сфинголипиды, керамиды и глицерофосфолипиды с длинными и насыщенными жирными кислотами [106, 107, 108].

Взаимодействие экзосом с клетками-мишенями может осуществляться двумя разными способами. Во-первых, экзосомальные мембранные белки могут взаимодействовать с рецепторными молекулами на поверхности клеток-мишеней, либо оставаясь в составе экзосом, либо после расщепления протеазами и превращения в растворимый фрагмент, являющийся лигандом для соответствующих рецепторов. В этом контексте интересно отметить, что некоторые экзосомные мембранные белки не обнаруживаются на поверхности клеток, из которых экзосомы происходят (таким, например является белок LAMP-2 — один из важнейших гликопротеинов лизосомальной мембраны. Наличие этих белков считается структурным определением лизосом как внутриклеточных органелл. LAMP2 защищает лизосомальную мембрану от протеолитических ферментов лизосомы) [109]. Во-вторых, экзосомы могут сливаться с мембраной клеток-мишеней, что приводит к неселективной передаче белков и РНК, содержащихся в экзосоме, реципиентной клетке. Кроме того, такое слияние может изменить некоторые мембранные характеристики клетки за счет включения в ее мембрану несвойственных ей липидов [110] и белков [111, 112].



Рис. 3. Экзосомы как новый тип терапевтических вакцин, по [125]

Экзосомы, продуцируемые антиген-представляющими клетками иммунной системы, рассматриваются как возможный источник нового поколения терапевтических вакцин, пригодных для клинической иммунотерапии (рис. 3). Экзосомы, полученные из дендритных

клеток, обогащены компонентами, необходимыми для адекватной презентации антигена, включая главные комплексы гистосовместимости 1-го и 2-го типа и вспомогательные сигнальные молекулы: CD80, CD86. Есть все основания считать, что они могут эффективно выполнять функцию представления антигена лимфоцитам и осуществлять антиген-специфичную активацию Т-лимфоцитов [125]. Предварительные клинические исследования по использованию экзосом для иммунотерапии меланом и раков легкого дали положительные результаты [126, 127, 128, 129, 130, 131].

Появляются указания на то, что экзосомы могут быть использованы для диагностики онкологических заболеваний. Недавно экзосомы, содержащие EpCAM (эпителиально-клеточный адгезионный белок, экспрессирующийся почти на всех карциномах), были выделены из сыворотки пациентов с различными стадиями рака яичников. Было показано, что количество продуцируемых экзосом в случае данного заболевания резко возрастает уже на самых ранних стадиях (рис. 4). Количество экзосом определяли по концентрации белка в осадке после центрифугирования.

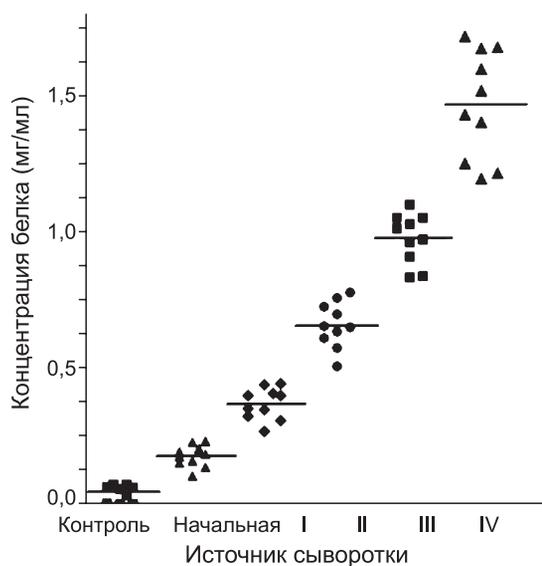


Рис. 4. Содержание экзосом, выделенных из сыворотки пациентов с раком яичников (n = 10) на различных стадиях заболевания, по [132]

Оценка профиля мРНК, содержащейся в экзосомах, указывает на возможность использовать их в диагностических целях у людей, не имеющих каких-либо иных симптомов заболевания [132]. Несущие на своей поверхности галектин 9 экзосомы были найдены в плазме пациентов с назофарингиальными карциномами [133]. Экзосомы, несущие эпителиальные адгезионные молекулы, были обнаружены в плазме пациентов с раком легких. При этом содержание экзосом в крови возрастало по мере прогресса болезни [134]. Биомаркеры рака простаты, PCA-3 и TMPRSS2: ERG были выявлены в эк-

зосомах, выделенных из мочи больных раком простаты [135]. Возрастание уровня происходящих из злокачественных клеток экзосом у онкологических больных указывает на то, что экзосомы могут быть богатым источником диагностически значимых биомаркеров [136].

Фактом, который привлекает особое внимание к экзосомам в последнее время, является то, что экзосомы различного происхождения содержат молекулы матричной РНК и микроРНК, которые, с их помощью, могут передаваться между клетками. Эту РНК обозначают как «экзосомная челночная РНК» (“exosomal shuttle RNA”). Более того, будучи передана реципиентным клеткам, эта РНК может сообщать им новые функциональные свойства. Профиль экзосомных микроРНК дает возможность создавать неинвазивные диагностические тесты для различных заболеваний [137]. Есть основания полагать, что РНК не случайно захватывается экзосомами, просто по причине ее нахождения в цитоплазме, а специфически упаковывается в экзосомы активным сортирующим механизмом. Так, только часть транскриптов, представленных в клетке, может быть обнаружена в экзосомах. Интересно, что ESCRT-II субъединица «эндосомального сортировочного комплекса, требующегося для транспорта» способна специфически связывать мРНК, что может указывать на вовлечение ESCRT молекулярной машины в сортировку РНК в экзосомы [138].

Наличие в экзосомах большого разнообразия белковых молекул и РНК неизбежно поднимает вопрос об их потенциальной гетерогенности, которая не может быть выявлена существующими методами. Накапливаются данные, что мультивезикулярные тела, порождающие экзосомы, более разнородны, чем предполагается (рис. 1). Во-первых, несомненно, есть МВТ, которые направлены на слияние с лизосомами, тогда как судьба других заключается в слиянии с наружной плазматической мембраной с освобождением содержащихся в них экзосом в окружающую среду. Сегодня, однако, нет возможности различать эти варианты или состояния МВТ, иначе как по совершившемуся результату слияния. Первые доказательства существования различных подклассов МВТ, обладающих различной судьбой, приходят из исследований, использующих перфринголизин О (perfringolysin O) для мечения холестерина. Оказалось, что содержащиеся и не содержащиеся холестерин МВТ сосуществуют в В-лимфоцитах. При этом содержащиеся холестерин преимущественно сливаются с клеточной поверхностью и выбрасывают экзосомы [139]. Другой пример связан с тем, что эпидермальный фактор роста и его рецепторы транспортируются через субпопуляцию МВТ, не содержащую липида бис(моноацилглицеро)фосфат/лизобисфосфатидную кислоту (bis(monoacylglycerol) phosphate/lysobisphosphatidic acid – BMP/LBPA) [140]. Однако такие везикулы, видимо, не играют роли в образовании экзосом, так как масс-спектрометрический анализ не обнаружил этого липида в составе экзосом В-лимфоцитов [141].

Существуют ситуации, при которых направление слияния МВТ может быть изменено. Так, при условиях, вызывающих аутофагию, секреция экзосом прекращается и стимулируется слияние МВТ с аутофагосомными вакуолями [142]. Экзосомы могут принимать участие в различных физиологических и патологических процессах [143, 144, 145]. Для некоторых клеток секреция экзосом представляет собой способ удаления нежелательных белков. Этот способ может иметь преимущества, если клетки обладают слабым деградирующим потенциалом или локализируются вблизи дренирующих систем, таких как почечные каналы или кишка [146]. В различных клетках экзосомы могут выполнять различные функции. Так, активация тромбоцитов ведет к секреции экзосом, которые регулируют процесс коагуляции. В этом случае они усиливают физиологический ответ, предоставляя большую поверхность для реакции. Однако наиболее значимая функция экзосом связана с регулированием межклеточных взаимодействий. Особенности организации экзосом, в частности наличие набора адгезионных молекул (рис. 2), делает их способными специфически взаимодействовать с реципиентными клетками. Особенно это характерно для клеток иммунной системы [147]. Такого же рода взаимодействия наблюдаются между клетками кишечного эпителия и локализованными в слизистой компонентами иммунной системы [148]. Профессиональные антиген-представляющие клетки, такие как дендритные клетки, секретуют экзосомы, содержащие главные комплексы гистосовместимости и костимулирующие молекулы, которые способны индуцировать активацию Т-лимфоцитов. При этом межклеточные адгезионные молекулы 1 (ICAM-1) и антиген, ассоциированный с лейкоцитарными функциями 1 (LFA-1), используются для захвата экзосом [149, 150, 151]. Вдобавок Т-клеточные молекулы, содержащие иммуноглобулиновый и муциновый домены (Tim-1 и Tim-4), были недавно идентифицированы как фосфатидилсериновые рецепторы, которые способны связывать экзосомы через фосфатидилсерин [152]. Более того, оказалось, что экзосомы способны не только специфически связываться с клетками-мишенями и реализовывать соответствующие сигнальные функции, но и передавать последним генетический материал [153]. В частности, тучные клетки секретуют экзосомы, содержащие мРНК от приблизительно 1300 генов и более 100 различных миРНК [154]. Перенос секретуемых мРНК в донорные клетки демонстрирует, что эта мРНК является активной, так как ее трансляция иницируется в реципиентных клетках. Сходно с этим клетки глиобластом также секретуют экзосомы, содержащие мРНК, миРНК и белки, стимулирующие ангиогенез [155]. Эти провоцирующие исследования наводят на мысль, что экзосомы имеют ряд вирусоподобных свойств, связанных со способностью передавать нуклеиновые кислоты реципиентным клеткам. В связи с этим представляется крайне интересной потенциальная возможность нагру-

жать экзосомы экзогенной РНК и создавать естественный направленный переносчик нуклеиновых кислот между клетками. На основе такой технологии могли бы быть созданы лекарственные препараты нового поколения, способные направленно манипулировать экспрессией генов *in vivo* за счет трансфекции коротких интерференционных РНК.

Мы сейчас находимся на ранней стадии понимания, как экзосомы образуются. Возможно, что экзосомы представляют собой гетерогенную популяцию микровезикул, которые могут образовываться различными механизмами. На сегодняшний день экзосомы классифицируются на основании их размера, плотности и молекулярного состава, но дальнейший прогресс в понимании механизмов их биогенеза и, в частности, более детальный протеомный анализ экзосом различного происхождения, вероятно, позволит более адекватно описывать и использовать этот существенный биологический феномен.

В отличие от внутриклеточных органелл, способы выделения экзосом относительно просты. Они, как правило, включают комбинацию из дифференциального центрифугирования, мембранной фильтрации, различных способов концентрирования, скоростного зонального центрифугирования, иммуноаффинного выделения и гель-фильтрационной хроматографии [113]. Характеристика полученных экзосом может осуществляться с помощью атомной силовой микроскопии, лазерной корреляционной спектроскопии [114, 115], проточной цитофлуорометрии, различных методов разделения белков в сочетании с масс-спектрометрией, Вестерн-блоттингом [116, 117]. Существенная трудность такого рода исследований связана с риском загрязнения полученных препаратов экзосом другими микровезикулярными и мембранными структурами. Использование различий в плавучей плотности через центрифугирование в градиенте плотности сахарозы может существенно улучшить качество получаемых препаратов. Использование мембранной фильтрации в сочетании с дифференциальным центрифугированием позволяет удалить более крупные везикулы и добиться более приемлемой очистки препаратов экзосом [118]. Дополнительное использование гель-фильтрационной хроматографии позволяет в ряде случаев добиться дальнейшего повышения качества [119]. Иммуноаффинные подходы позволяют получать высокоочищенные препараты экзосом [120, 121, 122, 123, 124]. Этим способом, в частности, экзосомы могут быть очищены от примесей высокомолекулярных белков и белковых олигомеров (например, протеосомных комплексов), которые обычно коседиментируют с экзосомами при высокоскоростном центрифугировании. Иммуноаффинный подход позволяет также удалять из препаратов гистоновые белки, наличие которых указывает на загрязнение апоптотическими антигенами, которые могут иметь сходный с экзосомами размер (50–100 нм).

Сочетание возможностей ранее предложенных методических приемов с имеющимся у нас опытом использования относительно оригинальных приемов выделения и характеристики экзосом позволило предложить следующую стратегию анализа экзосом из разных источников. Нами продемонстрировано, что техника лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) позволяет выявлять экзосомы в самых разных биологических жидкостях. Этот подход дает возможность оценивать размеры присутствующих в растворе частиц и, тем самым, устанавливать возможную гетерогенность их препаратов. Практическое отсутствие в литературе ссылок на использование динамического светорассеяния для изучения экзосом позволяет считать применение нами этого приема определенным вкладом, позволяющим оптимизировать стратегию их изучения. Применение лазерной корреляционной спектроскопии позволяет обнаруживать экзосомы в исходных препаратах, отслеживать кинетику их продукции различными клетками и контролировать качество получаемых препаратов экзосом на всех этапах их выделения. Поскольку ЛКС дает возможность оценить лишь размерные характеристики частиц в растворе, необходимы дополнительные критерии, позволяющие убедиться, что наблюдаемые частицы действительно представляют собой экзосомы. Для этих целей нами предложено использовать иммуноаффинную хроматографию с использованием антител, связывающих белковые маркеры, часто наблюдаемые на поверхности экзосом. Нами обнаружено, что подавляющее большинство экзосомных частиц, получаемых из самых разных источников, несет на своей поверхности молекулы главного комплекса гистосовместимости 1-го типа. Гистограммы, приведенные на рисунке, демонстрируют пример доказательного выявления экзосом с помощью лазерной корреляционной спектроскопии. Рисунок 5А — динамическое светорассеяние основных компонентов культуральной среды для выращивания клеток до того, как она контактировала с клетками. Рисунок 5В — та же среда после того, как в ней в течение 4 суток росли клетки глиобластомы человека, полученные из опухоли во время хирургической операции. Видно появление пиков рассеяния, соответствующих частицам с радиусами 10 нм и 45 нм (рис. 5С). Иммуноаффинная сорбция с использованием антител против главного комплекса гистосовместимости 1-го типа (HLA-ABC) удаляет большую часть секретируемых клетками частиц, подтверждая наличие на их поверхности тех же молекулярных детерминант, которые имеются на поверхности клеток, тем самым доказывая, что наблюдаемые объекты размером 20 и 90 нм в диаметре действительно происходят из мембранных структур клетки и могут представлять собой экзосомы.

Добавление анти-HLA-ABC антител с последующей сорбцией на сефарозных шариках, несущих пришитый к ним связывающий иммуноглобулины стафилококковый белок А, практически полностью удаляет экзосомы

- А – Культурная среда без клеток
- В – Культурная среда после роста в ней клеток
- С – Культурная среда после роста в ней клеток и иммуно-аффинной хроматографии с антителами против HLA-ABC

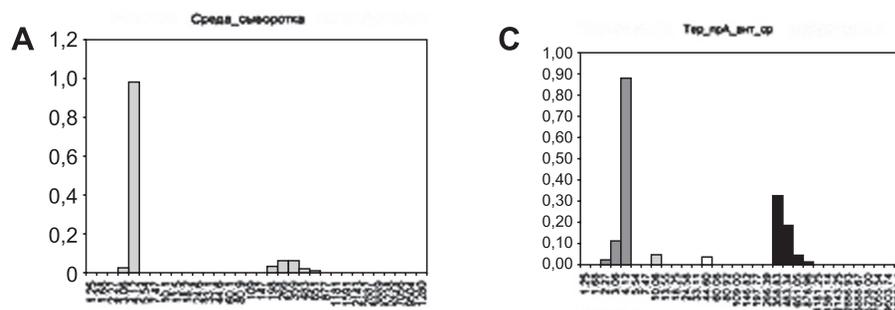


Рис. 5. Регистрация экзосом методом лазерной корреляционной спектроскопии — ЛКС (пояснения в тексте)

из исследуемых препаратов. Это обнаруживается с помощью ЛКС (рис. 5С) или атомной силовой микроскопии (рис. 6). Гроздь близких по размерам экзосомных частиц видны на левом рисунке. После иммуноаффинной сорбции с помощью антител против HLA-ABC наблюдается практически полное удаление этих частиц, что доказывает наличие на них антигенных детерминант, свойственных клеточной поверхности.

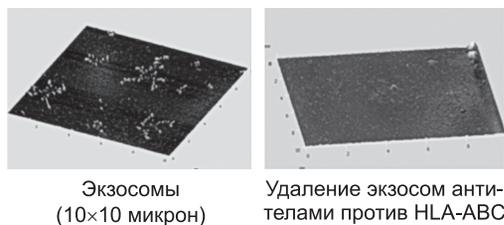


Рис. 6. Визуализация экзосом, выделенных из культуральной среды с помощью атомной силовой микроскопии

Другим поверхностным маркером экзосом может являться широко применяемый в качестве специфического маркера экзосом тетраспаниновый белок CD63. Сочетание использования ЛКС и иммуноаффинного связывания экзосом с помощью анти-HLA-ABC или анти-CD63 антител позволяет нам быть зрячими и осуществлять контроль качества препаратов экзосом на всех стадиях их выделения и анализа.

Важным этапом выделения экзосом является предварительная очистка от относительно крупных мембранных образований, сопутствующих белков и их агрегатов. В связи с этим на первом этапе осуществляется центрифугирование на стандартной центрифуге 14 тысяч оборотов в минуту, грубая фильтрация через бумажный

фильтр и более тонкая фильтрация через стерелизующий фильтр с диаметром пор 0,2 микрона. Экзосомы при этом остаются в растворе. Если среда, в которой находятся экзосомы, богата белками, полезно провести размер-исключающую гель-фильтрационную хроматографию. Это позволит удалить значительную часть белков, которые в противном случае могут загрязнять препараты экзосом, искажая результаты протеомных исследований. При необходимости может быть использован прием с разрушением неэкзосомных мембранных структур неионным детергентом Тритон-Х100 (1% раствор), к действию которого экзосомы устойчивы благодаря их липидному составу.

Дальнейшая очистка экзосом связана с центрифугированием через ступенчатый сахарозный градиент, с плотностью 1,18 г на мл, в режиме 100 000 g в течение 40 минут, и ультрафильтрация через фильтр, пропускающий белки с молекулярным весом менее 100 килодальтон. Завершающим этапом очистки (если этого требует недостаточная чистота полученных препаратов) может быть иммуноаффинное выделение с использованием антител к HLA-ABC или CD63.

Заключение

Современные технологии диагностики онкологических заболеваний основываются, главным образом, на молекулярно-генетических и биохимических методологиях, оперирующих отдельными генами и белками, нарушение функции которых является существенным фактором для возникновения злокачественных новообразований. Однако многообразие мишеней злокачественной трансформации (известно около 260 онкогенов и антионкогенов) и их сложное функциональное управ-

ление клеточными сигнальными системами требует развития комплексных подходов с применением методов геномики, протеомики и метаболомики.

Известно, что ключевые изменения при злокачественной трансформации клеток связаны со структурно-функциональными изменениями макромолекулярных комплексов клеточной поверхности, и что существенные для трансформации белки входят в состав этих комплексов. Есть все основания считать, что экзосомы — протеолипидные комплексы, содержащие РНК, могут играть роль в передаче информации между клетками. Их роль была продемонстрирована в ряде физиологических и патологических процессов, таких как регулирование иммунного ответа, коагуляция крови, канцерогенез. Интерес к исследованию экзосом как переносчиков информации между клетками в последние годы непрерывно растет.

Как следствие их эндосомального происхождения, почти все экзосомы содержат белки, вовлеченные в мембранный транспорт и слияние мембран (например, Rab-ГТФазы, аннексины и флотилины), в биогенез мультивезикулярных тел (белки Alix and TSG101), в процессы укладки белков, требующие участия шаперонов (HSC70 и 90), а также интегрины и тетраспанины (CD63, CD9, CD81 и CD82). Ряд белков попадает в экзосомы случайно, в силу их избыточности в клетке, другие — путем специфичного встраивания. Последние могут быть использованы в качестве экзосомальных маркеров (например, Alix, flotillin, TSG101, CD63). Следует отметить, что некоторые экзосомальные белки кодируются 18 хромосомой. Так, показано, что белок Bcl-2 (BCL2, Gene ID:

596, NCBI) играет ключевую роль в устойчивости к апоптозу, и его экспрессия значительно повышена в онкотрансформированных клетках. Известно также, что нейрональный N-cadherin (CDH2, Gene ID: 1000, NCBI), белок клеточной адгезии, вовлечен в процессы клеточной сигнализации.

Другой характерной чертой экзосом является обогащение их липидами, входящими в рафты клеточных мембран, холестерином и сфинголипидами, а также керамидами и фосфоинозитидами — предшественниками сигнальных лигандов и вторичных мессенджеров липидной природы. Кроме того, показано, что они содержат РНК, которые, видимо, избирательно упаковываются в экзосомы с помощью специальных сортирующих механизмов. Другими словами, можно сказать, что с помощью экзосом могут реализовываться по крайней мере три способа передачи информации между клетками, а именно — посредством белков, липидов и РНК.

Несмотря на определенные успехи, молекулярные механизмы взаимодействия клеток посредством экзосом требуют более глубокого изучения. Одним из подходов в исследовании этих механизмов является сравнение белкового и липидного состава экзосом, продуцируемых нормальными (фибробластами) и онкотрансформированными клетками. Такой подход нацелен на выявление молекулярных маркеров для ранней диагностики онкологической трансформации не только клеток, но и тканей и органов, и поэтому имеет практическую значимость.

Список литературы имеется в редакции.

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

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО
МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ У ЧЕЛОВЕКА

Л.А. Александрова

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России,
отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург

alexandroval@spmu.rssi.ru

В основе ведущих метаболических процессов человека лежат свободнорадикальные реакции с участием активных форм кислорода. С 80-х годов прошлого века получены убедительные доказательства участия этих процессов, в частности, перекисного окисления липидов (ПОЛ) в патогенезе многих заболеваний. Ранее в собственных исследованиях установлена избыточная активация процессов ПОЛ, ведущая к развитию нарушений микроциркуляции и неврологических осложнений при гипертензии, сахарном диабете и ряде сердечно-сосудистых заболеваний.

Общепризнанным показателем интенсивности ПОЛ является концентрация малонового диальдегида (МДА) в плазме или сыворотке крови, которую определяют спектрофотометрическим методом по образованию продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРП).

Цель работы: сравнение высокотехнологичного ВЭЖХ-метода определения МДА с общепринятым спектрофотометрическим тестом.

Материалы и методы. Использовалась кровь больных с тромбозом глубоких вен с митохондриальной дисфункцией (МД) — группа 1 и без МД — группа 2. Продукты определяли спектрофотометрическим методом (СФ) и МДА определяли ВЭЖХ-анализом в нашей модификации.

Результаты и их обсуждение. Повышение ($p < 0,05$) ТБКРП и МДА в плазме в группе 1 по сравнению с группой 2 было установлено СФ- и ВЭЖХ-методами, на 15 и 30%, соответственно. По абсолютному значению концентрации ТБКРП и МДА в обеих группах различались, в среднем в 15 раз, при завышении данных, полученных в отношении ТБКРП СФ-методом. Подобное завышение может объясняться относительной неспецифичностью реакции при использовании СФ-метода. Получение более точной информации обеспечивается разделением ТБКРП хроматографическими методами. При этом СФ-метод может применяться в качестве скринингового теста.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ТРАНСФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

Л.А. Александрова, В.А. Тарлыков

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

alexandroval@spmu.rssi.ru

Одним из показателей нарушений кровообращения служит деформируемость эритроцитов, которая может оцениваться по степени резистентности их мембран к различного вида воздействиям [2]. В работе [1] была изучена зависимость жесткости эритроцитарных мембран от изменения различных параметров оптического излучения.

Цель работы: исследование трансформируемости эритроцитов методом лазерной дифрактометрии (ЛД) у больных множественной миеломой (ММ) до и после эфферентной терапии (ЭТ).

Материалы и методы. Использована кровь больных (17 чел.) с ММ и доноров (18 чел.). Деформируемость эритроцитов исследовали методом ЛД с использованием He-Ne-лазера ($\lambda = 0,63$ мкм) и YAG : Nd-лазера ($\lambda =$

0,53 мкм), с расчетом рефрактерного индекса по двум длинам волн и минимальной резистентности (МР) [2].

Результаты. У больных ММ до лечения определялась выраженная анемия (Hb $99,5 \pm 3,89$ г/л) и гиперпротеинемия (общий белок плазмы $92,0 \pm 3,2$ г/л). Концентрация парапротеина (ПП), М-компонента, составляла $36,0 \pm 2,8$ г/л. После ЭТ общий белок плазмы снизился до $81,0 \pm 5,0$ г/л за счет снижения концентрации парапротеина ($30,0 \pm 3,0$ г/л). МР эритроцитов в контрольной группе составляла 0,5; у больных до лечения 0,40 и после лечения имела тенденцию к нормализации.

Выводы. Нормализация деформируемости эритроцитов после эфферентной терапии, способствующей выведению низкомолекулярных продуктов распада ПП,

может служить дополнительным признаком эффективности лечения.

Литература

1. Alexandrova L.A., Bessmeltsev S., Lendiaev A., Moskalyova A., Tarlykov V. Laser diffractometry of erythrocytes refractive index //

Lasers for Measurements and Information Transfer / Ed. V.E. Privalov. — 2004. — P. 330–337.

2. Ponder E. Hemolysis and related Phenomena. — New York: Crune and Stratton, 1971. — 680 p.

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВА СЫВОРОТКИ КРОВИ МЫШЕЙ РАЗНЫХ ЛИНИЙ ПРИ ОСТРОМ ОБЛУЧЕНИИ

И.Б. Алчинова¹, Е.Н. Архипова¹, И.Ю. Егорова², А.С. Бобе¹, М.Ю. Карганов¹

¹ Учреждение Российской академии медицинских наук

НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

² Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

labpolys@gmail.com

В работе исследовали субфракционный состав сыворотки крови мышей двух линий методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). Группы мышей (СЗН/Sn, n = 9; 101/Hf, n = 6) были облучены на цезиевом облучателе «Панорама» (МГАВМиБ им. К.И. Скрябина) до общей дозы в 750 рентген. Контрольные группы (СЗН/Sn, n = 7; 101/Hf, n = 10) не подвергались облучению. Метод позволяет определить соотношение частиц разного размера в различных биологических жидкостях. Для многокомпонентных образцов результатом обработки является кривая с несколькими выраженными пиками. Сравнение площадей под кривой позволяет определить изменение процентного вклада в светорассеяние частиц разного размера. Для характеристики смещения размеров частиц было принято целесообразным разделить всю область размеров на несколько интервалов. Для гистограмм сыворотки крови мышей можно выделить три основных интервала: 1 — от 0 до 20,58 нм, 2 — от 20,58 до 91,26 нм, 3 — свыше 91,26 нм. Для анализа использовались два критерия: сдвиг — ха-

рактеристика интервала (небольшие, но устойчивые изменения размеров частиц), и различие в % — количественное изменение частиц.

Основное изменение в ЛК-гистограммах сыворотки крови необлученных мышей обеих линий связано с увеличением разницы между частицами первого интервала (от 0 до 20,58 нм) и присутствием сдвига (12,9%) на втором интервале (от 20,58 до 91,26 нм). Эти процессы наблюдаются в сыворотке крови мышей обеих линий. ЛК-гистограммы сыворотки крови мышей в первые три недели после облучения характеризуются количественным уменьшением частиц первого интервала и значительным увеличением различий в третьем интервале (свыше 91,26 нм). Возрастание процентного вклада частиц крупного размера является показателем развития воспалительного процесса и увеличения в сыворотке крови продуктов деструкции клеток. Метод ЛКС позволяет определить межлинейные различия, возникающие в сыворотке крови после острого облучения.

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ АНАЛИЗАТОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В КРОВИ, СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ МЕТОДОМ ПРОИЗВОДНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Ю.В. Архипенко¹, О.Б. Кострова², И.Б. Ландау², С.Э. Миронов², Н.М. Сафьянников²

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

² ООО «Этель», Санкт-Петербург

sysan@sysan.sp.ru

Уровень малонового диальдегида (МДА) в крови, сыворотке или плазме является специфическим показателем свободнорадикального окисления (СрО) в организме, отражающим развитие большинства патологических процессов.

В настоящее время в России для определения уровня МДА распространен тест, при котором МДА вступает в реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой.

Особенностью крови, а также ее плазмы и сыворотки (по сравнению с органами и тканями) является наличие

дополнительных веществ, также вступающих в реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой и дающих в результате вещества, спектр которых интерферирует со спектром МДА.

Выделение спектра МДА из смешанного спектра всех веществ при обычном спектрофотометрировании невозможно, поэтому указанный метод не позволяет получать достоверную оценку концентрации МДА.

Относительно простое решение задачи выделения спектра МДА лежит в применении производной спек-

трофотометрии, принцип которой заключается в построении n -ной производной от спектра оптической плотности анализируемого образца.

Современные универсальные спектрофотометры, оснащенные функцией получения производных спектров, функционально избыточны и имеют высокую стоимость.

Поэтому назрела необходимость в создании специализированного, простого и доступного широкому кругу клинико-диагностических лабораторий анализатора, который позволит внедрить диагностику по уровню МДА в рутинную медицинскую практику.

Разрабатываемый анализатор представляет собой комплекс на основе ПЭВМ и спектрофотометрического терминала на базе мини-спектрометра. В процессе работы происходит считывание биомедицинской информации в виде спектра оптической плотности, которая математически обрабатывается с вычислением 4-й производной, несущей информацию о концентрации МДА.

Решение комплекса на основе ПЭВМ позволяет предложить вполне «бюджетный» вариант прибора, потенциально пригодный для широкого применения, в том числе в средних и малых медицинских лабораториях России.

КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ СУБФРАКЦИОННОГО СОСТАВА И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Е.Н. Архипова, И.Б. Алчинова, Ю.С. Медведева, А.Б. Черепов
Учреждение Российской академии медицинских наук
НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва
hippova@gmail.com

Метод лазерной корреляционной спектрометрии (ЛКС) позволяет оценить вклад в светорассеяние частиц различного гидродинамического радиуса для биологических жидкостей. Исследование сыворотки крови больных бронхиальной астмой показало, что по мере нарастания степени тяжести заболевания возрастает вначале вклад в светорассеяние небольших иммуноглобулинов, а затем — крупных иммунных комплексов. В образцах мочи пациентов преобладают, по сравнению с «нормальными» спектрами, крупные частицы размером 221–1500 нм, что определяется как «аллергоподобные сдвиги» согласно семиотическому классификатору. В ЛК-спектрах сыворотки крови увеличивается вклад в светорассеяние частиц малого размера, что свидетельствует об усилении процессов дегградации молекул, характерных для состояний, сопровождающихся интоксикацией организма. Показано, что изменение иммунной функции, индуцированное аллергеном, приводит к появлению не только местных симптомов, но и к развитию

хронической эндогенной интоксикации, проявляющейся в изменении молекулярного состава биологических сред организма, что, в свою очередь, отражается на токсичности сыворотки крови и токсичности мочи. Биотестирование спермомобилометрическим методом показало снижение токсических свойств сыворотки крови и двукратное повышение токсичности мочи обследуемых с аллергической патологией, обусловленное эндогенной интоксикацией, что позволило сформулировать критерии для прогнозирования течения бронхиальной астмы, корректировать схему лечения и оценивать эффективность терапии. Сопоставление данных, полученных с помощью ЛКС, с результатами спермомобилометрического исследования биологических жидкостей здоровых и больных людей обнаружило высокую корреляцию между показателями и продемонстрировало значительную информативность разработанного подхода.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА ОКСИДА АЗОТА (II) В ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЙ СИСТЕМЕ

А.О. Безушко
ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России,
отдел биохимии НИЦ, Санкт-Петербург
nw-e005@mail.ru

Лабораторно-диагностические методики оценки уровня продуктов NO-синтазных реакций используют в практике в диагностическом процессе при заболеваниях легких, тестируя выдыхаемую газовую смесь или ее конденсат. В литературе отсутствуют способы оценки

оксида азота в выдыхаемых пробах с помощью химических ловушек, к которым относится флюоресцентный индикатор оксида азота — DAF-2.

Цель работы заключалась в оптимизации условий регистрации NO с помощью флюоресцентного индикатора

тора в проточно-инжекционной системе. Калибровку аналитического метода проводили растворами донатора оксида азота в виде нитрозотиола.

Результаты. В ходе исследования:

1. Оптимизированы условия синтеза и контроль выхода нитрозотиола в целях калибровки анализа.
2. Изучены условия декомпозиции модельных растворов нитрозотиолов и их декомпозиция в образцах плазмы крови.
3. Определены условия преаналитической стадии подготовки образца плазмы крови и образца конденсата выдыхаемого воздуха.
4. Предложена методика автоматизированного смешивания с использованием аутосамплера "Agilent

1100" (Германия) с последующей флюориметрией продукта реакции.

В работе представлен подход, позволяющий в образце объемом 1–2 мкл за 2–3 мин определять одновременно концентрацию оксида азота (NO) и нитрозотиолов (RSNO).

Показано, что свободный NO в свежеполученной плазме крови составляет около 50% от общего содержания RSNO, в то время как в плазме крови после хранения при -70°C более недели содержание RSNO по оценке методом Грисса составляет лишь 1–2% от общего содержания окислов азота, включая нитраты и нитриты плазмы крови.

КРИСТАЛЛОМОРФОЛОГИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

М.О. Белова, Л.А. Курбатова

ГОУ ВПО Тверская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России, Тверь
charea58@mail.ru

В качестве метода дифференциальной диагностики фетоплацентарной недостаточности различного генеза предложен метод тизиографии амниотической жидкости. В качестве кристаллообразующего вещества использовали нингидрин. В амниотической жидкости, взятой во время родов у женщин с физиологически протекающей беременностью, выявлялись полусферолиты, которые имели четкие лучи первого и второго порядков. При кристаллизации комплекса нингидрина с амниотической жидкостью рожениц, беременность которых осложнялась фетоплацентарной недостаточностью, вызванной гипертензией, кристаллы сохраняли форму полусферолитов, но их лучи были нечеткими и утолщенными, имели разную длину, появлялись лучи второй и третьей генерации. В околоплодных водах пациенток

с диагностированной фетоплацентарной недостаточностью и инфекционными заболеваниями мочеполовых путей, перенесенными до наступления настоящей беременности, кристаллы представляли собой ставролиты с малым числом лучей неодинаковой длины и толщины. Как размеры кристаллов, так и их количество было значительно меньше по сравнению с нормой. Основная площадь чашек Петри была заполнена толстым слоем аморфного вещества и не разросшимися кристаллами. Таким образом, выявлены закономерные изменения формы, размеров, степени формирования кристаллов, что может быть апробировано в акушерской практике с целью прогнозирования инфекционных заболеваний у новорожденного.

МОНИТОРИНГ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ КАК МАРКЕРА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК

Е.А. Беляева

Учреждение Российской академии наук Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
alenab61@mail.ru

Митохондриям принадлежит центральная роль не только в системе клеточного энергетического метаболизма, но и в процессах регуляции клеточной смерти, в том числе апоптоза. Известно также, что митохондриальная дисфункция критически задействована в процессе старения и таких патологических состояниях как ишемия, диабет, рак, различные нейродегенеративные заболевания, включая болезни Паркинсона и Альцгей-

мера, а также болезни, связанные с вредным воздействием различных загрязнителей окружающей среды, таких, например, как тяжелые металлы. Накоплены данные и о том, что активация различных ионных каналов внутренней мембраны митохондрий, в частности Ca^{2+} -зависимой неселективной поры или АТФ-зависимого калиевого канала, а также нарушения функционирования дыхательной цепи митохондрий являются ключевыми

событиями во многих из этих процессов. Поэтому идея проведения мониторинга митохондриальной дисфункции как маркера патологического состояния клеток может иметь большое научно-практическое значение. В него входит, в частности, оценка основных биоэнергетических параметров клетки — скоростей клеточного и митохондриального дыхания в различных энергетических состояниях и величин дыхательного контроля и трансмембранного потенциала, а также измерение внутриклеточной продукции активных форм кислорода и

проницаемости внутренней мембраны митохондрий. Надо отметить, что одновременно с измерением этих характеристик необходимо проводить и определение их чувствительности к различным эффекторам дыхательной цепи и неселективной поры митохондрий, что дает важнейшую информацию для диагностики состояния клетки в норме и при патологии. Подобный подход был успешно опробован нами на примере мониторинга состояния клеток, отравленных тяжелыми металлами, такими как кадмий, ртуть и медь.

РОЛЬ СВОЕВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ В СИСТЕМЕ ПРОФИЛАКТИКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Э.А. Блашко

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России, отдел биохимии НИЦ ФГУ ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова, группа протеомики, Санкт-Петербург
blashko@mail.ru

Концентрация общего гомоцистеина (оГци) плазмы крови является независимым фактором риска развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Исследования последних 35 лет подтвердили тот факт, что длительное воздействие на организм человека повышенных концентраций общего гомоцистеина (>12 мкМ), называемое гипергомоцистеинемией (ГГци), является фактором, в значительной степени обуславливающим неблагоприятные тромбоземболические осложнения при сердечно-сосудистых заболеваниях. Пути снижения вклада ГГци в показатели смертности населения при сердечно-сосудистых заболеваниях являются весьма актуальными.

Цель. Оценка результатов обследования пациентов в Санкт-Петербурге с различными нарушениями кровообращения на выявление ГГци с целью профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Материалы и методы исследования. 1461 пациент (мужчины и женщины в возрасте до 55 лет и старше). Анализ оГци в плазме крови проводили с помощью

ВЭЖХ-анализа по медицинской технологии, созданной в отделе биохимии НИЦ СПбГМУ (разрешение на применение ФС 2009/309 от 04.09.2009 г.)

Результаты. У мужчин и женщин Санкт-Петербурга умеренная ГГци (12–30 мкМ) была обнаружена почти у 2/3 из числа 1461 обследованных в 2004–2006 гг. с различными нарушениями кровообращения при артериальной гипертензии выше 90/140 мм. В группе обследованных мужчин до 55 лет умеренная ГГци встречалась в 58%, т. е. чаще, чем у женщин, почти в 2 раза. В группе старше 55 лет у обследованных пациентов мужчин и женщин умеренная ГГци встречается одинаково часто — у 2/3 мужчин и у 2/3 женщин.

Вывод. В лабораторно-диагностической практике для оценки оГци ВЭЖХ-анализ в современном исполнении является необходимым для своевременной диагностики ГГци в крупных медицинских центрах в целях профилактики атеротромботических нарушений и их последствий.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТРАЖАТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ $\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ZrO}_2$ В МЕДИЦИНСКИХ ПРИБОРАХ

А.В. Ботина¹, М.К. Вязанкина², А.Ч. Машек², Е.Е. Майоров², Н.Я. Чистякова²

¹ ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России

² Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург
botinaanna@mail.ru

Лазеры нашли применение во многих областях медицины, в том числе в стоматологии, хирургии, гинекологии и т. д. Однако одним из наиболее перспективных направлений лазерной медицины на сегодняшний день является косметология. Ее развитие, а также первые

положительные результаты в проведении некоторых процедур стимулировали дальнейший рост интереса к научно-исследовательским работам [1], целью которых является разработка качественных и дешевых источников излучения.

Целью работы является снижение температуры наконечника, в котором собственно и располагается галогеновая лампа, и повышение оптической эффективности, а также разработка относительно простых в изготовлении отражателей для дешевой технологической конструкции, использующей в качестве излучателя галогеновые лампы.

Материалы и методы. В ходе эксперимента на лампу наносилось жидкое стекло и смеси на его основе: 1) жидкое стекло $\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O}$; 2) жидкое стекло $\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Al}_2\text{O}_3$; 3) жидкое стекло $\text{SiO}_2 + \text{Al}_2\text{O}_3$; 4) жидкое стекло $\text{SiO}_2 + \text{ZrO}_2$ цирконий; 5) жидкое стекло $\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ZrO}_2$ цирконий. Для данных экспериментов была взята лампа USHIO JVC120V-1000WC3.

Результаты. Наличие диффузно отражающего покрытия (ДОП) на основе ZrO_2 приводит к повышению измеряемой световой мощности в 1,66 раза. Наиболее успешным в качестве наполнителя для ДОП следует признать ZrO_2 .

Выводы: коэффициент отражения ДОП на основе ZrO_2 составляет порядка 0,85 отн. ед., коэффициент поглощения порядка $7,0 \pm 2,5 \text{ см}^{-1}$. Допустимая толщина ДОП на лампе составляет 0,1–0,4 мм. Дальнейшее увеличение толщины приводит к разрушению покрытия ДОП.

Литература

1. Кулагин С.В. Оптико-механические приборы. — М.: Машиностроение, 1984. — 33 с.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ И МОЧИ У БОЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАРОДОНТА С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ

А.В. Гончарук, Ю.И. Бажора, С.Ф. Гончарук

Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса

goncharuks@ukr.net

Исследовали лазерно-корреляционный спектр (ЛК-спектр) ротовой жидкости и мочи у 103 пациентов с заболеваниями пародонта (ЗП), с отсутствием (32 человека) и наличием (71 больной) мочекаменной болезни (МКБ), с учетом преобладания в моче разных видов солей (оксалурия — 34, уратурия — 24, фосфатурия — 13).

Установлено, что наличие МКБ у больных с ЗП существенно влияет на характер ЛК-сдвигов ротовой жидкости. Если у больных без МКБ в ротовой жидкости обнаруживаются только нормологический тип спектра и гидrolитические (преимущественно дистрофически-подобные) сдвиги ЛКС, то при наличии МКБ выявляются также анаболические сдвиги, а среди гидrolитических преобладают интоксикационно-подобные.

Характер ЛК-сдвигов ротовой жидкости у пациентов с ЗП и МКБ различается в зависимости от преобладания

в моче различных видов солей. Анаболические сдвиги ЛКС ротовой жидкости наблюдаются только при преобладании оксалурии. При преимущественной уратурии в ротовой жидкости отмечается преобладание в 2,4 раза интоксикационно-подобных сдвигов ЛКС над дистрофически-подобными.

Корреляционный и кластерный анализ показал, что у 22,9% больных ЗП и МКБ отмечается корреляция с высокой степенью достоверности ($r > +0,7$) между ЛКС ротовой жидкости и мочи, в отличие от больных ЗП без МКБ (все $r < +0,32$). При этом наиболее часто корреляция со степенью достоверности более $+0,7$ и совпадение зон достоверных объемов (в пределах доверительных интервалов 2σ) ЛК-спектров обеих биологических жидкостей отмечается у пациентов с преобладанием оксалурии.

АКТИВНОСТЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-KB В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕСТАЦИИ

В.О. Гунько, Т.Н. Погорелова

ФГУ Ростовский НИИ акушерства и педиатрии Минздравсоцразвития РФ, г. Ростов-на-Дону

rniip@yandex.ru

Развитие гестации, формирование плаценты как связующего звена между организмами матери и плода сопровождается усилением ангиогенеза, клеточной дифференцировки, пролиферации и апоптоза. В регуляции этих процессов важную роль играет транскрипционный фактор NF-kB, контролирующей экспрессию более чем 150 генов. Баланс между активацией и ингибированием сигнально-

го каскада NF-kB, поддерживаемый многочисленными биоактивными компонентами и факторами стресса, необходим для обеспечения оптимальных условий плода.

Цель работы — изучить ДНК-связывающую активность одного из ключевых белков семейства NF-kB — p65 в плаценте при физиологической беременности, гестозе и задержке роста плода (ЗРП).

В проспективное исследование были включены 28 женщин в возрасте 23–33 лет, у 11 из которых беременность протекала без осложнений, у 9 — осложнилась ЗРП и у 8 — развился гестоз средней степени тяжести. Материалом исследования служили плаценты, взятые сразу после родов (39–40 недель) при соблюдении холодового режима. ДНК-связывающую активность NF-κBp65 измеряли в ядерно-цитоплазматической фракции, полученной из лизатов синцитиотрофобласта (центрифугирование при 14 000 g, температуре +4° С в течение 15 минут в соответствии с протоколом фирмы-разработчика), с использованием набора фирмы “Cauman” (США).

Результаты исследования показали, что при гестозе плацентарная ДНК-связывающая активность NF-κBp65 повышается в среднем на 20% по сравнению с таковой в контрольной группе. При беременности, осложненной ЗРП, наблюдается аналогичное по направленности, но менее выраженное изменение данного показателя. Учитывая роль NF-κB в регуляции важных клеточных функций плаценты, можно полагать, что изменение его ДНК-связывающей активности сопровождается нарушением нормального течения беременности и развития плода.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АСТN3 У ФУТБОЛИСТОВ

А.А. Данилова, Р.Т. Габбасов, А.В. Борисова, И.И. Ахметов
Казанский государственный медицинский университет, г. Казань
daniлова-alina@mail.ru

Альфа-актинин-3 составляет доминантный белковый компонент Z-линии саркомера и стабилизирует сократительный аппарат быстрых мышечных волокон. Однонуклеотидная замена цитозина на тимин (R577X) в 16 экзоне гена АСТN3 ведет к остановке синтеза полипептидной цепи белка альфа-актинина-3 и снижению скоростно-силового потенциала скелетных мышц человека. Цель настоящего исследования заключалась в изучении распределения частот генотипов по АСТN3 у российских футболистов, выступающих в командах Первого дивизиона и Премьер-лиги (n = 46), и их сравнение с данными российской популяции. Частота АСТN3 RR генотипа в группе футболистов значимо (67,4% против 36,8%; p < 0,0001) отличалась от контрольной группы (n = 1197) [1]. В практическом плане это означает, что носительство RR генотипа повышает вероятность занятий футболом в 3,4 раза (95% ДИ: 1,848–6,209) по сравнению с носительством X аллеля. Выявленные различия в частотах генотипов между футболистами и кон-

трольной группой, по-видимому, отражают процесс спортивного отбора. Полученные в настоящем исследовании данные согласуются с результатами Santiago и соавторов [2], где была обнаружена значимо более высокая частота АСТN3 RR генотипа среди испанских футболистов по сравнению с популяционными данными (48,3 против 28,5%). Таким образом, результаты исследования свидетельствуют об ассоциации R577X полиморфизма гена АСТN3 с предрасположенностью к занятиям футболом.

Литература

1. Druzhevskaya A.M., Ahmetov I.I., Astratenkova I.V., Rogozkin V.A. Association of the ACTN3 polymorphism with power athlete status in Russians // Eur. J. Appl. Physiol. — 2008. — V. 103(6). — P. 631–634.
2. Santiago C., González-Freire M., Serratos L. et al. ACTN3 genotype in professional soccer players // Br. J. Sports Med. — 2008. — V. 42 (1). — P. 71–73.

СОСТОЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВТОРИЧНОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

И.Р. Егорова¹, Е.И. Кондратьева², А.А. Терентьева², Г.А. Суханова²

¹ Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН, г. Якутск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск
douce23@yandex.ru

Калликреин-кининовая (ККС) и ренин-ангиотензиновая (РАС) системы участвуют в регуляции различных физиологических функций организма и развитии многих патологических состояний. Цель исследования: изучить состояние ККС и РАС при хроническом вторичном пиелонефрите (ПН) у детей раннего возраста. Обследовано 49 детей раннего возраста (33 — в период обострения, 16 — в период ремиссии) с хроническим

вторичным ПН. Контрольную группу составили 40 практически здоровых детей того же возраста. Результаты исследования и обсуждение: при обострении хронического вторичного ПН у всех детей отмечается достоверное повышение активности калликреина (КК) в 2 раза (p < 0,001) и снижение уровня калликреиногена (ККГ) на 24% (p < 0,001) по сравнению с контрольной группой. При достижении ремиссии заболевания активность КК

снижается, а ККГ повышается, но статистически отличается от показателей контроля ($p = 0,013$ и $p < 0,001$ соответственно). Активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) при обострении хронического вторичного ПН статистически значимо повышается в 1,3 раза ($p = 0,003$), а при достижении ремиссии снижается, но достоверно отличается от контрольной группы ($p < 0,02$). Изучение активности специфического ингибитора протеиназ α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) показало, что при обострении хронического вторичного ПН отмечается достоверное снижение его активности на 28%

по сравнению с контрольной группой ($p = 0,001$), а в период ремиссии заболевания активность α_2 -МГ не отличается от показателя контроля. Таким образом, при обострении хронического вторичного ПН у детей раннего возраста имеет место повышение активности КК, АПФ и снижение ККГ, α_2 -МГ. Сохранение изменения активности КК, ККГ и АПФ в период ремиссии хронического вторичного ПН можно расценивать как неблагоприятный показатель, указывающий на неполную ремиссию заболевания.

ЛАБОРАТОРНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ОЦЕНКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ СВОБОДНЫХ АРГИНИНА И ЛИЗИНА ПРИ ФИБРИНОЛИЗЕ

А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Д.С. Лупан

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий,

Санкт-Петербург

Zhloba@mail.spbnit.ru

До настоящего времени не найдена надлежащей оценочной функции фибринолиза по высвобождению свободных аминокислот. Наибольший интерес вызывает вопрос о генерации свободного аргинина, как субстрата эндотелиальной синтазы оксида азота.

Методы. Коагуляцию и последующий фибринолиз инициировали в плазме крови добавлением стандартных количеств тромбина и тканевого активатора плазминогена. Концентрации аргинина и лизина до, в процессе и после завершения фибринолиза определяли ВЭЖХ-анализом. Параллельно в тех же пробах определяли концентрацию аргинина более доступным методом Сакагучи. Параметры фибринолиза оценивали турбидиметрически.

Результаты. После завершения цикла коагуляции/фибринолиза отмечено достоверное и значительное увеличение концентраций аргинина и лизина, которое

составило в среднем 101 и 81%, соответственно. Длительность инициации фибринолиза коррелирует со степенью прироста этих аминокислот: $r_s = -0,733$ и $-0,761$ ($p < 0,05$). Отмечается также тесная корреляция результатов, полученных с использованием ВЭЖХ-анализа и метода Сакагучи. Генерация аргинина имеет два максимума — в начале процесса лизиса сгустка и в его конце, тогда как лизин высвобождается преимущественно в середине процесса.

Выводы. 1. Генерация аргинина, ассоциированная с фибринолизом, может рассматриваться как существенная прибавка субстрата для эндотелиальной NO-синтазы, что является положительным фактором для раннего восстановления кровообращения.

2. Реализация разработанной технологии возможна с использованием ВЭЖХ-анализа и более доступного метода Сакагучи.

БИОГРАВИМЕТРИЯ: МЕТОДОЛОГИЯ, МЕТОДИКА, ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Е.В. Иванникова¹, А.К. Мартусевич^{1, 2}, Ж.Г. Симонова³

¹ Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко, Нижний Новгород

² Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, Нижний Новгород

³ Кировская государственная медицинская академия, г. Киров

В современной лабораторной диагностике значительное внимание уделяется биофизическим технологиям. К таковым, в частности, относятся методы биокристалломики — нового направления медико-биологического профиля, основанного на исследовании кристаллогенных свойств биологических субстратов организма человека и животных. В то же время большинство публика-

ций, посвященных изучению кристаллогенных свойств биожидкостей, базируется на оценке результата высыхания биоматериала, тогда как динамика процесса структурообразования рассматривается лишь в единичных работах. В связи с этим нашим коллективом разработан и активно апробируется новый метод изучения кристаллогенных свойств биосред — биогравиметрия [1, 2].

Предлагаемый метод основан на регистрации скорости убывания массы образца биосубстрата на протяжении всего периода его дегидратации. Способ осуществляется с применением электронных весов с чувствительностью не ниже 0,001 г. Для выполнения биогравиметрического исследования на предварительно помещенное на платформу весов предметное стекло наносят биожидкость (рекомендуемый объем — 0,1–0,2 мл) и регистрируют длительность промежутков времени, за которые происходит убывание каждой учетной единицы массы микропрепарата. Исследование завершают по окончании высыхания препарата, оцениваемого визуально (ориентировочно — по достижении 5–10% от исходного веса образца). Оценка результатов биогравиметрии производится путем построения регрессионной кривой с расчетом биогравиметрического коэффициента, являющегося отношением полного расчетного времени кристаллизации (точка пересечения линии регрессии с осью ОХ) и исходной массы образца.

Проведенные пилотные исследования информативности биогравиметрии в отношении сыворотки крови практически здоровых лиц и больных с различной патологией (например, с хроническим панкреатитом) позволили выявить значимые разнонаправленные изменения биогравиметрического коэффициента при рассматриваемых патологических состояниях относительно нормы [2], а также показаны возможности метода в тестировании кристаллогенных свойств лекарственных препаратов.

Литература

1. Мартусевич А.К. с соавт. Исследование кристаллогенных свойств лекарственных препаратов // Сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию ВГСХА «Современные научно-практические достижения в ветеринарии». — Киров. — 2010. — С. 111–114.
2. Мартусевич А.К., Иванникова Е.В., Русских А.П. Метод биогравиметрии биологических субстратов // Медицинский академический журнал. — 2010. — Т. 10, № 5. — С. 59.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ХАРАКТЕР ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ У ШКОЛЬНИКОВ

М.Ю. Карганов¹, О.И. Ковалева², Н.П. Антонова¹, А.А. Рогова²

¹ Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

² Московский институт открытого образования Департамента образования г. Москвы
mkarganov@mail.ru

Экологические и антропогенные факторы окружающей среды оказывают большое влияние на клеточные и гуморальные звенья систем организма животных и человека. Среди факторов, оказывающих влияние на рост и развитие организма, также имеет значение сбалансированное питание, достаточное поступление витаминов, минеральных компонентов, а также качество самих продуктов и питьевой воды.

Основные трудности в выявлении эффектов воздействия антропогенных факторов окружающей среды связаны со слабой выраженностью проявлений и ограниченной чувствительностью методов исследования. Использование метода лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) ротоглоточных смывов в экспрессном режиме с применением современных компьютерных средств позволило провести массовые обследования учащихся общеобразовательных и специализированных учреждений, проживающих в различных регионах России (Москва, Московская обл., Республика Адыгея, Новгородская обл.).

В рамках мероприятий по организации питьевого режима в образовательных учреждениях Москвы было проведено обследование 240 человек. Основные группы

состояли из детей, посещающих дошкольные образовательные учреждения и начальные классы школ со специально организованным режимом водоснабжения. В контрольные группы вошли дети из образовательных учреждений, расположенных в тех же микрорайонах, но с обычными условиями потребления воды. Спустя 6 месяцев после начала употребления бутилированной воды у детей, получавших ее, была существенно снижена частота встречаемости отрицательной динамики метаболических сдвигов.

Были зафиксированы различия в направленности метаболических сдвигов у детей в начале пребывания их в оздоровительном лагере г. Альметьевск и после проведенного там месяца отдыха. По окончании срока почти у половины детей наблюдалась положительная динамика в изменении метаболического статуса; у 22% обследованных изменений не было выявлено, у 31% была отмечена отрицательная динамика.

Метод ЛКС продемонстрировал свою эффективность не только для экспрессной оценки направленности метаболических процессов в организме, но и для выявления изменений этой направленности при перемене условий среды проживания.

ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ В-ХЛЛ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Д.Г. Кисиличина, Е.В. Наумова, М.Е. Почтарь, С.А. Луговская, Б.В. Бидерман
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава», г. Москва

Отсутствие мутаций в генах варибельного региона тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IgVH*-генах) у больных с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ) ассоциируется с быстрым прогрессированием заболевания. В качестве суррогатных маркеров мутационного статуса *IgVH*-генов предложено использовать антигены ZAP-70 и CD38, однако имеются противоречивые данные, касающиеся практической значимости этих показателей.

У 51 больного В-ХЛЛ проведена оценка экспрессии ZAP-70 и CD38 на лимфоцитах периферической крови методом проточной цитофлуориметрии (прибор FACSCalibur, Becton Dickinson (США)). Определение мутационного статуса производилось в лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ ГНЦ Минздравсоцразвития России.

В работе использованы различные способы оценки экспрессии ZAP-70 и CD38 и проведено сопоставление с результатами мутационного статуса. Для ZAP-70 наи-

большая корреляция с мутационным статусом достигнута при вычислении соотношения средней интенсивности флуоресценции (MFI) ZAP-70 в популяции опухолевых В-клеток и Т-лимфоцитов (соответствие в 88% случаев). Для 6 больных наблюдались дискордантные по сочетанию маркеров данные, т.е. отсутствие ZAP-70 при варианте без мутаций ($N = 2$) и наличие ZAP-70 при В-ХЛЛ с благоприятным по состоянию *IgVH*-генов прогнозом ($N = 4$). Результаты оценки CD38 варьировали в зависимости от величины порогового значения экспрессирующего данный антиген клеток (30, 20 и 6%), но для всех вариантов согласующиеся с мутационным статусом данные наблюдались не более чем в 70% случаев.

Исследование экспрессии опухолевыми клетками ZAP-70 более надежно предсказывает мутационный статус *IgVH*-генов по сравнению с CD38. Метод проточной цитометрии позволяет проводить определение прогностического варианта В-ХЛЛ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОВТОРНЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ ПРИ СТРИКТУРАХ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ

Я.В. Колосовский, Э.Э. Топузов, В.К. Балашов, Ш.И. Галеев
ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России,
кафедра хирургических болезней с курсом детской хирургии, Санкт-Петербург
ejvcons@mail.ru

Введение. Хирургические вмешательства по поводу стриктур желчных протоков обычно сопряжены с высоким числом осложнений и рецидивов. В нашей работе мы проанализировали опыт повторных реконструктивных вмешательств по поводу стриктур желчных протоков.

Материалы и методы. С 2000 по 2010 год в клинике по поводу стриктур желчных протоков было оперировано 49 пациентов. По классификации Н. Bismuth, учитывающей уровень стриктуры, пациенты разделились: тип I — 7 (14%), тип II — 25 (51%), тип III — 16 (33%), тип IV — 1 (2%). До поступления в клинику пациенты перенесли оперативные вмешательства: 21 — гепатико-еюностомия, 7 — множественные реконструктивные операции, 9 — дренирование подпеченочного пространства с формированием наружного желчного свища, 6 — чрескожное чреспеченочное дренирование желчного дерева.

Результаты. По поводу стриктур желчных, в том числе и билиарных анастомозов 34 пациентам (69%)

была выполнена реконструкция гепатико-еюноанастомоза, 10 пациентам (20%) был сформирован гепатико-еюноанастомоз со сменным транспеченочным дренированием и 5 пациентам (10%) регепатико-еюноанастомоз был сформирован с применением хирургической методики, предусматривающей широкое выделение долевых протоков (в соответствии с методикой Нерр и Couinad и классификацией S. Strasberg). Послеоперационной госпитальной летальности не было. У 20 пациентов (40%) развились различные гнойно-септические послеоперационные осложнения. За средний период наблюдения, 2,3 года, у 25 (51%) пациентов развились холангит, билиарный цирроз печени либо рестриктуры. Неудовлетворительные отдаленные результаты хирургического лечения пациентов были связаны с уровнем стриктуры (III–IV в соответствии с классификацией по Н. Bismuth) ($p < 0,01$) и вариантом произведенной операции ($p < 0,05$), тогда как хорошие результаты чаще были достигнуты в тех случаях, когда во время оперативного вмешательства для формирования анастомоза

удавалось добиться широкой мобилизации желчных протоков.

Заключение: Успехи *реконструктивных операций при доброкачественных стриктурах желчных протоков* зависят от тяжести повреждения протоков и варианта произведенного реконструктивного вмешательства. Для

предотвращения *рестриктур анастомозов* после первичного вмешательства целесообразно использование хирургической техники, предусматривающей достаточное выделение долевых протоков, позволяющее сформировать билиодигестивные анастомозы с помощью прецизионной техники.

ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В ДИАГНОСТИКЕ СОСТОЯНИЙ ГОМЕОСТАЗА ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА

А.Н. Комлевой, Ю.А. Потапчук, П.П. Ермураки
Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса
Shurik-jan@yandex.ru

По данным литературы, для оценки местного гомеостаза дыхательных путей может быть использовано изучение конденсата влаги выдыхаемого воздуха (КВВВ) методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) [1].

Для определения критериев сдвигов гомеостаза при преморбидных состояниях и различных заболеваниях дыхательной системы важно определение параметров колебаний субфракционного состава КВВВ у здоровых людей [2].

Нами обследованы сдвиги в ЛК-спектрах здоровых юношей и девушек 18–20 лет утром (8⁰⁰) и днем (15⁰⁰). В разные сезоны года суммарный спектр показал изменения вклада частиц диаметром от 2 до 6 нм. Большое значение в процентном вкладе имеют также частицы диаметром от 40 до 85 нм и от 210 до 1300 нм. Установлено, что на протяжении суток незначительно уменьша-

ется вклад частиц диаметром от 2 до 6 нм, но увеличивается вклад частиц свыше 1700 нм.

Интерес представляет изучение сезонных изменений КВВВ, с этой целью проведены сезонные исследования и выявлены определенные различия ЛК-спектров, полученных в осенние, зимние и весенние периоды. Установленные различия могут быть подтверждением роли иммунитета в регуляции системного и местного гомеостаза дыхательных путей.

Литература

1. Бажора Ю.И. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине / Ю.И. Бажора, Л.А. Носкин. — Одесса: Друк, 2002. — 400 с.
2. Комлевой О.М. Лазерна кореляційна спектроскопія конденсату вологи видихнутого повітря / О.М. Комлевой, Ю.І. Бажора // Інтегративна антропологія. — 2010. — № 1 (15) — С. 35–38.

УРОВЕНЬ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ И НОРМАЛЬНЫМ ЗНАЧЕНИЕМ ТРОПОНИНА Т

А.Е. Кратнов, Е.С. Углов, С.Ю. Федотов, Е.Е. Углова
Ярославская государственная медицинская академия, г. Ярославль
kratnov@mail.ru

Выявлено, что некоторые биохимические маркеры активации воспаления у больных с острым коронарным синдромом (ОКС) повышаются и при нормальном значении тропонина Т. Целью исследования было изучение показателей антигена фактора фон Виллебранда в зависимости от уровня тропонина Т у больных с ОКС.

Материалы и методы. В исследование было включено 58 больных с ОКС в возрасте от 34 до 85 лет (средний возраст $62,5 \pm 10$ лет), среди которых 31 (53,4%) пациент был с нестабильной стенокардией и 27 (46,6%) — с инфарктом миокарда. У 21 (58,3%) пациента уровень тропонина Т был менее 0,1 нг/мл. В течение года с момента включения в исследование у 34 (58,7%) пациентов наблюдались повторные коронарные события, из них у 11 (32,4%) больных с нормальным значением тропонина Т.

В сыворотке крови изучались уровни антигена фактора Виллебранда (ФВ:Аг), интерлейкина-6, фактора некроза опухоли α и С-реактивного протеина.

Результаты и обсуждение. При поступлении в стационар у больных с ОКС и повышенным содержанием тропонина Т в крови, по сравнению с показателями пациентов с его нормальным уровнем, были достоверно выше уровни аспаратаминотрансферазы, креатинфосфокиназы, С-реактивного белка, содержание лейкоцитов в периферической крови. У пациентов с ОКС, у которых в течение года наблюдался неблагоприятный исход, при поступлении в стационар выявлялись более высокие показатели относительного количества нейтрофилов в периферической крови и ФВ:Аг ($3,2 \pm 1,2 > 2,3 \pm 0,9$ МЕ/мл; $p = 0,004$). Из изученных показателей у боль-

ных с ОКС и нормальными значениями тропонина Т, у которых в течение года наблюдения развились повторные коронарные события, при поступлении в стационар были достоверно выше только значения ФВ: Аг ($3,9 \pm 1,6 > 2,3 \pm 0,8$ МЕ/мл; $p = 0,009$).

Заключение. Определение антигена фактора Виллебранда может быть рекомендовано с целью прогнозирования риска неблагоприятного исхода у больных с ОКС и нормальным значением тропонина Т.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

В.И. Кресюн, В.В. Годован, О.А. Тымчишин, Д.Ю. Андронов
Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса
olt77@rambler.ru

В рамках доклинического исследования фармакологических свойств изучено методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) влияние нового координационного соединения германия с медью — медь-оксиэтилидендифосфонатогерманата (медгерма) на функциональное состояние печени при остром галактозаминоновом гепатите.

Объектом нашего исследования был выбран супернатант гомогената ткани печени (ГТП) лабораторных животных, который подвергался ЛК-спектроскопии.

Установлено, что в супернатанте ГТП у интактных крыс основной вклад в светорассеивание вносят частицы малого (от 12 до 38 нм) и среднего (от 39 до 95 нм) размеров (в среднем по 49%). На 1-е сутки после введения галактозамина на ЛК-спектрах выявлено значительное увеличение вклада в светорассеивание частиц большого (от 96 до 264 нм) и предельно большого (>264 нм) размеров (в среднем соответственно 21 и 32%) за счет уменьшения вклада частиц малого и среднего размеров.

При профилактическом введении медгерма в среднетерапевтических дозах в течение 7 дней у крыс на

1-е сутки после введения гепатотоксина выявлена аналогичная направленность изменений в ЛК-спектрах. Однако, хотя и увеличивался вклад частиц большого и предельно большого размеров, он был менее выражен (соответственно 11 и 10%).

При курсовом введении медгерма на фоне острого гепатита нормализация спектров супернатанта ГТП наступила к 6 дню. В то же время у крыс, которые не получали медгерм, нормализация ЛК-спектров супернатанта ГТП наступила только к 14 дню.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что супернатант ГТП является ценным источником информации для интегральной оценки функционального состояния печени методом ЛКС. Благодаря этому методу установлено, что профилактическое и курсовое введение медгерма оказывает значительное положительное влияние на тяжесть и течение острого галактозаминонового гепатита, что верифицировано с помощью биохимических и патоморфологических методов.

ПРОДУКЦИЯ АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ РОСТА В ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧКАХ И ЕЕ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

И.И. Крукиер, В.В. Авруцкая, Е.В. Нарезная, А.А. Никашина
ФГУ РНИИАП Минздравсоцразвития РФ, г. Ростов-на-Дону
biochem@rniiap.ru

Нарушение нормального развития беременности во многом зависит от продукции факторов роста, стимулирующих пролиферацию и инвазию трофобласта, контролирующих рост, развитие и регресс сосудов. Указанные процессы могут сопровождаться формированием различных осложнений беременности, в том числе и плацентарной недостаточности (ПН). В настоящее время весьма мало сведений о роли плодных оболочек как посредников передачи информации от материнского организма к плоду, а также динамике регуляторных, биологически активных макромолекул и их влиянии на систему «малых молекул» при осложненной гестации.

Целью работы явилось изучение уровня ангиогенных факторов роста — трансформирующего фактора роста (ТФР-β), сосудисто-эндотелиального фактора роста (СЭФР), а также аргинина и активности аргиназы в плодных оболочках при нормальной беременности и ПН.

Исследовали экстракты плодных оболочек, взятые в 39–40 недель у 47 женщин с ПН, подтвержденной комплексным клинико-лабораторным обследованием (основная группа). Контрольную группу составили 50 женщин с физиологической беременностью. Уровень СЭФР, ТФР-β определяли методом иммуноферментно-

го анализа, используя наборы фирмы «R@D system», аргинина — методом капиллярного зонного электрофореза («Капель-105»), активность аргиназы — колориметрическим методом по приросту мочевины, используя в качестве субстрата аргинин. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного пакета программ Statistica (фирмы StatSoft.Juc.) и Excel-2002.

В результате полученных данных установлено повышение продукции ТФР-β и СЭФР в среднем на 28% при ПН относительно нормы. По-видимому, повышение

СЭФР связано с развитием гипоксии, имеющей место у женщин с ПН и являющейся стимулятором экспрессии СЭФР. Увеличивались также уровень аргинина (на 75%) и активность аргиназы (на 56%). В определенной степени это можно объяснить участием ТФР-β в активации аргиназы, индукцию которой он осуществляет.

Таким образом, нарушение физиологического баланса между изученными показателями, очевидно, влияет на клеточно-молекулярные процессы, регулируемые ими, и в конечном итоге может привести к функциональным повреждениям в системе «мать—плод».

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В СТАРШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЕ

Е.Г. Маевская

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург
katya-mayevskaya@mail.ru

Введение. В отличие от первичной митохондриальной дисфункции возрастная митохондриальная дисфункция (ВМД) в меньшей степени связана с энзимопатиями за счет мутаций. Известно, что ВМД у взрослых сопровождается нарушениями ферментативных реакций с участием витаминов В12, В9, проявляющимися органическими (амино)ацидопатиями.

Целью исследования являлось изучение системных метаболических критериев ВМД и изменений в спектре аминокислотного пула плазмы крови лиц пожилого возраста.

Материал и методы. В исследование взята плазма крови от лиц обоего пола ($n = 32$) возраста $69,8 \pm 1,8$ лет. Митохондриальную дисфункцию оценивали по содержанию лактата в плазме крови. В качестве группы сравнения использовали плазму крови доноров ($n = 12$). Уровни витамина В12 и фолиевой кислоты определялись методом ИФА-анализа. Методами ВЭЖХ-анализа исследовали метилмалоновую кислоту (ММК), янтарную кислоту, спектр аминокислот, общий гомоцистеин (oГци).

Результаты. Уровень витамина В12 ($440,9 \pm 53,8$ пМ) плазмы крови у всех обследованных был в пределах нормы. При этом количество ММК ($4,3 \pm 0,8$ мкМ) у них свидетельствовало о митохондриальном дефиците В12-зависимых коферментных функций. Содержание oГци в изученных образцах колебалось от 5,4 мкМ до 46,7 мкМ и в среднем составило $13,5 \pm 1,2$ мкМ при соответствующей нехватке фолатов ($10,2 \pm 1,5$ нМ) в плазме крови. Уровень метионина был повышен и в среднем составлял $52,2 \pm 19$ мкМ, при снижении уровней валина ($189,9 \pm 16,2$) и изолейцина ($53,4 \pm 7,8$ мкМ). Уровень лактата ($1,74 \pm 0,25$ мМ) в данной группе пациентов был повышен ($p < 0,05$) по отношению к группе сравнения.

Вывод. Выявление метилмалоновой ацидемии в группе старше 65 лет с лактоацидезией дополняет диагноз митохондриальной дисфункции уточнением о ее развитии за счет избытка метионина при дефиците других источников интермедиатов цикла трикарбоновых кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА КРИСТАЛЛОГЕННЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

А.К. Мартусевич^{1, 3}, А.А. Костяев², О.И. Шубина³

¹ Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, Нижний Новгород

² Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, г. Киров

³ Кировская государственная медицинская академия, г. Киров

cryst-mart@yandex.ru

Метаболическая активность микроорганизмов не вызывает сомнений и является одним из основных результатов их жизнедеятельности. В связи с этим данный аспект физиологии агентов микромира достаточно ши-

роко изучен. В то же время некоторые вопросы, подчас касающиеся обеспечения витальных функций бактерий в неблагоприятных условиях окружающей среды, остаются в тени [1, 3]. К таковым следует отнести феномен

микроорганизм-ассоциированного кристаллообразования (МАК). В частности, D. Schuler (1999) была показана способность магнетотактических бактерий к активации кристаллообразования вблизи их и даже внутриклеточно по типу полиморфных одиночных кристаллов (октаэдр, прямоугольники и т. д.). Ранее нами описан дендритный кристаллогенез (фигуры типа «розеток») вокруг микроорганизмов родов *Providencia* и *Morganella* в дне язвы желудка [1]. Эти немногочисленные факты косвенно указывают на способность бактерий являться биорегуляторами кристаллообразования.

Нами произведено моделирование МАК с использованием метода сравнительной тезиграфии [1, 2]. В качестве базисного вещества был применен 10% раствор хлорида натрия. Спектр изучаемых микроорганизмов включал *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* и *Candida Albicans*, причем изучались особенности инициации базисного вещества в зависимости от концентрации микробных тел (разведение биоматериала от 10^{-6} до 10^{-20}). Оценка результатов осуществлялась с помощью специализированной системы критериев [2].

Исследования особенностей инициаторного процесса 10% раствора хлорида натрия в зависимости от концентрации анализируемой культуры микроорганизма позволили установить, что имеет место закономерная динамика нарастания выраженности сдвигов кристаллообразования гипертонического раствора при увеличении содержания микроагента, модулирующего его. При этом наиболее четко просматриваемой особенно-

стью подобного распределения тезиграмм по градации возрастающей иницирующей дозы микроагента является двухступенчатый характер реагирования хлорида натрия на метаболическую активность микроорганизма. Он включает первоначальное отсутствие значимых вариаций по сравнению с контрольным образцом базисного вещества. Далее отчетливо регистрируется концентрация, начиная с которой появляется динамика трансформации кристаллогенеза в краевой зоне. Наконец, третий этап — проявление неокристаллогенеза (по сравнению с контрольной фазией 10% раствора хлорида натрия) в центральной и промежуточной зонах. Конкретное значение данных пороговых концентраций специфично для определенного микроорганизма.

В целом на основании экспериментальных исследований подтверждено наличие феномена микробной инициации кристаллогенеза.

Литература

1. Мартусевич А.К., Зимин Ю.В. Роль физико-химических процессов в системе «микроорганизм—человек» // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. — 2008. — № 3. — С. 112–115.
2. Мартусевич А.К., Камакин Н.Ф. Кристаллография биологической жидкости как метод оценки ее физико-химических свойств // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2007. — Т. 143, № 3. — С. 358–360.
3. Namsaraev E., Baitin D., Bakhlanova I. et al. Biochemical basis of hyper-recombination activity of *Pseudomonas aeruginosa* RecA protein in *Escherichia coli* cells // Mol. Microbiol. — 1998. — Vol. 27, № 4. — P. 727–738.

ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ОШИБОК МЕТАБОЛИЗМА

М.О. Мхеидзе

Медицинская академия последипломного образования, Санкт-Петербург
vamkh@yandex.ru

Наследственные ошибки метаболизма (НОМ), или, как назвал их сэр Арчибальд Гарод (1857–1936), «врожденные ошибки метаболизма» (“Inborn Errors of Metabolism” 1908, 1923) составляют значительную часть всей наследственной патологии человека. Конкретные нозологические формы встречаются редко с широким размахом частот. С внедрением новых современных технологий, в том числе молекулярных методов подтверждения диагноза, перечень нозологических форм НОМ неустанно расширяется. Существенный вклад в возможность ранней диагностики НОМ вносит массовый неонатальный скрининг, включающий в настоящее время в России выявление групп риска по фенилкетонурии, врожденному гипотиреозу, адено-генитальному синдрому, галактоземии и муковисцидозу. Приходится признать, что отсутствие постоянного обеспечения реактивами этой важной программы приносит большой вред здоровью нации и подрывает авторитет отечественной медицинской генетики. Для многих заболеваний, обусловленных наследственными ошибками метаболиз-

ма, в мировой практике хорошо отработаны диагностические алгоритмы, доказательную базу которых составляют высокотехнологичные, чувствительные методы анализа уровня метаболитов и активности ферментов, заключительным этапом диагностики является молекулярное подтверждение диагноза. По мнению автора, в настоящее время в Санкт-Петербурге диагностика наследственных обменных заболеваний далека от оптимального уровня (низкий уровень знаний медицинской генетики у практических врачей, отсутствие специализированных отделений наследственной патологии в крупных стационарах города, отсутствие государственного финансирования дорогостоящего обследования больных при подозрении на НОМ, отсутствие единого информационного центра с информацией о выполняемых в России биохимических и молекулярных методах диагностики НОМ, отсутствие единого и полного регистра НОМ среди жителей города и Ленинградской области).

АСИММЕТРИЧНЫЙ ДИМЕТИЛАРГИНИН В СОСТАВЕ ФРАКЦИИ ОСНОВНЫХ ПЕПТИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

А.А. Овечкин

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург
(812) 499-71-08

В клинической практике вопрос о связи АДМА с артериальной гипертензией (АГ) остается изученным недостаточно, так как АГ может протекать без повышения АДМА. Остается открытым вопрос о роли АДМА в «резервном» состоянии в составе белков и пептидов.

Цель. Изучить уровень свободного АДМА и наличие его в С-концевых остатках в пептидо-белковом материале плазмы крови.

Методы исследования. В работе использована плазма крови 20 больных на фоне артериальной гипертензии. В целях выявления доли АДМА в составе пептидов производные аргинина из экстрактов плазмы крови получали до и после воздействия карбоксипептидазой В. Определение АДМА и других производных аргинина проводили методом ВЭЖХ-анализа с флуоресцентным детектированием.

Результаты. Для изучения данной проблемы была разработана методика получения экстракта плазмы, обогащенного положительно заряженными пептидами

и аминокислотами. Получены данные по изучению свободного и С-концевого АДМА в составе основной фракции пептидов, а также общего гомоцистеина у пациентов с ишемической болезнью сердца и нарушениями функции почек. При обработке карбоксипептидазой экстрактов из 20 образцов в 3 случаях наблюдалось повышение уровня АДМА. Наблюдала положительную корреляцию уровня АДМА с уровнем общего гомоцистеина у больных этой группы. Пептиды, содержащие С-концевые остатки АДМА, могут наряду с АДМА рассматриваться в качестве метаболитов белков, влияющих на образование оксида азота эндотелиальной NOS и на другие реакции, потребляющие аргинин, включая катализируемые аргиназой и уреазой макрофагов.

Заключение. В плазме крови пациентов с высокими уровнями АДМА и гомоцистеина в качестве дополнительного фактора ингибирования энзимов, потребляющих аргинин в качестве субстрата, могут рассматриваться АДМА-содержащие пептиды.

ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Е.И. Рабинович, С.В. Поволоцкая, В.А. Турдакова, С.Н. Соколова

ФГУП Южно-Уральский институт биофизики ФМБА РФ, г. Озерск Челябинской области
lab8@subi.su

Развитие молекулярной генетики кардинально изменило представления о механизмах возникновения новообразований. К настоящему моменту новейшие технологии внедряются на всех этапах онкологической помощи. Наиболее заметные успехи отмечены в развитии лабораторных методов выявления групп онкологического риска, поиске диагностических и прогностических маркеров новообразований. Непосредственное влияние циклических нуклеотидов на пролиферацию и дифференцировку клеток определяет их возможную роль при неопластической трансформации клеток [3]. На основании результатов экспериментального исследования нами был разработан и запатентован метод доклинической диагностики опухолевого роста у экспериментальных животных (патент № 1704563 А1, СССР, МКИ G 01 № 33/48, 1992 г.) [1]. Установлено, что за несколько месяцев до регистрации опухоли морфологическими методами наблюдалось стойкое увеличение соотношения цАМФ/цГМФ, экскретируемых с мочой [2]. При этом развитие лейкозов сопровождалось повышением уровня цАМФ, в то время как при развитии

сарком увеличение соотношения сопровождалось снижением концентрации цГМФ. С целью клинической апробации метода была сформирована группа канцерогенного риска из числа работников радиационно-опасного предприятия. В настоящем исследовании внимание уделено цАМФ, который квалифицируют как сигнал тревоги на клеточном уровне [4]. Определение концентрации цАМФ в моче проводили в режиме мониторинга. Более высокой экскрецией цАМФ отличались пациенты с нарушениями обмена веществ (сахарный диабет, аутоиммунный тиреоидит, нарушения пуринового обмена). Отмечена стабильность возрастной индивидуальной концентрации цАМФ у 73% пациентов. Это открывает возможность проведения экспертной оценки отклонений концентрации цАМФ по отношению к среднему индивидуальному значению. В ходе многолетнего проспективного исследования планируется сравнить динамику уровней циклических нуклеотидов и развития злокачественных опухолей с целью окончательной оценки применимости циклических нуклеотидов в качестве биомаркеров опухолевой трансформации.

Литература

1. Мушкачева Г.С., Кисельгоф Е.И. (Рабинович Е.И.), Лемберг В.К. // Патент 1704563 А1, СССР, МКИ G 01 N 33/48. Способ обнаружения опухолевого процесса у экспериментальных животных. — 1992.
2. Рабинович Е.И., Соколова С.Н. Информативность теста соотношения циклических нуклеотидов при прогнозировании злокачественных опухолей в эксперименте // Вопросы онкологии. — 1996. — Т. 42, № 4. — С. 45–48.
3. Симхович Е.З., Лидак М.Ю., Гилев А.П. Роль циклического АМФ в возникновении и развитии опухолей // Хим-фарм. журнал. — 1978. — Т. 12. — № 6. — С. 17–31.
4. Федоров Н.А., Радуловацкий М.Г., Чехович Г.Е. Циклические нуклеотиды и их аналоги в медицине. — М.: Медицина, 1990. — С. 73–77.

СКРИНИНГ-ДИАГНОСТИКА АДДИКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

Т.М. Рожнова

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

stm-i@yandex.ru

Введение. Увеличение частоты встречаемости и разнообразия форм аддиктивных расстройств, а также ранняя манифестация и резистентность к терапии расстройств поведения зависимого характера определяют актуальность изучения (исследования) этого вида патологии.

Цель. Разработка диагностических критериев выявления психогенетических характеристик, предрасполагающих к аддиктивному поведению в форме алкоголизма и созависимости.

Материал и методы. Обследовано 270 человек из 3 групп изученных семей (семьи больных алкоголизмом и созависимостью, нормативной группы и группы популяции). Используются следующие методы: психопатологическое обследование, молекулярно-генетическое типирование, психодиагностическое тестирование.

Результаты. На основании результатов междисциплинарного исследования разработана модель комплекс-

ного системного подхода в изучении и диагностике аддиктивных расстройств. Данная методика может быть использована в качестве скрининг-диагностики, в т. ч. для выявления индивидуальной предрасположенности к изученным видам зависимого поведения с достоверностью 93–97% с учетом гендерных особенностей, а также для выделения групп высокого риска развития расстройств зависимого характера.

Индивидуальные психогенетические характеристики, полученные в результате мультифакториального анализа изученных признаков, обеспечивают персонализированный подход к терапевтическому процессу, в том числе при проведении системной семейной психотерапии лиц, страдающих аддиктивными расстройствами в форме алкоголизма и созависимости, и могут быть использованы в превентивных методиках.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН МЕТОДАМИ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.К. Сироткин^{1, 2}, П.А. Некрасов¹, В.В. Кузнецов¹

¹ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный университет

alexei.sirotkin@influenza.spb.ru

Одним из эффективных способов предотвращения эпидемий гриппа является своевременная вакцинация. В ряде исследований показано, что иммуногенность вакцин зависит от их структуры и дисперсности. С этой точки зрения интерес представляет сравнительное изучение некоторых импортных и отечественных вакцин с помощью взаимодополняющих методов: лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) и просвечивающей электронной микроскопии (ЭМ).

Методы. Были исследованы субъединичные вакцины «Инфлювак» (Нидерланды), «Агриппал» (Италия),

полимер-субъединичная вакцина «Гриппол» (Россия), живая вакцина А/Н5N1, а также рекомбинантная вакцина М2еНВс на основе поверхностных эпитопов белка М2 вируса гриппа, презетируемых вирусоподобными частицами вируса гепатита В. Использовали электронный микроскоп JEM-1011 (JEOL, Япония) и спектрометр ЛКС-03 (НПО «ИНТОКС»).

Результаты. Субъединичные вакцины «Агриппал», «Инфлювак» и «Гриппол» обладали сходной ультраструктурой, но различными дисперсионными характеристиками. Основной фракцией в этих вакцинах был

гемагглютинин, организованный в «розетки». Вакцина «Инфлювак» по сравнению с вакциной «Агриппал» показала лучшую дисперсность (меньший размер агрегатов) по спектрам ЛКС. Интересно отметить, что в клинических испытаниях вакцина «Инфлювак» индуцировала титры антител в 2 раза выше, чем «Агриппал», при одинаковой антигенной нагрузке. Исследование вакцины «Гриппол» с помощью ЭМ показало, что полиоксидоний в составе вакцины не влияет на структуру антигена, но увеличивает средний размер агрегатов со 100 нм до 235 нм. При исследовании вакцин, содержащих целые

вирусные (вакцина А/Н5N1) или вирусоподобные частицы (вакцина М2еНВс), оказалось, что в области размеров частиц 100–300 нм результаты ЭМ хорошо коррелировали с ЛКС. В то же время частицы рекомбинантной вакцины М2еНВс диаметром 30 нм не выявлялись методом ЛКС.

Закключение. Исследование вакцин с помощью взаимодополняющих методов ЭМ и КЛС позволяет получить информацию, которая может быть использована для усовершенствования технологии производства гриппозных вакцин и увеличения их иммуногенности.

ЛАЗЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ТОКСИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Е.А. Сметюк, М.М. Чеснокова

Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса

Smetyukelena@gmail.com

Как и печень, почки являются одним из самых важных органов детоксикации лекарственных препаратов, а также сильно страдают при длительном и непрерывном приеме противотуберкулезных препаратов (ПТП). Учитывая, что большинство антибиотиков экскретируется почками, нарушение выделительной функции последних предопределяет не только длительную циркуляцию метаболитов, но и нарушение фармакодинамики препаратов.

Фермент глутатион-S-трансфераза М, который является важнейшим фактором защиты от оксидативного стресса и принимает участие во II фазе детоксикации многих соединений, является функционально активным в почках, в тканях которых экспрессируются три класса цитозольных ферментов: кислые, нейтральные и основные. Энзимы последнего класса в норме в моче не обнаруживаются и могут указывать на токсическое поражение тканей почек ПТП [1].

Были обследованы сдвиги в ЛК-спектрах мочи и плазмы крови больных туберкулезом легких, и обнаружена корреляция с результатами исследований плазмы крови.

Наблюдается значительное преобладание спектров с вкладом частиц диаметром 1–50 нм и 51–200 нм, характеризующих интоксикационные и дистрофические изменения, что может быть связано, в первую очередь, с прямой экскрецией низкомолекулярных компонентов плазмы крови [2].

Интересным оказалось преобладание GSTM-null генотипа в группе больных с дистрофически направленными изменениями (частицы диаметром 1–50 нм) (69,6%) по сравнению с группой с интоксикационными изменениями (частицы диаметром 51–200 и 201–600 нм) (45,8%) ($\chi^2 = 2,7$, $p = 0,1$, RR 1,78, CI 0,99–3,65), что можно объяснить биологической функцией фермента.

Литература

1. Hayes J.D., Harrison D.J., Kharbanda R., Cunningham D.S., McLellan L. Distribution of glutathione S-transferase isoenzymes in human kidney: basis for possible markers of renal injury // J. Clin. Pathol. — 1989. — 42. — P. 624–628.
2. Бажора Ю.И. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине / Ю.И. Бажора, Л.А. Носкин. — Одесса: Друк, 2002. — 400 с.

К ВОПРОСУ О ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

Э.Г. Топузov, М.А. Рубцов, Ю.В. Князева, Я.П. Абдуллаев, Ш.И. Галеев

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России,

кафедра хирургических болезней с курсом детской хирургии, Санкт-Петербург

eivcons@mail.ru

Введение. Раннее прогнозирование течения острого панкреатита — чрезвычайно важная задача практической хирургии. Методов, позволяющих своевременно предсказать неблагоприятный сценарий развития заболевания, немного. Большинство многопараметрических балльных систем (Ranson, APACHE II, Imrie) являются предикторами тяжести и исхода панкреатита одновре-

менно, что, на наш взгляд, значительно их обесценивает. Целью настоящего исследования явилось выявление и сравнение между собой ранних предикторов тяжести и исхода острого панкреатита.

Материал и методы. За 9-летний период (с 2000 по 2009 г.) проведен ретроспективный анализ историй болезни 89 пациентов с острым панкреатитом. У 71 был

выявлен тяжелый вариант заболевания (критерии «Атланта 1992»), у 17 легких (подтвержденный КТ с контрастированием). Для идентификации предикторов тяжелого течения острого панкреатита и его неблагоприятного исхода была проведена оценка 237 клинических, лабораторных показателей и данных инструментальных исследований.

Результаты. Унивариантный анализ показал: 5 параметров оказались ценными в прогнозировании тяжести панкреатита: АРАСНЕ II ≥ 8 , С-реактивный белок ≥ 120 мг/л, сывороточная амилаза < 250 ед/л, прокальцитонин $\geq 0,5$ нг/мл, плеврит на обзорной рентгенограмме грудной клетки. Предикторами неблагоприятного исхода заболевания оказались следующие 5, объединенные в 3 группы: 1. ранние панкреатит-специфичные органические нарушения (дыхательная дисфункция, $PO_2/FiO_2 < 250$; почечная, креатинин сыворотки > 150 мкмоль/л; сердечно-сосудистая, модифицированная частота сер-

дечных сокращений ≥ 10); 2. распространенный ($>50\%$) некроз поджелудочной железы по данным КТ; 3. инфицирование очагов деструкции. Ни один из показателей, годных для прогнозирования тяжелого панкреатита, не оказался значимым в предсказании исхода заболевания. Предиктивная значимость 5 параметров в выявлении панкреатита с потенциально неблагоприятным исходом оказалась высока — 88,3%.

Выводы. Предикторы тяжести и исхода острого панкреатита различны. Раннее предсказание заболевания с потенциально неблагоприятным исходом — задача более важная, нежели прогнозирование тяжести. Таким образом, рациональная модель диагностики острого панкреатита должна быть нацелена на разделение двух имеющих разное значение задач: прогнозирование тяжести заболевания и прогнозирование его исхода.

ЗНАЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НЕКЛЕТОЧНОЙ ТКАНИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

С.Н. Шатохина, В.Н. Шабалин
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва
Филиал ГОУ РГМУ НКЦ геронтологии, Москва

В течение 25 лет проводимые нами исследования были посвящены созданию нового научного направления — морфологии биологических жидкостей человека, то есть изучению структур неклочечных тканей. Известно, что интегральную информацию в медицине дают морфологические исследования, которые сосредоточены на клеточных элементах, в то время как практически приемлемых методов морфологического анализа биологических жидкостей до наших исследований не существовало. Важное достоинство нового направления состоит в том, что оно базируется на простых методических приемах, не требующих сложной аппаратуры, дорогостоящих реагентов и дающих возможность четкой интерпретации получаемой морфологической картины.

Установлено, что морфологическая картина биологических жидкостей адекватно отражает как физиологические, так и патологические изменения, происходящие в высокодинамичных пространственно-временных структурах живых организмов. Предлагаемая технология позволяет давать оценку изменений молекулярных структур биологических жидкостей, связанных с эндогенными процессами и экзогенными воздействиями на

организм. Она дает возможность определять физиологические резервы человека, устанавливать характер и глубину патологических изменений, прогнозировать их течение, оперативно оценивать эффективность терапии и давать рекомендации по её коррекции. Технология также позволяет устанавливать характер влияния на человека любых физических и химических факторов. Специфические особенности морфологической картины таких биологических жидкостей, как сыворотка крови, моча, желчь, спинномозговая и синовиальная, слюна, отделяемое раны и др., позволяют доступными методами, еще на стадии предрасположенности, определить тенденции к развитию патологического состояния и предотвратить его возникновение.

Высокая информативность методов морфологического анализа биологических жидкостей, уникальность получаемых данных, их простота и широкая доступность, экономичность и достоверность диагностических данных на самых ранних этапах развития патологических процессов открывают широкие перспективы этому направлению в клинической медицине.

ГАЛЕКТИН-1 В ДИАГНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.Д. Якушина, О.А. Васильева

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России,
г. Томск
yakushinavd@mail.ru

Возможной мишенью для создания новых терапевтических средств и диагностических подходов в онкологии является галектин-1. Повышенная экспрессия данного лектина была обнаружена в клетках различных опухолей, включая астроцитому, меланому, рак простаты, щитовидной железы, толстой кишки, мочевого пузыря, яичников и гепатоцеллюлярную карциному [2]. В большинстве случаев повышенная экспрессия галектина-1 коррелировала с более агрессивным фенотипом опухолей и способностью к метастазированию.

Галектин-1 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-1 может влиять на иммунный ответ и, тем самым, способствовать

уходу опухолевых клеток из-под иммунологического надзора [1].

Учитывая вышесказанное, галектин-1 может рассматриваться в качестве нового онкомаркера. В настоящее время для оценки уровня галектина-1 в научно-исследовательских целях применяют методы иммуногистохимического и иммуноферментного анализа.

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

Литература

1. Galectin-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma aggressiveness / Spano D. et al. // Mol. Med. — 2010. — Vol. 16. — P. 102–115.
2. Rabinovich G.A. Galectin-1 as a potential cancer target / G.A. Rabinovich // Br. J. Cancer. — 2005. — Vol. 92, № 7. — P. 1188–1192.

ИЗДАТЕЛЬСКО-ПОЛИГРАФИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ КОСТА

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

Мы сделали Вашу рукопись Книгой

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**