

ISSN 1728-2918

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ

2014

1

МЕДИЦИНА

MOLEKULIARNAIA
MEDITSINA

www.rusvrach.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1/2014

ОБЗОРЫ

Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Северин С.Е.
Аналоги соматостатина в качестве векторных молекул для создания таргетных противоопухолевых препаратов. 3

Мирзаев К.Б., Сычев Д.А., Андреев Д.А.
Этнические особенности в Российской Федерации полиморфизма гена *CYP2C19*, ассоциированного с нарушением ответа на клопидогрел 13

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Долинский А.К., Толибова Г.Х., Траль Т.Г., Беженарь В.Ф.
Молекулярная оценка миогенеза и состояния рубца на матке после миомэктомии при различных хирургических вмешательствах 22

Герштейн Е.С., Николаев А.Н., Короткова Е.А., Делекторская В.В., Головков Д.А.
Инсулиноподобные факторы роста в сыворотке крови больных колоректальным раком 28

Костылева О.И., Масляев А.В., Ермилова В.Д., Высоцкая И.В., Грицкевич М.В., Овчинникова Л.К., Портной С.М.
Инсулиноподобные факторы роста в сыворотке крови больных раком молочной железы 33

Алейников А.С., Гайдук И.В., Кушлинский Н.Е.
Исследование провоспалительных цитокинов фактора некроза опухолей α и интерлейкина 6 в слюнном секрете больных хроническим протоковым сиаладенитом. 37

Кушлинский Н.Е., Бабкина И.В., Кузнецов И.Н., Короткова Е.А., Тен Е.А., Булычева И.В., Соловьев Ю.Н., Алиев М.Д.
Ассоциированные с опухолью матриксные маталлопротеиназы в сыворотке крови больных первичными саркомами костей 43

Соловых Е.А., Караогланова Т.Б., Кушлинский Н.Е.
Матриксные маталлопротеиназы и заболевания пародонта. 47

Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Иванов В.В., Носарева О.Л., Дзюман А.Н., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.
Свободнорадикальное окисление белков и липидов в адипоцитах в условиях окислительного стресса. 59

НОВОСТИ НАУКИ 27, 32, 46

Решением Президиума ВАК журнал «Молекулярная медицина» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации ПИ №ФЦ77-50064 от 04.06.12

Редакция не имеет возможности возвращать рукописи

За содержание рекламных материалов редакция ответственности не несет.

Тираж 200 экз.

Редактор Г.А. Суворова Корректор М.Е. Щербакова Верстка Р.Р. Саргсян Компьютерный набор Е.А. Козловская Выход в свет 26.02.14. Формат 60×90/8. Заказ 14447 Цена свободная	Адрес редакции и издателя: 119048, Москва, ул. Усачева, 11, корп. 17 (1-й этаж) E-mail: belushkina@rambler.ru E-mail: verstka@rusvrach.ru Секретариат: 8-499-246-84-02 Отдел подписки: 8-499-246-79-83 Web-site: www.rusvrach.ru
Отпечатано в ООО «Ай-клуб», 119146, Москва, Космопольский пр., д. 28	Подписной индекс по каталогу Роспечать 82141

Р Учредитель и издатель Издательский дом «Русский врач»
Генеральный директор Г.С. Зольникова

Главный редактор М.А. Пальцев, академик РАН, Москва, Россия	
Редколлегия журнала ответственный секретарь	
Н.Н. Белушкина	д.б.н., профессор, Москва, Россия чл.-корр. РАН,
К.В. Анохин	Москва, Россия
А.В. Васильев	д.б.н., профессор, Москва, Россия
О.А. Голубничная	профессор, Бонн, Германия
А.И. Григорьев	академик РАН, Москва, Россия
А.Д. Дурнев	чл.-корр. РАН, Москва, Россия
А.В. Караулов	чл.-корр. РАН, Москва, Россия
И.М. Кветной	д.м.н., профессор, С.-Петербург, Россия
В.И. Киселев	чл.-корр. РАН, Москва, Россия
Л.С. Коков	чл.-корр. РАН, Москва, Россия
Н.Е. Кушлинский	чл.-корр. РАН, Москва, Россия
С.В. Нетесов	чл.-корр. РАН, Новосибирск, Россия
Е.М. Пальцева	д.м.н., Москва, Россия
В.О. Полякова	д.б.н., профессор, С.-Петербург, Россия
В.О. Попов	чл.-корр. РАН, Москва, Россия
Д.Ф. Свааб	профессор, Амстердам, Нидерланды
Е.С. Северин	чл.-корр. РАН, Москва, Россия
С.Е. Северин	чл.-корр. РАН, Москва, Россия
Д.А. Сычев	д.м.н., профессор, Москва, Россия
Ж.-П. Тиммерманс	профессор, Антверпен, Бельгия
Редакционный совет	
А.И. Арчаков	академик РАН, Москва, Россия
В.А. Быков	академик РАН, Москва, Россия
А.Н. Коновалов	академик РАН, Москва, Россия
В.П. Скулачев	академик РАН, Москва, Россия
В.Н. Смирнов	академик РАН, Москва, Россия
В.А. Ткачук	академик РАН, Москва, Россия
А.А. Тотолян	чл.-корр. РАН, С.-Петербург, Россия
Р.М. Хаитов	академик РАН, Москва, Россия
Н.А. Яицкий	академик РАН, С.-Петербург, Россия

CONTENT

1/2014

REVIEWS

- Moskaleva E.Yu., Semochkina Yu.P., Rodina A.V., Severin S.E.**
Somatostatin analogs as vector molecules for targeted delivery of anticancer drugs 3
- Mirzaev K.B., Sychev D.A., Andreev D.A.**
Ethnic differences of the *CYP2C19* gene polymorphism associated with the violation of the response to Clopidogrel in the Russian Federation 13

ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Dolinskiy A.K., Tolibova G.Kh., Tral' T.G., Bezhenar' V.F.**
Molecular estimation of myogenesis and state of uterine scar after myomectomy in different surgical approaches 22
- Gershtein E.S., Nikolayev A.A., Korotkova E.A., Delektorskaya V.V., Golovkov D.A.**
Inculin-like growth factors in serum of colorectal cancer patients. 28
- Kostyleva O.I., Maslyaev A.V., Ermilova V.D., Vysotskaya I.V., Gritskovich M.V., Ovchinnikova L.K., Portnoy S.M.**
Inculin-like growth factors in the serum of breast cancer patients 33
- Aleynikov A.S., Gaiduk I.V., Kushlinskii N.E.**
The content of proinflammatory cytokines of TNF α and IL6 in parotid salivary fluid in ductal chronic sialadenitis patients 37
- Kushlinskii N.E., Babkina I.V., Kuznetsov I.N., Korotkova E.A., Ten E.A., Bulycheva I.V., Solovov Yu.N., Aliev M.D.**
Tumor-associated metalloproteinases in serum of primary bone sarcoma patients 43
- Solovykh E.A., Karaoglanova T.B., Kushlinskii N.E.**
Matrix metalloproteinases and periodontal diseases 47
- Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Ivanov V.V., Nosareva O.L., Dzuman A.N., Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V.**
Free radical oxidation of proteins and lipids in adipocytes under conditions of oxidative stress 59

SCIENCE NEWS 27, 32, 46

On Decision of the Presidium of HAC the Journal «Molecular Medicine» is included in the list of master/peer-reviewed/ scientific journals and publications, in which the main results of theses for the degree of doctor and candidate of sciences should be published

Indexed in Russian Research Citing Index

The journal was registered by the Press Committee of the Russian Federation under №ФЦ77-50064 on June 04, 2012. Reproduction of materials elsewhere or duplication of the materials published in the journal, in whole or in part, is not permitted without the written consent of the Russkiy Vrach (Russian Physician) Publishing House. The editors have no opportunity of returning manuscripts. The editors provide no warranty as to the contents of advertisements.
Circulation 200 copies.

<p>Editor G.A. Suvorova Proof-reader M.Ye. Scherbakova Maker-up R.R. Sargsyan Computerized compositor Ye.A. Kozlovskaya Signed for publication 26.02.14. Format 60×90/8. Order 14447</p> <p>Printed at the «I-Club» printing-house: 28, Komsomolskiy prospect, Moscow, 119146</p>	<p>Address of the editorial office and publisher 119048, Moscow, 11, Usacheva St., corp. 17 (1st floor)</p> <p>E-mail: belushkina@rambler.ru E-mail: verstka@rusvrach.ru Secretariat: 8-499-246-84-02 Subscription department: 8-499-246-79-83 Web-site: www.rusvrach.ru</p> <p>Respechat catalogue subscription index 82141</p>
---	---

Editor-in-Chief	
M.A. Paltsev,	
PhD, MD, Acad. RAS, Moscow, Russia	
Editorial board	
Executive secretary	
Natalia N. Belushkina	PhD, D.Sci. (Biol), Prof., Moscow, Russia
Konstantin V. Anokhin	PhD, MD, Corr. Memb. of RAS, Moscow, Russia
Andrei V. Vasilev	PhD, D.Sci. (Biol), Prof., Moscow, Russia
Olga A. Golubnitschaja	PhD, MD, Prof., Bonn, Germany
Anatolii I. Grigorev	PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Andrei D. Durnev	PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. of RAMS, Moscow, Russia
Alexandr V. Karaulov	PhD, MD, Sci. Corr. Memb. of RAMS, Moscow, Russia
Igor M. Kvetnoy	PhD, MD, Prof., Saint-Petersburg, Russia
Vsevolod I. Kiselev	PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. of RAMS, Moscow, Russia
Leonid S. Kokov	PhD, MD, Corr. Memb. of RAMS, Moscow, Russia
Nikolai E. Kushlinsky	PhD, MD, Corr. Memb. of RAMS, Moscow, Russia
Sergei V. Netesov	PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. of RAS, Novosibirsk, Russia
Ekaterina M. Paltseva	PhD, MD, Moscow, Russia
Viktoriya O. Polyakova	PhD, D.Sci. (Biol), Prof., Saint-Petersburg, Russia
Vladimir O. Popov	PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. RAS, Moscow, Russia
Evgenii S. Severin	PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. RAS, Moscow, Russia
Sergei E. Severin	PhD, D.Sci. (Chem), Corr. Memb. RAMS, Moscow, Russia
Dmitrii A. Sychev	PhD, D.Sci. (Biol), Moscow, Russia
Dick F. Swaab	PhD, MD, Prof., Amsterdam, the Netherlands
Jean-Pierre Timmermans	PhD, Prof., Antwerp, Belgium
Editorial committee	
Alexander I. Archakov	PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Valerii A. Bykov	PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Alexander N. Konovalov	PhD, D.Sci. (Med), Acad. RAS, Moscow, Russia
Vladimir P. Skulachev	PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Vladimir N. Smirnov	PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Vsevolod A. Tkachuk	PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Areg A. Totolyan	PhD, D.Sci. (Med), Corr. Memb. RAMS, Saint-Petersburg, Russia
Rakhim M. Khaïtov	PhD, D.Sci. (Med), Acad. RAS, Moscow, Russia
Nikolai A. Yaitsky	PhD, D.Sci. (Med), Acad. RAS, Saint-Petersburg, Russia

АНАЛОГИ СОМАТОСТАТИНА В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРНЫХ МОЛЕКУЛ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Е.Ю. Москалева, доктор биологических наук, профессор,
Ю.П. Семочкина, А.В. Родина, кандидат биологических наук,
С.Е. Северин, доктор химических наук, член-корреспондент РАН

НИЦ «Курчатовский институт», 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

E-mail: moskalevaey@mail.ru

Направленный транспорт – новое направление, целью которого является создание противоопухолевых препаратов с высокой избирательностью действия благодаря использованию векторных молекул. Таргетные препараты представляют собой конструкции, состоящие из 3 компонентов: векторной молекулы, противоопухолевого препарата или радионуклида и линкера, или полимерного наноразмерного носителя цитотоксических препаратов. Наиболее перспективными векторами для таргетных противоопухолевых препаратов могут быть пептидные аналоги соматостатина. Рецепторы соматостатина по сравнению с нормальными тканями гиперэкспрессированы на опухолях нейроэндокринной природы и опухолях других типов и поэтому могут служить хорошей мишенью для обеспечения избирательного действия таргетных препаратов на основе аналогов соматостатина, в том числе при включении таких пептидов в состав полимерных наноразмерных носителей цитотоксических веществ. Такие векторные наноносители должны обеспечивать длительную циркуляцию в периферической крови для улучшения фармакокинетики препаратов и избирательность их действия в отношении опухоли по сравнению с нормальными тканями. Обзор посвящен анализу разработанных подходов для использования аналогов соматостатина в создании таргетных противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: соматостатин, аналоги соматостатина, октреотид, рецепторы соматостатина, направленный транспорт, таргетные препараты, противоопухолевые препараты

SOMATOSTATIN ANALOGS AS VECTOR MOLECULES FOR TARGETED DELIVERY OF ANTICANCER DRUGS

E. Yu. Moskaleva, Yu. P. Semochkina, A. V. Rodina, S. E. Severin

National Research Center «Kurchatov Institute», Russian Federation, 123182, Moscow, Akademika Kurchatova pl., 1

Targeted delivery of anticancer drugs is a new direction aimed to delivery preparations capable of enhancing selectivity of action of drugs owing to the use of vector molecules. Targeted drug delivery system is the construction that includes three components: the vector molecule, the cytotoxic antitumor drug or radionuclide and linker or polymeric nanocarrier for cytotoxic drug. The most promising vectors for the delivery of targeted drugs are peptide analogs of somatostatin. The somatostatin receptors are the potential targets for antitumor drug delivery because they are overexpressed in most neuroendocrine and other tumors compared with normal tissues and it is possible to apply somatostatin analogs as vectors in nanoscale delivery system. Such nanocarriers should combine persistent blood circulating to improve pharmacokinetics of the loaded agent, for effective tumor cells killing and for selective distribution to the tumor lesion if comparing with healthy tissues. This review is focused on current strategies used for targeted delivery of anticancer drugs with the use of somatostatin analogs.

Key words: somatostatin, somatostatin analogs, octreotide, somatostatin receptors, targeted drug delivery, targeted drugs, antitumor drugs

ВВЕДЕНИЕ

Основными причинами недостаточной эффективности химиотерапии злокачественных опухолей является низкая избирательность действия противоопухолевых препаратов в отношении опухолевых клеток, что приводит к глубокому повреждению нормальных тканей и развитию побочных эффектов. Кроме того, длительное применение химиотерапии способствует развитию множественной лекарственной устойчивости, что снижает эффективность используемых препаратов.

В настоящее время для преодоления указанных проблем разрабатываются препараты, способные связываться со специфическими детерминантами на поверхности клеток-мишеней, благодаря введению в

их состав адресных (или, иначе, векторных) молекул. Использование адресного компонента обеспечивает взаимодействие системы избирательной доставки со строго определенными клетками и тканями, в частности, опухолевыми. Такие векторные лекарственные препараты получили название таргетных препаратов, или систем направленного транспорта.

Векторными молекулами могут служить физиологические лиганды рецепторов факторов роста, гормонов или онкофетальных белков, т.е. сами факторы роста, гормоны и онкофетальные белки или их рецепторспецифические фрагменты, а также моноклональные антитела к раковоспецифическим белкам поверхности опухолевых клеток. Несмотря на то, что в настоящее время в сфере клиническо-

го применения наиболее разработанной областью является использование терапевтических моноклональных антител, векторные пептиды при создании систем направленного транспорта имеют ряд преимуществ. К таким преимуществам можно отнести небольшой размер пептидов, простоту и доступность их синтеза, способность к быстрой интернализации и накоплению в клетках-мишенях. При этом противоопухолевый препарат должен быть непосредственно соединен с вектором либо введен в состав полимерных биodeградируемых наночастиц, нагруженных лекарством и покрытых векторными молекулами. Использование таких векторных «наноконтейнеров» позволяет не только повысить концентрацию терапевтического агента, поступающего в клетку-мишень, но и обеспечить избирательность доставки.

Связывание векторной молекулы со специфическим рецептором на поверхности клетки-мишени индуцирует процесс рецепторопосредованного эндоцитоза, который и обеспечивает накопление лекарственного препарата в опухолевых клетках. Использование противоопухолевых препаратов в составе систем направленного транспорта обладает еще одним преимуществом: такие препараты не индуцируют множественную лекарственную устойчивость и позволяют преодолевать уже существующую лекарственную устойчивость опухолей.

В качестве векторных молекул при разработке таргетных противоопухолевых препаратов большой интерес представляют некоторые гормоны и их аналоги, агонисты и антагонисты. В частности, для создания систем направленного транспорта, предназначенных для лечения некоторых типов опухолей, активно изучается возможность использования в качестве векторных молекул производных соматостатина (ССТ, или соматотропин-ингибирующего гормона). Рецепторы ССТ (ССТРе), как будет показано далее, в большом количестве присутствуют в различных опухолях нейроэндокринного происхождения, включая рак молочной железы, яичников, желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы, легких и предстательной железы, но отсутствуют на поверхностной мембране большинства неизмененных клеток и поэтому могут служить хорошей мишенью для избирательной элиминации опухолей, экспрессирующих ССТРе.

Цель настоящего обзора – анализ современного состояния проблемы создания таргетных препаратов с использованием в качестве векторных молекул аналогов ССТ для избирательной доставки противоопухолевых препаратов в опухолевые клетки-мишени.

ХАРАКТЕРИСТИКА ССТ И ЕГО АНАЛОГОВ

ССТ – полипептидный гормон, нейропептид, оказывающий мощное ингибирующее действие на секрецию некоторых гормонов. Он обнаружен в различных участках нервной системы: коре головного мозга, мозжечке, гипоталамусе и спинном мозге,

а также в желудочно-кишечном тракте, включая поджелудочную железу. У млекопитающих известно 2 варианта этого гормона: ССТ-14 и ССТ-28 (полипептиды, содержащие соответственно 14 или 28 аминокислотных остатков). Оба пептида являются продуктом процессинга просоматостатина – полипептида, содержащего 92 аминокислотных остатка, ген которого у человека располагается в длинном плече хромосомы 3. ССТ-14 более широко представлен в панкреатических островках, желудке, периферической и центральной нервной системе (ЦНС), а также в сетчатке глаза. ССТ-28 обнаруживают в головном мозге (до 30% от общего количества ССТ в мозге), а также в тонкой кишке. Обе формы ССТ оказывают 2 типа эффектов в отношении клеток-мишеней: подавление секреции и ингибирование пролиферации клеток [31, 55].

ССТ ингибирует высвобождение гормона роста, инсулина, глюкагона, холецистокининов, гормонов поджелудочной железы, секрецию желудочного сока и подавляет пролиферацию многих нормальных и опухолевых клеток [50, 55]. В ЦНС ССТ модулирует нейротрансмиссию. По механизму действия этот эффект реализуется также в результате угнетения высвобождения нейромедиаторов.

Природный ССТ обладает очень коротким периодом полураспада в периферической крови (<3 мин), поэтому при создании терапевтических препаратов используют не природный гормон, а его более стабильные аналоги, которые также способны оказывать ингибирующее действие на пролиферацию опухолевых клеток и рост опухолей некоторых типов [15, 55]. Прямой антипролиферативный эффект ССТ и его аналогов обусловлен связыванием этих соединений с рецепторами на поверхности опухолевых клеток, что приводит к ингибированию их пролиферации и(или) индукции апоптоза. Непрямой антипролиферативный эффект ССТ и его аналогов обусловлен ингибированием высвобождения ростовых и трофических факторов под действием ССТ и ингибированием ангиогенеза. В настоящее время синтезирован и изучен ряд аналогов ССТ. Среди них наиболее хорошо охарактеризованы и используются в клинике октреотид, ланреотид и пасиреотид. Структура природных ССТ (ССТ-28 и ССТ-14) и синтетических аналогов, применяемых в терапии опухолей и некоторых других заболеваний, представлена на рисунке, из которого видно, что для повышения стабильности пептидов в их состав введены неприродные D-аминокислоты, а для аналога JF-07-69 использован еще и пептидный линкер [48].

Эффективность аналогов соматостатина доказана при симптоматической терапии секретирующих гормоны эндокринных опухолей желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы (карциноиды, ВИПоМы, глюкагономы, гастриномы, инсулиномы), нейроэндокринных опухолей [1, 55]. Первоначально октреотид использовали в виде препарата для подкожного введения в дозе 100–500 мкг

2–3 раза в день из-за небольшого периода полураспада, составляющего 2 ч. Он был эффективен при острых ситуациях (например, при язвенных кровотечениях), а для продолжительного лечения опухолей из-за необходимости частых инъекций не использовался. Позднее был разработан эффективный препарат октреотида пролонгированного действия в виде микросфер для приготовления суспензии, который можно было вводить 1 раз в месяц. Его эффективность, в том числе оцениваемая по уменьшению связанных с карциноидным синдромом симптомов (обезвоживание и диарея), оказалась высокой [36]. Позднее в проспективном рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании противоопухолевой активности октреотида LAR было доказано, что этот препарат эффективен не только для симптоматического лечения, но и для стабилизации прогрессии опухолей [33].

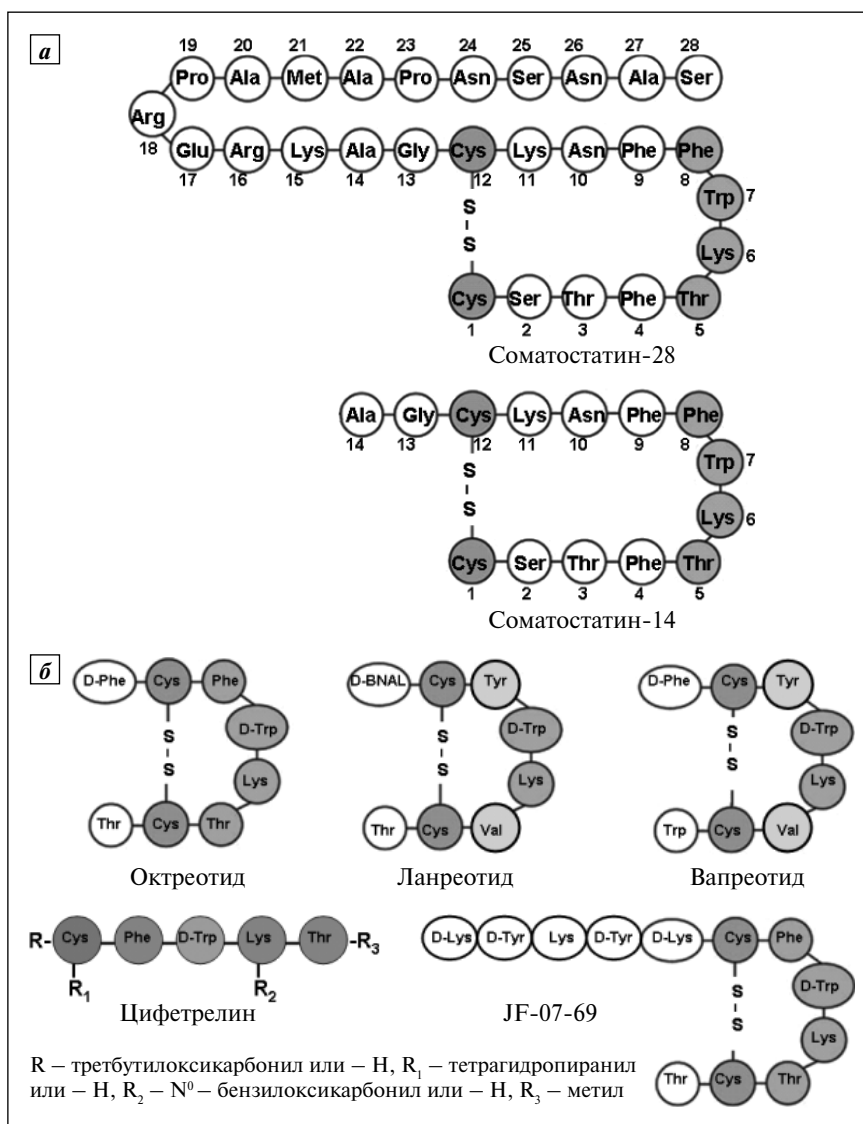
Недавно в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДнТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН синтезирован новый аналог соматостатина, получивший название цифетрелин [2, 3]. В отличие от использовавшихся до последнего времени препаратов этого ряда он является не циклической, а линейной молекулой и представляет собой метиловый эфир N'-третбутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранилцистеинил фенилаланил-D-триптофил N'-карбобензоксизилитреонина (см. рисунок). Все реакционноспособные боковые группы в молекуле цифетрелина защищены третбутилоксикарбонильной, бензилоксикарбонильной и тетрагидропиральной группами, благодаря чему он частично сохраняется в кислой среде желудка [3]. Показано, что цифетрелин обладает широким спектром противоопухолевого действия и оказывает умеренный противоопухолевый эффект в дозах 1–25 мг/кг на моделях опухолевого роста при перевиваемых опухолях аденокарциномы молочной железы (линия Ca755), раке шейки матки (РШМ-5), эпидермоидной карциноме легких (линия LLC) и аденокарциноме толстой кишки (АКА-ТОЛ); при этом оптимальной была доза цифетрелина 1 мг/кг.

Механизм действия ССТ и его аналогов на клетки определяется их взаимодействием со специфическими рецепторами этого гормона.

ТИПЫ И ХАРАКТЕРИСТИКА ССТРЕ

Многочисленные экспериментальные данные о свойствах ССТРе и их роли в регуляции клеточной активности обобщены в обзорах [6, 16, 17, 31, 41, 51], поэтому ниже приводятся ссылки только на отдельные исследования, а сведения об остальных первоисточниках могут быть получены из указанных обзоров.

Для изучения ССТРе был использован метод молекулярного клонирования. мРНК выделяли из клеток островков поджелудочной железы человека. Были получены клоны всех типов ССТРе человека и различных видов животных (мышей, крыс, свиней): ССТРе1–5 и 2 подтипа для ССТРе2: ССТРе2А и ССТРе2В. Для гена ССТРе2 установлено наличие «скрытого» интрона на 3'-конце, что приводит к альтернативному сплайсингу и в итоге к образованию 2 вариантов конечного продукта: более длинному ССТРе2А и укороченному (у человека – на 13 аминокислотных остатков) ССТРе2В. Таким об-



Структурная формула природных ССТ (а) и их синтетических аналогов (б)

разом, данные варианты различаются лишь длиной С-конца (а именно эта часть рецептора погружена в цитоплазму). В целом идентичность нуклеотидной последовательности у членов семейства ССТРе составляет 39–57%. В 7-м трансмембранном домене расположен высококонсервативный участок, обнаруженный у всех подтипов ССТРе человека и животных: YANSCANPILY. При этом следует отметить, что у разных представителей семейства ССТРе в положении 9 может находиться либо изолейцин, либо валин. У человека, как у и большинства видов животных, валин заменяет изолейцин в ССТРе5. ССТРе человека содержат сайты гликирования (от 1 до 4 для разных подтипов рецепторов), расположенные в области 2-й внеклеточной петли и на N-концевом участке. Сайты, предназначенные для фосфорилирования протеинкиназами А и С и киназой кальмодулина II, расположены на С-концевом участке, а также в области 2-й и 3-й внутриклеточных петель. Все подтипы ССТРе человека, кроме ССТРе3, содержат цистеин, расположенный на 12 аминокислотных остатков ниже 7-го трансмембранного домена, который, как полагают, может служить для «заякоривания» рецептора в цитоплазматической мембране. Ковалентное связывание остатка цистеина с пальмитиновой кислотой может приводить к образованию 4-й цитоплазматической петли. ССТРе3, у которого в указанной позиции вместо цистеина присутствует лейцин, отличается в среднем в 1,5 раза большей длиной цитоплазматического конца (102 аминокислотных остатка по сравнению с 64 – у ССТРе1, 66 – у ССТРе2А, 74 – у ССТРе4 и 56 – у ССТРе5) [31].

Описано присутствие в одной клетке нескольких подтипов ССТРе, что позволяет допустить возможность их взаимодействия [31, 41]. В частности, было предположено функционирование ССТРе в виде гомо- и гетеродимеров и подтверждена такая возможность. Так, при трансфекции клеток линии СНО-К1 мутантными генами ССТРе5 человека, дефектными по 2 различным показателям: связыванию с лигандом (мутация во 2-й внеклеточной петле) и способности ингибировать аденилатциклазу (мутация в области С-конца), показано, что при трансфекции клеток отдельными мутантными формами сохранялись описанные функциональные дефекты, при котрансфекции обеими формами происходило усиление угнетения активности аденилатциклазы, индуцированной форсколином.

При использовании метода флюоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) получены данные, свидетельствующие об увеличении процента димеров ССТРе5 в ответ на воздействие агониста. Аналогичные результаты получены при котрансфекции клеток ССТРе1 и мутантным ССТРе5: учитывая, что ССТРе1 не стимулируется октреотидом, а ССТРе5 был дефектен по влиянию на аденилатциклазу, ингибирование аденилатциклазы в котрансфицированных клетках в ответ на воздействие октреотидом

можно трактовать как следствие гетеродимеризации. При этом стимуляция октреотидом приводила также к увеличению экспрессии ССТРе1, что обычно происходит лишь при воздействии на ССТРе1 его естественного агониста ССТ-14 [35].

В некоторых линиях опухолевых клеток продемонстрировано влияние ССТРе1 и ССТРе5 на рецептор фактора роста эпидермиса (ЭГФРе): при коэкспрессии данных рецепторов наблюдали снижение фосфорилирования ЭГФРе и уменьшение активации митогенактивируемого протеинкиназного (МАРК) комплекса, индуцированного связыванием ЭГФРе со своими агонистами. Котрансфекция клеток НЕС293 ССТРе1 и особенно ССТРе1 в сочетании с ССТРе5 приводила к уменьшению фосфорилирования р38 и угнетению сигнального каскада Р13К/АКТ, индуцированного стимуляцией ЭГФРе. Отдельно для ССТРе1 продемонстрирована способность препятствовать образованию комплекса ЭГФРе/ErbB2, в то время как в присутствии ССТРе5 именно этот подтип рецептора связывается с ЭГФРе, с диссоциацией комплексов ССТРе1/ЭГФРе и ЭГФРе/ErbB2. Эти взаимодействия представляют значительный интерес в плане разработки новых подходов для лечения опухолей [20]. Практически для всех ССТРе обнаружено образование гомо- и гетеродимеров на том или ином этапе функционирования. Лишь ССТРе1 остается в мономерной форме как в неактивном состоянии, так и при стимуляции агонистом. Образование гетеродимеров в рамках семейства ССТРе продемонстрировано для ССТРе1/5, ССТРе2/5, ССТРе4/5 и ССТРе2/3, но комплексов типа ССТРе1/4 не обнаруживалось [41].

Получены также данные о коэкспрессии и функционировании в клетках в качестве гетеродимеров для ССТРе2, -5 и рецепторов к дофамину 2-го типа (ДРе2) [34, 41]. ДРе2 также принадлежит к семейству G-белков и реализует свое действие через ингибирующий белок Gi. Их способность повышать функциональную активность друг друга установлена в экспериментах при котрансфекции клеток СНО-К1 геном ССТРе5, мутантным по С-концевому участку, и нормальным геном ДРе2. Коэкспрессия 2 генов приводила к восстановлению эффекта ССТРе5 в ответ на стимуляцию ССТ, в то время как в отсутствие ДРе2 дефектный ССТРе5 не влиял на активность аденилатциклазы.

Дополнительным подтверждением этого межрецепторного взаимодействия послужил тот факт, что добавление сульпирида, антагониста ДРе2, полностью отменяло эффект ССТ. Использование же метода FRET позволило подтвердить ассоциацию ССТРе5 и ДРе2 при воздействии агониста любого из рецепторов, в то время как антагонист ДРе2 вызывал диссоциацию рецепторных комплексов [34].

Одна клетка может одновременно экспрессировать несколько разных подтипов ССТРе, представленных в разных соотношениях. В поджелудочной железе основными мишенями для ССТ являются

β -клетки, секретирующие инсулин, и α -клетки, секретирующие глюкагон. Ранее было показано, что в β -клетках человека экспрессируются преимущественно ССТРе1 и 5, а в α -клетках – ССТРе2 [31]. Но позднее [39] было обнаружено, что угнетение секреции инсулина β -клетками происходит за счет ССТРе2, а не ССТРе1 или 5, хотя ССТРе2 обнаруживают лишь в 46% β -клеток, в то время как ССТРе5 – в 100%, а ССТРе1 – в 87%. Для α -клеток не наблюдалось подобного расхождения между количеством ССТРе и их функциональной активностью: по степени ингибирующего воздействия на секрецию глюкагона рецепторы образовывали следующий ряд: ССТР2>ССТР1>ССТР5.

ССТРе широко представлены в головном мозге. Известно, что в тканях гипофиза взрослого человека обнаруживают ССТРе всех типов, кроме ССТРе4, а в отношении секреции гормона роста и тиреотропного гормона основную роль играют ССТРе5 и ССТРе2. В клетках иммунной системы (на макрофагах, Т- и В-клетках) в основном представлены ССТРе2. Все рецепторы, кроме ССТРе5, обладают более высоким сродством к ССТ-14, в то время как ССТРе-5 – к ССТ-28 [6].

В табл. 1 приведены сведения о связывании стабильных аналогов ССТ с различными типами ССТРе, позволяющие заключить, что и ССТ-14, и его синтетические аналоги с наиболее высокой аффинностью связываются с ССТРе2 и ССТРе5. В то же время связывание перечисленных аналогов с ССТРе1, ССТРе3 и особенно с ССТРе4 было значительно ниже, чем ССТ-14.

ССТРе обнаружены в различных типах опухолевых клеток: в опухоли гипофиза (клетки линии AtT-20), поджелудочной железы (линия AR42J), молочной железы (линия MCF7) и др. В нейроэндокринных опухолях обнаруживают все подтипы ССТРе, но чаще встречается ССТРе4. В целом наиболее часто встречается ССТРе2а. Рецептор ССТРе5 практически всегда обнаруживается в клетках пролактиномы человека, но его способность ингибировать секрецию пролактина коррелирует с чувствительностью опухоли к дофамину: при отсутствии чувствительности пропадает и эффект от ССТ. Подобный феномен, как уже было указано, может объясняться тем, что ССТРе способны функциониро-

вать в качестве гомо- и гетеродимеров с другими рецепторами и, в частности, с рецепторами к дофамину 2-го типа [16, 41]. Для рака предстательной железы показано увеличение количества ССТРе2 в несколько раз в процессе усиления нейроэндокринной дифференцировки клеток [16].

При связывании агонистов с ССТРе происходит интернализация комплекса агонист – рецептор в результате рецепторопосредованного эндоцитоза [17, 51]. Этот механизм представляет большой интерес в связи с возможностью применения в клинической практике радиоактивно меченных аналогов ССТ как для диагностики, так и для лечения опухолей. В конечном счете, комплекс рецептор – агонист должен быть доставлен в эндосому, где произойдет его деградация. Эндоцитоз комплекса происходит после фосфорилирования рецептора по нескольким остаткам серина и треонина с участием аррестина-1, β -аррестинов 1-го и 2-го типов, по отношению к которым ССТРе можно разделить на 2 основных класса – А и В. Класс А составляют рецепторы ССТ, не взаимодействующие с аррестином-1 и имеющие большее сродство к β -аррестину-2: ССТРе3, ССТРе5. К классу В относятся рецепторы, взаимодействующие с аррестином-1 и имеющие одинаковое сродство к β -аррестину-1 и -2: ССТРе2а. Интернализация ССТРе1 и ССТРе4, по-видимому, не зависит от β -аррестинов, а для ССТРе4 показано, что стимуляция агонистом не приводит к его фосфорилированию и интернализации [52].

СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ССТРе, РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ЛИГАНДАМИ-АГОНИСТАМИ

Для всех подтипов ССТРе человека установлена связь с ингибирующими G-белками – Gi-белками [31]. Передача сигнала ССТ с участием Gi-белка приводит к ингибированию активности аденилатциклазы и, благодаря понижению концентрации цАМФ в клетке, к снижению активности протеинкиназы А (ПКА). Угнетение активности аденилатциклазы приводит также к снижению уровня активности серин-треониновых протеинкиназ и уменьшению фосфорилирования как белков-транспортёров, так и регуляторов транскрипции. В то время как субъединица G α i ингибирует актив-

Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АНАЛОГОВ ССТ ПО СПОСОБНОСТИ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ССТРЕ РАЗНЫХ ТИПОВ [ПО 7]

ССТ и его аналоги	ССТРе1	ССТРе2	ССТРе3	ССТРе4	ССТРе5
	IC50, нмоль/л				
ССТ-14	0,93±0,12	0,15±0,02	0,56±0,17	1,5±0,4	0,29±0,04
Октреотид	180±20	0,54±0,08	14±9	230±40	17±5
Ланреотид	280±80	0,38±0,08	7,1±1,4	>1000	6,3±1,0
Пасиреотид	9,3±0,1	1±0,1	1,5±0,3	>100	0,16 ±0,01

ность аденилатциклазы, G $\beta\gamma$ -димер активирует K⁺-каналы, что приводит к деполяризации мембраны и изменению ионного равновесия в клетке. Происходит гиперполяризация клеточной мембраны и в результате блокируется поступление в клетку Ca²⁺ через потенциалзависимые Ca²⁺-каналы. Уменьшение концентрации Ca²⁺ в клетке может происходить вследствие повышения концентрации цГМФ, что активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу G с последующим фосфорилированием Ca²⁺-каналов. В итоге, уменьшение уровня цАМФ и Ca²⁺ в клетке ведет к угнетению экзоцитоза, т.е. секреции гормонов и выброса нейромедиаторов [6, 31].

Кроме того, в некоторых работах показано, что ССТ способен ингибировать секрецию, индуцированную агонистами Ca²⁺-каналов и цАМФ, что заставляет предположить наличие другого способа ингибирования экзоцитоза через ССТРе, не связанного с перечисленными выше. Возможно, он связан с активацией фосфатаз, таких, как кальцинейрин [6, 31]. Помимо секреции гормонов, ССТ угнетает высвобождение факторов роста и цитокинов, что вносит вклад в антипролиферативный эффект [31].

Для всех подтипов ССТРе обнаружено влияние на активность МАРК, в основном осуществляемое через тирозиновые протеинфосфатазы [10, 31]. По этому механизму происходит ингибирование МАРК при активации ССТРе2 и ССТРе3. ССТРе5 ингибирует МАРК путем угнетения гуанилатциклазы с последующим снижением уровня цГМФ в клетке. Особенности рецепторного ответа зависят от типа клеток. В клетках линии СНО-K1 для ССТРе1 и ССТРе4 наблюдалась активация МАРК, но итоговый эффект все равно оставался антипролиферативным: предположительно, за счет увеличения экспрессии белка p^{21cip/WAF1} – ингибитора циклинзависимых протеинкиназ.

Связывание лигандов с ССТРе3 приводило к развитию апоптоза клеток линии AtT-20 и MCF7, сопровождавшегося повышением уровня p53 и Вах и не зависевшего от фазы клеточного цикла [31, 43]. При связывании прочих подтипов ССТРе также возможна индукция апоптоза (сила эффекта убывает: ССТРе5 > 2 > 4 > 1), но в этом случае прослеживается блок клеточного цикла в G₁-фазе, который сопровождается повышением содержания белков Rb и p21 [43].

Ключевым этапом в развитии антипролиферативного ответа клетки является активация тирозиновой протеинфосфатазы SHP-1 [10, 31]. Для ССТРе2 показано, что активация SHP-1 требует образования комплекса ССТРе2 с другой тирозиновой фосфатазой – SHP-2, а также с тирозинкиназой Src, причем активация последней происходит с участием $\beta\gamma$ -димера Gi-белка.

Помимо указанных механизмов действия, для ССТРе обнаружены и некоторые тканеспецифические особенности передачи сигналов. Например, способность стимулировать фосфолипазу-A2 в ней-

ронах гиппокампа и фосфолипазу-С в астроцитах и гладкой мускулатуре тонкой кишки. В гипоталамических нейронах мышцы обнаружено влияние ССТРе1 и 2 на глутаматные AMPA-рецепторы и каинатные рецепторы [31].

Благодаря особенностям действия сигналпередающих систем при связывании ССТ и его пептидных аналогов с ССТРе (особенно с ССТРе2) происходит ингибирование пролиферации и активация апоптоза опухолевых клеток. Кроме того, способность ССТРе к высокоаффинному связыванию этого гормона и стимуляции рецепторопосредованного эндоцитоза делает ССТРе перспективной мишенью для действия таргетных препаратов при использовании в качестве векторов стабильных аналогов ССТ.

АНАЛОГИ ССТ КАК ВЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

Первыми внедренными в клинику таргетными препаратами на основе ССТ стали радиоактивно меченные аналоги ССТ, что позволило улучшить доставку радионуклидов в нейроэндокринные опухоли и, соответственно, обеспечить их визуализацию при сцинтиграфии, а позднее и при позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и разработать новый метод радионуклидной терапии рака [23, 25].

Системы направленного транспорта радионуклидов, состоящие из векторных пептидов-лигандов рецепторов, избирательно представленных в опухоли, получили название пептид-рецепторной радионуклидной терапии (peptide-receptor radionuclide therapy, PRRT) [23, 53]. Первым радиоактивно меченным аналогом ССТ, используемым в клинической практике для сцинтиграфии, был ¹¹¹In-пептириотид [¹¹¹In-diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA) D-Phe1-octreotide] – препарат, получивший название OctreoScan (Mallinckrodt, Inc, Сент-Луис, Миссури) [5, 22]. В дальнейшем были разработаны радиоактивно меченные аналоги ССТ, обладающие более высоким сродством к рецепторам: DOTATOC [DOTA-D-Phe1-Tyr3-октреотид] и DOTATATE [DOTA-D-Phe1-Tyr3-Thr8-октреотид]. Эти модификации аналогов ССТ имеют более высокое сродство к ССТРе2, и в их состав вместо диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA) в качестве хелатирующего агента входит 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N',N'',N''',N''''-этилендиаминотетрауксусная кислота (DOTA), что позволило создать стабильные комплексы с β -излучающими радионуклидами, такими, как ⁹⁰Y и ¹⁷⁷Lu, эффективными как для диагностики, так и для терапии нейроэндокринных опухолей [19, 30, 40].

Этот подход позволил стабильно получать пептиды, меченные индием-111, иттрием-90 и лютецием-177, и повысить эффективность радионуклидной терапии [11, 14, 24, 54]. При этом эффективность пептид-рецепторной радионуклидной терапии существенно превосходила используемые ранее методы лечения (данные исторического контроля) [12,

24]. В настоящее время продолжают исследования по созданию улучшенных диагностических и терапевтических систем на основе пептидных аналогов ССТ с использованием γ -излучателей ^{99m}Tc и ^{111}In и β -излучателей ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{18}F и ^{90}Y (β -частицы с высокой энергией) и ^{177}Lu (β -частицы с низкой энергией) [25]. В результате радионуклидной терапии с использованием таких аналогов ССТ улучшалось самочувствие, увеличивалась продолжительность жизни и повышалось качество жизни больных с нейроэндокринными опухолями.

Одновременно очень большой интерес представляют исследования по созданию таргетных препаратов с использованием в качестве повреждающего агента цитотоксических лекарств химической природы. Получены конъюгаты аналогов ССТ с камптотецином, метотрексатом, паклитакселем и доксорубицином и доказана их высокая противоопухолевая активность в экспериментальных моделях на животных. Результаты этих исследований обобщены в обзоре L. Sun [48]. Следует отметить, что конъюгат аналога ССТ с камптотецином был получен и в пролонгированной форме в виде гранул, которые содержали препарат в концентрации 5 мг на 1 гранулу, что обеспечивало его постепенное высвобождение в течение 60 сут (разработка Innovative Research of America, Sarasota, FL) [47]. Конъюгат вводили животным в дозе 3,5 мг/кг внутривенно или подкожно трижды в неделю, всего 12 инъекций, торможение роста опухоли при этом составляло 85–97%. Важно подчеркнуть, что конъюгаты с производными ССТ оказывали на опухоль не только прямое, но и опосредованное действие вследствие присутствия ССТРе на мембране эндотелиальных клеток сосудов опухоли (и только опухоли) [47, 49].

Необходимо отметить, что, помимо повышения избирательности действия, таргетные препараты способны обеспечивать преодоление множественной лекарственной устойчивости опухолей, благодаря поступлению в клетку путем рецепторопосредованного эндоцитоза, а не в результате диффузии через мембрану. Интернализация конъюгатов в результате рецепторопосредованного эндоцитоза исключает взаимодействие свободных противоопухолевых препаратов с трансмембранными белками из семейства АВС-транспортеров. Содержание АВС-транспортеров в опухолях часто повышено, именно эти белки удаляют из клетки многие токсические вещества, включая лекарства, на пути их транспорта через мембрану и обеспечивают тем самым множественную лекарственную устойчивость. В случае рецепторопосредованного эндоцитоза противоопухолевых препаратов в составе конъюгатов собственно цитотоксические препараты не контактируют с клеточной мембраной и АВС-транспортерами, так как проникают в клетку в составе везикул, образование которых стимулируется при связывании векторной молекулы со своим рецептором. Так, конъюгат камптотецина с аналогом ССТ, специфичным к ССТРе2

(JF-07-69, см. рисунок), названный авторами JF-10-81, в котором камптотецин был связан с N-концом пептида, обладал противоопухолевой и антиангиогенной активностью, способностью преодолевать множественную лекарственную устойчивость клеток с высоким уровнем экспрессии ССТРе2 и был эффективен даже в отношении клеток, не чувствительных к свободному камптотецину (клетки карцинома поджелудочной железы BON) [37, 46].

Конъюгат аналога ССТ D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂ (RC-121) с доксорубицином, названный AN-238, оказывал не прямое противоопухолевое действие на опухоли немелкоклеточного рака легкого (клетки линии H-157). Его противоопухолевая активность была обусловлена действием непосредственно на ССТРе2-положительные клетки не опухоли, а кровеносных сосудов мышей в зоне опухоли [21].

Недостатком конъюгатов векторных пептидов с цитотоксическими веществами в качестве терапевтических препаратов, препятствующим их внедрению в клиническую практику, является малое количество молекул цитотоксических соединений, которое можно присоединить к пептиду без нарушения его способности связываться со своим рецептором с высокой аффинностью.

Для решения этой проблемы разрабатываются новые подходы, в которых цитотоксический препарат включается в состав мицелл или полимерных биodeградируемых наночастиц, снабженных векторными молекулами.

Использование препаратов в составе наноразмерных частиц в виде липосом, мицелл и полимерных наночастиц даже без векторных молекул является одним из подходов для улучшения биодоступности и оптимизации фармакокинетики лекарств, так как позволяет оптимизировать доставку препаратов в опухоль благодаря механизму, получившему название повышенной проницаемости и удержания (enhanced permeability and retention – EPR). Этот механизм определяется особенностями строения сосудов в опухолях и в зоне воспаления, которые содержат специфические участки (фенестры), проницаемые для наноразмерных частиц [26, 27].

Для увеличения времени циркуляции полимерных наноконтейнеров в периферической крови их «покрывают» полиэтиленгликолем (PEG) или поливиниловым спиртом, что снижает захват таких частиц клетками ретикулоэндотелиальной системы. Такие мицеллы, липосомы и наночастицы получили название «стелс» («stealth» – невидимые) [13].

Дальнейший прогресс в создании полимерных форм противоопухолевых лекарств связан с разработкой усовершенствованных многофункциональных носителей, которые, помимо защитной оболочки, должны содержать векторные лиганды, обеспечивающие избирательное связывание наночастиц с опухолевыми клетками или эндотелиальными клетками кровеносных сосудов, снабжающих

опухоль питательными веществами и кислородом, и даже лиганды, обеспечивающие проникновение таких контейнеров в клетку-мишень [9, 32]. Использование векторных наноконтейнеров (липосом, мицелл, наночастиц из различных полимерных биodeградируемых носителей) при создании таргетных препаратов должно обеспечивать защиту лекарственных препаратов от деградации и оптимизировать их фармакокинетику, благодаря улучшению накопления в опухоли [42].

Недавно разработана технология получения и показана высокая эффективность таких векторных наноконтейнеров направленного действия. В качестве вектора в этих препаратах использованы октреотид или ланреотид, специфически взаимодействующие с рецепторами ССТ [18, 39, 57, 58]. Серия таких работ выполнена в Китайском фармацевтическом университете в Нанжинге и Пекинском университете. Z. Su и соавт. использовали наноструктурированные липидные контейнеры (NLC) – носители, в состав которых входят твердые и жидкие липиды [9, 38], с октреотидом в качестве векторной молекулы, что позволило создать новый тип векторных коллоидных систем доставки лекарств со значительно большей емкостью, чем конъюгаты [44]. Поскольку такие липидные контейнеры получают на основе физиологических и(или) биodeградируемых липидов, они характеризуются хорошей переносимостью, простотой получения, большей стабильностью и меньшей стоимостью, чем липосомы, а использование октреотида обеспечивает их избирательное связывание и интернализацию опухолевыми клетками.

Векторные полимерные мицеллы с использованием октреотид-полиэтиленгликоль-моностеарата (OPGMS) авторы получали при конъюгировании октреотида с полиэтиленгликоль-моностеаратом (PGMS). Гидрофобный остаток стеариновой кислоты обеспечивал включение OPGMS (или PGMS) в липидный кор NLC, при этом гидрофильные остат-

ки октреотид-полиэтиленгликоля (и полиэтиленгликоля) располагались на поверхности частиц и обеспечивали их взаимодействие с рецепторами ССТ. Размер частиц при этом составлял около 100 нм. В состав NLC предварительно вводили гидрофобный противоопухолевый препарат 10-гидроксикамптотетин (НСРТ) – менее токсичное производное камптотетина, проявляющее высокую активность в отношении рака желудка, печени, лейкоза и опухолей головы и шеи. Использование OPGMS обеспечивало улучшение фармакокинетики NLC, благодаря замедлению его деградации и снижению поступления в клетки ретикулоэндотелиальной системы и увеличению накопления в опухолевых клетках.

Позднее было показано, что использование OPGMS обеспечивает более значительное ингибирование роста опухоли S180 и увеличение средней продолжительности жизни животных с привитой опухолью, чем PGMS и свободный препарат НСРТ [45]. В этих экспериментах эффект возрастал с увеличением концентрации октреотида на поверхности частиц.

Помимо липидных наноконтейнеров, активно изучается возможность создания и использования полимерных мицелл на основе гидрофобизованного хитозана, который получают из хитина при его N-деацетилировании. Из хитозана готовят различные амфифильные производные, которые в водной среде в результате агрегации образуют мицеллоподобные структуры, характеризующиеся способностью включать большое количество гидрофобных веществ, в том числе и противоопухолевых лекарств (табл. 2).

М. Нио и соавт. разработали систему направленного транспорта с использованием полимерных мицелл, состоящих из векторного полимера октреотид-полиэтиленгликоль-дезоксихолева кислота (OPD) и модифицированного хитозана в виде полимера N-дезоксихолева кислота-O,N-гидроксиэтил (или N-карбоксиметил) хитозан (DANC). В водной среде

Таблица 2

НАНОРАЗМЕРНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ ТАРГЕТНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АНАЛОГОВ ССТ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРНЫХ МОЛЕКУЛ

Состав полимерных мицелл		Противоопухолевый препарат	Источник
Векторный полимер	Полимер – носитель лекарства		
Oct-PEG-b- PCL	Oct-PEG-b- PCL	Паклитаксел	[57]
Lan-PEG-b- PCL	Lan-PEG-b- PCL	Паклитаксел	[57]
Oct-PEG-стеариновая кислота	NLC	Гидроксикамптотетин	[44, 45]
Oct-PEG- стеариновая кислота	N-октил-О, N-карбоксиметил хитозан	Доксорубин	[59]
Oct-PEG- стеариновая кислота	N-октил- N-succinyl O-карбоксиметил хитозан	Доксорубин	[29]
Oct-PEG-дезоксихолева кислота	N-дезоксихолева кислота-O, N-гидроксиэтил хитозан	Доксорубин	[18]

Примечание. NLC – наноструктурированный липидный носитель, Lan – ланреотид, Oct – октреотид, PCL – поли(ε-капролактон), PEG – полиэтиленгликоль.

ДАНС образует полимерные мицеллы. Гидрофобный остаток дезоксихолево́й кислоты OPD встраивается во внутренний кор мицелл ДАНС и обеспечивает прочное включение OPD в мицеллы, при этом гидрофильные остатки октреотид-полиэтиленгликоля (и полиэтиленгликоля) также располагаются на поверхности частиц и обеспечивают их взаимодействие с рецепторами ССТ. В мицеллы ДАНС включают доксорубин. Полученные таким образом полимерные векторные мицеллы обладают более высокой противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo* [18, 39].

Помимо разных типов полимерных мицелл, состав которых приведен в табл. 2, на основе октреотида в качестве векторной молекулы созданы также стелс-липосомы, которые содержали антиангиогенный препарат комбретастин с быстрым высвобождением и доксорубин с более медленным выходом [8], а также липосомальный препарат для векторной доставки производных платины [4]. Оба препарата обеспечивали избирательную доставку лекарств в опухолевые клетки.

Y. Zhang и соавт. [57] разработали способ комбинированной терапии рака молочной железы при одновременном использовании векторных полимерных мицелл с октреотидом, нагруженных паклитакселем, и мицелл, нагруженных салиномицином. Последний препарат обеспечивал удаление опухолевых стволовых клеток. Для образования полимерных биодеградируемых мицелл авторы использовали блоксополимер полиэтиленгликоля и поли(ϵ -капролактон)а (см. табл. 2). Размер разных мицелл в этой работе колебался от 23 до 27 нм.

В заключение следует отметить, что ССТ является не единственным перспективным вариантом векторных молекул для создания таргетных препа-

ратов. Различные векторные молекулы от моноклональных антител до низкомолекулярных веществ, рецепторы которых представлены на опухолевых клетках, рассмотрены в обзоре [32]. К преимуществам аналогов ССТ для создания таргетных препаратов следует отнести их высокую аффинность к ССТRe, клинически доказанную противоопухолевую эффективность самих препаратов, возможность одновременной визуализации опухоли при использовании комплексов радионуклидов с октреотидом и доказанную в последнее время способность аналогов ССТ сохранять векторные свойства после включения в полимерные носители противоопухолевых препаратов.

Таким образом, одним из наиболее перспективных путей создания высокоэффективных систем направленного транспорта для лечения онкологических заболеваний является разработка векторных наноконтейнерных систем при использовании в качестве векторных молекул аналогов ССТ – октреотида и ланреотида и, возможно, пасиреотида. Таргетные радионуклидные конструкции с использованием этих аналогов ССТ уже применяются в клинике для оптимизации диагностики и радиотерапии опухолей, т.е. такие конструкции могут расцениваться как эффективные. Разработано несколько типов таргетных конструкций на основе аналогов ССТ в качестве векторных молекул для наноконтейнеров, содержащих химиотерапевтические препараты, и завершается этап их доклинического исследования. Можно полагать, что разработка и внедрение в клинику таких таргетных нанопрепаратов в сочетании с использованием подходов, направленных на удаление опухолевых стволовых клеток, позволят существенно улучшить результаты современной противоопухолевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Егоров А.В., Кондрашин С.А., Фоминых Е.В., Музаев Г.Х., Гитель Е.П., Гуревич Л.Е., Парнова В.А., Васильев И.А., Рабинович Е.З., Волков Р.Ю. Аналог соматостатина в диагностике и лечении нейроэндокринных опухолей. *Анналы хирургической гепатологии*. 2009; 14 (4): 1–7. (Egorov A.V., Kondrashin S.A., Fominikh E.V., Musaev G.Kh., Gitel E.P., Gurevich L.E., Parnova V.A., Vasiljev I.A., Rabinovich E.Z., Volkov R.Yu. Analogs of somatostatin in diagnostics and managements of neuroendocrine tumors, *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2009; 14 (4): 1–7. (in Russian))
- Михаевич Е.И., Яворская Н.П., Голубева И.С., Оборотова Н.А., Аляутдин Р.Н. Исследование противоопухолевого действия аналога соматостатина – цифетрелина. *Вопр биол. мед. фарм. химии* 2011; 10: 68–72. (Mikhaevich E.I., Yavorskaya N.P., Golubeva I.S., Oborotova N.A., Alyautdin R.N. Antitumor effect of the somatostatin analogue cifetrelin *in vivo*, *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i pharmaceuticheskoy khimii*. 2011; 10: 68–72. (in Russian))
- Смирнова А.И., Устинкина С.В., Смирнова А.П., Орлова О.Л., Оборотова Н.А., Смирнова С.С., Кубасова И.Ю., Шпрах З.С. Патент №2254139 РФ. Средство, обладающее противоопухолевым действием. (Smirnova L.I., Ustinkina S.V., Smirnova A.P., Orlova O.L., Oborotova N.A., Smirnova Z.S., Kubasova I.Ju., Shprakh Z.S. Patent RU 2254139. Agent eliciting antitumor effect. (in Russian))
- Accardo A, Mangiapia G, Paduano L et al. Octreotide labeled aggregates containing platinum complexes as nanovectors for drug delivery. *J. Pept. Sci.* 2013; 19 (4): 190–7.
- Bombardieri E., Ambrosini V., Aktolun C. et al. Oncology Committee of the EANM: 111In-pentetreotide scintigraphy: Procedure guidelines for tumor imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2010; 37: 1441–8.
- Bronstein-Sifton N. Somatostatin and the somatostatin receptors: versatile regulators of biological activity. *Pathways*. 2006; 2: 25–7.
- Bruns C., Lewis I., Briner U. et al. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 146: 707–16.
- Dai W., Jin W., Zhang J. et al. Spatiotemporally controlled co-delivery of anti-vasculature agent and cytotoxic drug by octreotide-modified stealth liposomes. *Pharm. Res.* 2012; 29 (10): 2902–11.
- Fang C., Al-Suwayeh S., Fang J. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. *Recent. Pat Nanotechnol.* 2013; 7 (1): 41–55.
- Ferjoux G., Lopez F., Esteve J.-P. et al. Critical role of Src and SHP-2 in sst2 somatostatin receptor-mediated activation of SHP-1 and inhibition of cell proliferation. *Molecular Biology of the Cell*. 2003; 14: 3911–28.
- Fjälling M., Andersson P., Forsell-Aronsson E. et al. Systemic radionuclide therapy using indium-111-DTPA-D- Phe1-octreotide in midgut carcinoid syndrome. *J. Nucl. Med.* 1996; 37: 1519–21.
- Ferrer F., Valkema R., Kwekkeboom D. et al. Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy. *Best Pract. Res Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 21: 111–29.
- Gref R., Luck M., Quellec P. et al. «Stealth» corona-core nanoparticles surface

- modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B*. 2000; 18 (3–4): 301–13.
14. Heppeler A., Froidevaux S., Eberle A. et al. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr. Med. Chem.* 2000; 7: 971–94.
 15. Herder W., Lamberts S. Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses. *Curr. Opin. Oncol.* 2002; 14 (1): 53–7.
 16. Hofland L. & Lamberts S. Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Annals of Oncology*. 2001; 12: 31–6.
 17. Hofland L., Lamberts S. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocrine Reviews*. 2003; 24 (1): 28–47.
 18. Huo M., Zou A., Yao C. et al. Somatostatin receptor-mediated tumor-targeting drug delivery using octreotide-PEG-deoxycholic acid conjugate-modified N-deoxycholic acid-O, N-hydroxyethyl chitosan micelles. *Biomaterials*. 2012; 33 (27): 6393–407.
 19. Jong M., Bakker W., Krenning E. et al: Yttrium-90 and indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of (DOTA0, d-Phe1, Tyr3)octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 1997; 24: 368–71.
 20. Kharmate G., Rajput P., Watt H. et al. Role of somatostatin receptor 1 and 5 on epidermal growth factor receptor mediated signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1813: 1172–89.
 21. Kiaris H., Schally A., Nagy A. et al. A targeted cytotoxic somatostatin (sst) analogue, AN-238, inhibits the growth of H-69 small-cell lung carcinoma (sclc) and H-157 non-sclc in nude mice. *Eur. J. Cancer*. 2001; 37: 620–8.
 22. Krenning E., Kwekkeboom D., Bakker W. et al: Somatostatin receptor scintigraphy with (111In-DTPA-D-Phe1)- and (123I-Tyr3)-octreotide: The Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 1993; 20: 716–31.
 23. Kwekkeboom D., Mueller-Brand J., Paganelli G. et al. Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs. *J. Nucl. Med.* 2005; 46 (1 Suppl): 62–6.
 24. Kwekkeboom D., Teunissen J., Bakker W. et al. Radiolabeled somatostatin analog (177Lu-DOTA0,Tyr3)octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23 (12): 2754–62.
 25. Maecke H., Reubi J. Somatostatin receptors as targets for nuclear medicine imaging and radionuclide treatment. *J. Nucl. Med.* 2011; 52 (6): 841–4.
 26. Maeda H., Matsumura Y. EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2011; 63 (3): 129–30.
 27. Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986; 46 (12 Pt 1): 6387–92.
 28. Moaen-Ud-Din M., Yang L. Evolutionary history of the somatostatin and somatostatin receptors. *J. Genetics*. 2009; 88: 41–53.
 29. Niu J., Huang A., Xiao Y. et al. Octreotide-mediated tumor cell uptake and intracellular pH-responsive drug delivery of the self-assembly supramolecular nanocarrier. *J. Drug Target.* 2013; 21 (5): 415–26.
 30. Otte A., Mueller-Brand J., Dellas S. et al: Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. *Lancet*. 1998; 2: 417–8.
 31. Patel Y. Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1999; 20: 157–98.
 32. Perche F., Torchilin V. Recent Trends in Multifunctional Liposomal Nanocarriers for Enhanced Tumor Targeting. *J. Drug Delivery*. – 2013: Volume Article ID 705265, 32 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/705265>.
 33. Rinke A., Muller H., Schade-Brittinger C. et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 4656–63.
 34. Rocheville M., Lange D., Kumar U. et al. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of oligomers with enhanced functional activity. *Science*. 2000; 288: 154–7.
 35. Rocheville M., Lange D., Kumar U. et al. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (11): 7862–9.
 36. Rubin J., Ajani J., Schirmer W. Octreotide acetate long-acting formulation versus open-label subcutaneous octreotide acetate in malignant carcinoid syndrome. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 600–6.
 37. Schally A., Engel J., Emons G. et al. Use of analogs of peptide hormones conjugated to cytotoxic radicals for chemotherapy targeted to receptors on tumors. *Curr. Drug. Deliv.* 2011; 8 (1): 11–25.
 38. Selvamuthukumar S., Velmurugan R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids Health Dis.* 2012; 1: 159.
 39. Singh V., Brendel M., Zacharias S. et al. Characterization of somatostatin receptor subtype-specific regulation of insulin and glucagon secretion: an *in vitro* study on isolated human pancreatic islets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92 (2): 673–80.
 40. Smith-Jones P., Stolz B., Bruns C. et al: Gallium-67/gallium-68-(DFO)-octreotide—A potential radiopharmaceutical for PET imaging of somatostatin receptor-positive tumors: Synthesis and radiolabeling in vitro and preliminary in vivo studies. *J. Nucl. Med.* 1994; 35: 317–25.
 41. Somvanshi R., Kumar U. Pathophysiology of GPCR homo- and heterodimerization: special emphasis on somatostatin receptors. *Pharmaceuticals*. 2012; 5: 417–46.
 42. Song G., Wu H., Yoshino K., Zamboni W.C. Factors affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal drugs. *J. Liposome Res.* 2012; 22: 177–92.
 43. Srikant C. Human somatostatin receptor mediated antiproliferative action evokes subtype selective cytotoxic and cytostatic signaling. *Yale J. Biol. Med.* 1997; 70 (5–6): 541–8.
 44. Su Z., Niu J., Xiao Y. Effect of octreotide-polyethylene glycol (100) monostearate modification on the pharmacokinetics and cellular uptake of nanostructured lipid carrier loaded with hydroxycamptothecin. *Mol. Pharm.* 2011; 8 (5): 1641–51.
 45. Su Z., Shi Y., Xiao Y. Effect of octreotide surface density on receptor-mediated endocytosis in vitro and anticancer efficacy of modified nanocarrier in vivo after optimization. *Int. J. Pharm.* 2013; 447 (1–2): 281–92.
 46. Sun L., Fuselier J., Coy D. Effects of camptothecin conjugated to a somatostatin analog vector on growth of tumor cell lines in culture and related tumors in rodents. *Drug. Deliv.* 2004; 11: 231–8.
 47. Sun L., Mackey L., Luo J. et al. Targeted chemotherapy using a cytotoxic somatostatin conjugate to inhibit tumor growth and metastasis in nude mice. *Clin. Med. Oncol.* 2008; 2: 491–9.
 48. Sun L., Coy D. Somatostatin receptor-targeted anti-cancer therapy. *Curr. Drug. Deliv.* 2011; 8 (1): 2–10.
 49. Sun L., Luo J., Mackey L. et al. A conjugate of camptothecin and a somatostatin analog against prostate cancer cell invasion via a possible signaling pathway involving PI3K/Akt, alphaVbeta3/alphaVbeta5 and MMP-2/-9. *Cancer Lett.* 2007; 246: 157–66.
 50. Susini C., Buscatl L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann. Oncol.* 2006; 17 (12): 1733–42.
 51. Tulipano G., Schulz S. Novel insights in somatostatin receptor physiology. *Eur. J. of Endocrinology*. 2007; 156: 3–11.
 52. Tulipano G., Stumm R., Pfeiffer M. et al. Differential -arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 21374–82.
 53. Visser M., Verwijnen S., de Jong M. Update: improvement strategies for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2008; 23 (2): 137–57.
 54. Waldherr C., Pless M., Maecke H. et al. The clinical value of (90Y-DOTA)-D-Phe1-Tyr3-octreotide (90Y-DOTATOC) in the treatment of neuroendocrine tumours: a clinical phase II study. *Ann. Oncol.* 2001; 12: 941–5.
 55. Weckbecker G., Lewis I., Albert R. et al. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nature Rev. Drug Discovery*. 2003; 2: 999–1017.
 56. Zhang J., Jin W., Wang X. et al. A novel octreotide modified lipid vesicle improved the anticancer efficacy of doxorubicin in somatostatin receptor 2 positive tumor models. *Mol. Pharm.* 2010; 7 (4): 1159–68.
 57. Zhang Y., Zhang H., Wang X. et al. The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles. *Biomaterials*. 2012; 33 (2): 679–91.
 58. Zheng N., Dai W., Du W. et al. A novel lanreotide-encoded micelle system targets paclitaxel to the tumors with overexpression of somatostatin receptors. *Mol. Pharm.* 2012; 9 (5): 1175–88.
 59. Zou A., Huo M., Zhang Y. et al. Octreotide-modified N-octyl-O, N-carboxymethyl chitosan micelles as potential carriers for targeted antitumor drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 2012; 101 (2): 627–40.

ЭТНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CYP2C19, АССОЦИИРОВАННОГО С НАРУШЕНИЕМ ОТВЕТА НА КЛОПИДОГРЕЛ

К.Б. Мирзаев¹, Д.А. Сычев^{2,3}, доктор медицинских наук, профессор,
Д.А. Андреев¹, доктор медицинских наук, профессор

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Российская Федерация, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

²Российская медицинская академия последиplomного образования, Российская Федерация, 123995,

г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1; ³Научный центр экспертизы средств медицинского применения

Минздрава России, Российская Федерация, 109240, г. Москва, ул. Яузская, 11/6

E-mail: karin05doc@mail.ru

Одним из значимых источников межличностных различий ответа на фармакотерапию является генетически детерминированное изменение активности ферментов системы биотрансформации лекарственных средств и ксенобиотиков – цитохрома P450 (CYP). Целью данного обзора были анализ распространенности полиморфных маркеров гена CYP2C19, ассоциированных с нарушением фармакологического ответа на клопидогрел, среди различных этнических групп, проживающих в РФ, по данным литературы, и определение перспективы применения фармакогенетического тестирования для повышения эффективности и безопасности антитромбоцитарной терапии у российских пациентов с ИБС. Частота CYP2C19*2, по данным проанализированных исследований, оказалась выше среди представителей монголоидной расы (наибольшая среди калмыков – 25,0%). Частота CYP2C19*17 изучалась только среди русских и оказалась близкой к средним значениям у европеоидов (14,0%). Изучение межэтнических особенностей распространенности клинически значимых полиморфизмов гена CYP2C19 особенно актуально для такой многонациональной страны, как Российская Федерация. Результатом обнаружения таких различий может стать разработка рекомендаций и предупреждений для практикующих врачей в отдельно взятом регионе РФ.

Ключевые слова: резистентность к клопидогрелу, полиморфизм гена CYP2C19, этнические особенности носительства CYP2C19*, CYP2C19*, CYP2C19*17

ETHNIC DIFFERENCES OF THE CYP2C19 GENE POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH THE VIOLATION OF THE RESPONSE TO CLOPIDOGREL IN THE RUSSIAN FEDERATION

K.B. Mirzaev¹, D.A. Sychev^{2,3}, D.A. Andreev¹

¹Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Federation, 119991, Moscow, Trubetskaya street, 8/2; ²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Russian Federation, 123995, Moscow, Barrikadnaya street, 2/1; ³Center for Clinical Pharmacology, Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Russian Federation, 109240, Moscow, Yauzskaya street 11/6

Genetically determined diversity in the activity of enzymes regulating the biotransformation of drugs and xenobiotics - cytochrome P450 (CYP) is one of the main causes of interindividual differences in the response of pharmacotherapy. The objective of this review is to analyze the prevalence of polymorphic markers of gene CYP2C19, associated with the violation of the pharmacological response to clopidogrel among the various ethnic groups living in the Russian Federation, and to define the prospects of using pharmacogenetic testing in order to improve the efficiency and safety of antiplatelet therapy in Russian patients with coronary artery disease. According to the result of the studies frequency of CYP2C19*2 is higher in the Mongolian race (max frequency in Kalmyks is 25,0%). CYP2C19*17 allele was studied in Russians only and was about the same as in the Caucasian race (14,0%).

Key words: resistance to Clopidogrel, CYP2C19 gene polymorphism, ethnic characteristics of carriership of CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17

ВВЕДЕНИЕ

Индивидуальная чувствительность к лекарственным средствам (ЛС), влияющая на эффективность и безопасность фармакотерапии, остается серьезной проблемой на современном этапе развития медицины. Одним из основных источников таких межличностных различий служит генетически детерминированное изменение активности ферментов системы

биотрансформации ЛС и ксенобиотиков – изоферментов цитохрома P450 (CYP).

Цитохром P450 был впервые описан в 1958 г. М. Klingenberg [1] и D. Garfinkel [2]. Основными изоферментами цитохрома P450, участвующими в биотрансформации ЛС и детоксикации ксенобиотиков, являются CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 и CYP3A4. Изменение нуклеотидной последователь-

ности в генах, кодирующих изоферменты *CYP*, приводит к образованию функционально дефектных вариантов изоферментов или, наоборот, вариантов с высокой активностью. В результате генетический полиморфизм изоферментов *CYP* может модулировать плазменные концентрации ЛС и тем самым стать причиной неадекватного фармакологического ответа в виде неблагоприятных побочных реакций (НПР). Для пролекарства результатом станет неэффективность лечения из-за образования недостаточного количества активного метаболита с соответствующими клиническими последствиями. По данным W. Evans и соавт. [3], 50% неадекватных фармакологических ответов могут быть обусловлены генетическими особенностями пациентов.

CYP2C19 – один из основных изоферментов, участвующих в биотрансформации многих ЛС в организме человека (клопидогрела, барбитуратов, диазепамы, лансопразола, нелфинавира, клоназепамы, циклофосамида, омепразола, и др.) [4]. Генетический полиморфизм *CYP2C19*, который ранее называли S-мефенитоингидроксилазой, открыт A. Kurler и соавт. в 1979 г. [5] в Университете Вандербильта, в ходе изучения стереоселективного гидроксилирования антиконвульсанта (S)-мефенитоина. В 1993 г. S. Wrighton и соавт. установили [6], что (S)-мефенитоин является субстратом *CYP2C19*.

Эти важные открытия послужили толчком для дальнейшего изучения изоферментов семейства *CYP2C* и обобщения полученных знаний. Так, в 1994 г. J. Goldstein и S. de Morais определили молекулярные основы полиморфизма гена *CYP2C19* (10 хромосома, локус 10q.1-24.3) [7]. Известно 28 полиморфных маркеров (аллельных вариантов) гена *CYP2C19*. Носительство аллельного варианта *CYP2C19*1* обеспечивает полную ферментативную активность *CYP2C19* и, соответственно, нормальный уровень биотрансформации ЛС. Основными аллелями с пониженной функцией (так называемые «медленные» аллели) являются *CYP2C19*2* и *CYP2C19*3*. *CYP2C19*2* составляет около 75% всех функционально дефектных аллелей среди монголоидов [8] и 93% – среди европеоидов [9]. На *CYP2C19*3* приходится около 25% всех функционально дефектных аллелей среди монголоидов [10], в то время как среди европеоидов она встречается крайне редко [11]. Данные аллельные варианты ассоциированы со снижением ферментативной активности *CYP2C19* и более высокими концентрациями ЛС – субстратов данного изофермента в крови, что клинически проявляется возникновением НПР и даже смертельным исходом.

Если препарат является пролекарством, таким, как клопидогрел, нуждающимся в биоактивации в организме человека, то функциональная недостаточность *CYP2C19* сопровождается образованием чрезмерно низких концентраций активного метаболита и развитием резистентности к терапии при стандартном режиме дозирования. У носителей ал-

лели *CYP2C19*17*, наоборот, отмечаются, повышение ферментативной активности *CYP2C19* и ускоренная биотрансформация ЛС-субстратов данного изофермента, что может оказаться причиной низких концентраций ЛС в плазме крови либо высокими значениями активного метаболита (при применении пролекарства). Другие аллельные варианты (*CYP2C19*4*, *5, *6, *7, *8 и т.д.) встречаются редко, а их клиническое значение не имеет достаточных доказательств. Существуют выраженные межэтнические различия в распространенности аллелей и соответствующих генотипов по *CYP2C19*: *CYP2C19*2* встречается у 50% монголоидов, 34% негроидов, 18% европеоидов и 19% американцев мексиканского происхождения [12–15]; частота *CYP2C19*3* среди европеоидов, негроидов и монголоидов, по данным литературы, составляет соответственно <1, <1 и 7% [16]; *CYP2C19*17* – у 25,7% немцев [17], 22,0% норвежцев [18], 20,0% шведов [19], 0,3% корейцев [19], 4,0% китайцев [20], 1,3% японцев [21].

Носители «дикого» (нормального) генотипа *CYP2C19*1/*1* обозначаются как «экстенсивные метаболитаторы». Носители любых 2 дефектных аллелей с пониженной функциональной активностью: *CYP2C19*2* или *CYP2C19*3* (*CYP2C19*2/*2*, *2/*3, *3/*3), обозначаются как «медленные метаболитаторы», а в случае носительства одной аллели (*1/*2, *1/*3, *2/*17, *3/*17) – как «промежуточные метаболитаторы». К «медленным метаболитаторам» относятся около 3% европеоидов, 4–7% негроидов [4], но гораздо чаще они встречаются среди монголоидов: у 12–16% корейцев [22, 23], 18–23% японцев [24, 25] и 15–17% китайцев [26]. Фенотип «медленные метаболитаторы» наследуется как аутосомно-рецессивный признак [8], поэтому во всех популяциях гораздо чаще встречаются «экстенсивные метаболитаторы» и «промежуточные метаболитаторы». И, наконец, носители аллели с повышенной функциональной активностью – *CYP2C19*17* в гетеро- или гомозиготном состоянии (*CYP2C19*1/*17*, *17/*17) обозначаются как «сверхбыстрые метаболитаторы» (UM) (<http://www.pharmgkb.org/>).

Определение и учет полиморфизма гена *CYP2C19* может стать одним из важных способов повышения эффективности фармакотерапии и профилактики серьезных НПР или резистентности к лечению у конкретного пациента. Кроме того, это позволит снизить затраты на коррекцию различных осложнений, возникающих в том числе из-за неэффективности лечения. При этом различия в распространенности аллелей и генотипов по *CYP2C19* в различных этнических группах может быть основой этнической чувствительности к ЛС – субстратам данного изофермента, что особенно актуально для такого многонационального государства, как Российская Федерация.

Целью данного обзора являются анализ распространенности полиморфных маркеров гена *CYP2C19*,

ассоциированных с нарушением фармакологического ответа на клопидогрел, среди этнических групп, проживающих в РФ, по данным литературы, и определение перспективы применения фармакогенетического тестирования для повышения эффективности и безопасности антитромбоцитарной терапии у российских пациентов с ИБС.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПО *CYP2C19* СРЕДИ РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Распространенность полиморфных маркеров *CYP2C19* в России изучалась среди больных с сердечно-сосудистыми, кислотозависимыми, онкологическими, аллергическими заболеваниями, а также среди здоровых добровольцев, в том числе детей. С учетом этнического состава изучена распространенность аллелей и генотипов по *CYP2C19* среди русских, татар, карачаевцев, черкесов, ингушей, чеченцев, калмыков. Этническую принадлежность верифицировали на основании того, представителем какого этноса участники исследования идентифицировали сами себя, в некоторых исследованиях авторы опрашивали родителей участников для их самоидентификации.

В исследовании М.Б. Фрейдина и соавт., проведенное среди пациентов с аллергическими заболеваниями [27], были включены 130 представителей русской популяции (67 женщин и 63 мужчин; средний возраст – $39 \pm 13,5$ года), проживающих в Томске. Частота аллели *CYP2C19*2* составила 17,4%, а распространенность генотипов *CYP2C19*1/*1*, *CYP2C19*1/*2* и *CYP2C19*2/*2* – соответственно 66,9% (81 человек), 31,4% (38 человек) и 1,7% (2 человека). Полученные в этом исследовании результаты близки к полученным среди европеоидов [28], но в то же время частота *CYP2C19*2* оказалась значительно ниже, чем среди представителей монголоидной расы, что представляется закономерным.

В исследовании, проведенном среди различных этносов, проживающих в Астраханском регионе Б.И. Кантемировой и соавт. [29], участвовали 208 здоровых детей в возрасте от 1 года до 18 лет. Полиморфный маркер *CYP2C19*2* был определен в следующих этнических группах: русские, чеченцы, татары, калмыки и ингуши. Так, частота функционально дефектной аллели *CYP2C19*2* оказалась наибольшей среди калмыков (25,0%), среди чеченцев, татар и ингушей она составила соответственно 11,0; 14,0 и 8,0%. Наконец, частота среди русских (15,0%), была близка к результатам, выявленным в предыдущем исследовании среди той же этнической группы (17,4%). При сравнении частот генотипов по *CYP2C19*2* обнаружены статистически значимые различия между калмыками и ингушами, а также между калмыками и чеченцами. Так, носители генотипов *CYP2C19*1/*2* и *CYP2C19*2/*2* составили среди калмыков соответственно 8,0 и 4,0% по сравне-

нию с 26,0 и 12,0% у ингушей ($\chi^2=5,765$; $p=0,0163$) и 14,0 и 4,0% у чеченцев ($\chi^2=3,6$; $p=0,0289$). Носителями по крайней мере 1 аллели *CYP2C19*2* оказались 38% калмыков, 23% русских, 20% татар, 18% чеченцев и 12% ингушей. Относительно большая частота аллелей и генотипов по *CYP2C19*2* среди калмыков, на наш взгляд, закономерна, так как они принадлежат к монголоидной расе. Причиной низкой частоты данного аллельного варианта среди татар, возможно, стало «смешивание» народов и неточности при отборе пациентов. Кроме ингушей и чеченцев, полиморфный маркер *CYP2C19*2* определен еще у 2 кавказских народов – карачаевцев и черкесов [30]. В исследование были включены 197 человек: 77 черкесов (31 мужчина и 46 женщин; средний возраст 56 ± 11 лет) и 125 карачаевцев (44 мужчины в возрасте 58 ± 11 лет). Частота «медленной» аллели – *CYP2C19*2* среди карачаевцев и черкесов составила соответственно 18,8 и 14,0%. Носителями по крайней мере 1 аллели *CYP2C19*2* оказались 31,2% черкесов и 26,4% карачаевцев. Полученная частота аллелей близка к данным, выявленным среди большинства народов, относящихся к европеоидной расе [28]. Распространенность полиморфного маркера *CYP2C19*2* также изучена среди башкир [31], якутов, бурятов, алтайцев и тувинцев [32] (табл. 1). Полученные результаты близки к данным для представителей монголоидной расы.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *CYP2C19* НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ КЛОПИДОГРЕЛА: РОССИЙСКИЙ ОПЫТ

Наиболее распространенной причиной неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (ССС) сегодня являются осложнения коронарного и церебрального атеротромбоза в виде инфаркта миокарда (ИМ), инсульта или смерти. В формировании атеротромбоза важное место занимает активация тромбоцитарного звена гемостаза. Соответственно, одним из основных направлений профилактики тромботических осложнений при ИМ и инсульте является рациональная антиагрегантная терапия. Клопидогрел препятствует тромбоцитарной агрегации посредством ингибирования связывания аденозиндифосфата (АДФ) с рецепторами на поверхности тромбоцитов. Согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов [39, 40], при отсутствии противопоказаний клопидогрел назначают в случаях:

- непереносимости аспирина (ИБ);
- ИМ с подъемом сегмента ST и последующем чрескожном коронарном вмешательстве (ЧКВ) (IA);
- ИМ с подъемом сегмента ST без ЧКВ (IIC);
- ИМ без подъема сегмента ST (IA);
- ИМ с подъемом сегмента ST и последующем ЧКВ (IB).

Эффективность двойной антиагрегантной терапии при остром коронарном синдроме (ОКС) до-

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ *CYP2C19* СРЕДИ РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП, ПРОЖИВАЮЩИХ В РФ

Этническая группа, место проживания, источник	Характеристика популяции	Исследуемый маркер <i>CYP2C19</i>	Число обследованных	Генотипы N (%)				Частота аллелей	
				*1/*1	*1/*2 *2/*2 *2/*3 *2/*17	*1/*3 *3/*3 *3/*17	*1/*17 *17/*17	*1	*2 *3 *17
Русские:									
Томск, [27] ²	Аллергические заболевания	*2	130	81 (66,9)	38(31,4) 2 (1,7)	—	—	0,83	0,17
Томск, [33] ¹	Лимфопролиферативные заболевания	*2 *3	62	—	—	—	—	0,86	0,14 0,0
Москва и Московская область, [34]	ИБС	*2	396	288 (72,7)	101 (25,5) 7 (1,8)	—	—	0,85	0,15
Москва и Московская область, [35]	ИБС	*2, *3, *17	40	20 (50,0)	12 (30,0) 0,0 0,0 0,0	0,0 0,0 0,0	5 (12,5) 3 (7,5)	0,71	0,15 0,0 0,14
	Здоровые	*2	146	111 (76,1)	31 (21,2) 4 (2,7)	—	—	0,87	0,13
Томск, [32]	Здоровые	*2 *3	82 87	64 (78,0) 87 (100,0)	16 (19,5) 2 (2,5) 0 (0,0) 0 (0,0)	0 (0,0) 0 (0,0)	—	0,88 1	0,12 0,0
Астрахань, [29]	Здоровые	*2	52	40(77,0)	8 (16,0) 4(7,0)	—	—	0,85	0,15
Воронеж, [36]	Здоровые	*2 *3	290	228 (78,7)	55 (19,0) 5 (1,7) 1 (0,3)	1 (0,3) 0,0	—	0,86	0,11 0,03
Татары:									
Казань, [37] ³	ИБС	*2	97	76 (78,4)	20 (20,6) 1 (1)	—	—	0,89	0,11
Республика Татарстан, [38]	Кислото-зависимые заболевания	*2 *3	130	56 (43,1)	20 (15,4) 1 (0,8) 2 (1,5)	42 (32,3) 9 (6,9)	—	0,67	0,12 0,21
Астрахань, [29]	Здоровые	*2	50	40 (80,0)	7 (14,0) 3 (6,0)	—	—	0,87	0,13
Калмыки:									
Астрахань, [29]	Здоровые	*2	50	31 (62,0)	13 (26,0) 6 (12,0)	—	—	0,85	0,25
Тувинцы:									
Республика Тыва, [32]	Здоровые	*2 *3	88 88	63 (71,7) 84 (95,4)	24 (27,2) 1 (1,1)	4 (4,6) 0 (0,0)	—	0,85 0,98	0,15 0,02
Буряты:									
Республика Бурятия, [32]	Здоровые	*2 *3	88 88	54 (61,3) 77 (87,5)	31 (35,2) 3 (3,5)	10 (11,4) 1 (1,1)	—	0,79 0,93	0,21 0,07
Якуты:									
Республика Саха (Якутия), [32]	Здоровые	*2 *3	88 87	54 (61,3) 79 (90,8)	27 (30,6) 7 (7,9)	8 (9,2) 0 (0,0)	—	0,77 0,95	0,23 0,05
Алтайцы:									
Республика Алтай, [32]	Здоровые	*2 *3	87 87	64 (73,5) 80 (92,0)	20 (23,0) 3 (3,5)	7 (8,0) 0 (0,0)	—	0,85 0,96	0,15 0,04
Чеченцы:									
Астрахань, [29]	Здоровые	*2	50	41(82,0)	7 (14,0) 2 (6,0)	—	—	0,87	0,13
Карачаевцы:									
Республика Карачаево-Черкесия, [30]	Здоровые	*2	125	92 (73,6)	31 (24,8) 2 (1,6)	—	—	0,86	0,14
Черкесы:									
Республика Карачаево-Черкесия, [30]	Здоровые	*2	77	53 (68,8)	19 (24,7) 5 (6,5)	—	—	0,81	0,19
Ингуши:									
Астрахань, [29]	Здоровые	*2	50	44 (88,0)	4 (8,0) 2 (4,0)	—	—	0,92	0,08

Примечание. ¹Частоту аллельных вариантов определяли в совокупности. ²Носительство данных генотипов не определяли. ³Автор не указал этническую принадлежность пациентов; поскольку исследование проводилось в Казани, они отнесены к группе татар.

казана в нескольких крупных рандомизированных клинических исследованиях. Так, в исследовании CURE [41] с участием 12 562 больных с ОКС без подъема сегмента ST пациенты получали клопидогрел (75 мг) + ацетилсалициловую кислоту (АСК) (75–325 мг) либо только АСК (75–325 мг) в течение 9–12 мес. В результате в группе больных, принимающих клопидогрел, наблюдалось статистически значимое снижение частоты нефатального ИМ, инсульта и смерти от сердечно-сосудистых причин (ССП) (9,3 против 11,4%; $p < 0,001$). Однако в группе клопидогрела наблюдалось повышение частоты кровотечений (соответственно 3,7 и 2,7%; $p = 0,001$).

Аналогичные результаты получены в исследовании COMPELL [42] с участием 45 тыс. больных ИМ преимущественно с подъемом сегмента ST. Добавление клопидогрела к терапии АСК сопровождалось снижением риска нефатального ИМ, инсульта и смерти от ССП на 9,0% ($p = 0,002$).

Несмотря на явную эффективность и пользу от применения клопидогрела, нельзя оставить без внимания факт относительно высокой частоты НПР и значительных межличностных различий ответа на фармакотерапию. Так, геморрагические осложнения составили 28% (130 из 460) всех сообщений, связанных с НПР при применении клопидогрела [43]. Из препаратов, способных вызвать кровотечение (антикоагулянты, тромболитики, антиагреганты, нестероидные противовоспалительные препараты – НПВП), 21% больных принимали только клопидогрел. При этом частота летальных исходов составила 14% [43]. А в исследовании CAPRIE показано, что добавление клопидогрела к АСК увеличивает риск опасных для жизни кровотечений в 2 раза (1,3% против 2,6%; $p < 0,001$). Кроме того, при применении клопидогрела могут наблюдаться такие осложнения, как агранулоцитоз, аллергические реакции, тромбоцитопения, тромбоцитопеническая пурпура, а повторные тромбозы, несмотря на терапию в стандартной дозе, могут встречаться в 15% случаев [44].

Описанные НПР могут быть обусловлены изменением фармакокинетики и фармакодинамики клопидогрела вследствие генетических особенностей пациента. К таким генетическими факторам относится полиморфизм следующих генов: *CYP* – кодирующего одноименные ферменты системы цитохрома P450 (*CYP2C19* [12], *CYP3A4* [45]); *MDR1* (*ABCB1*) – кодирующего кишечный транспортер Р-гликопротеин [46, 47]; *ITGB3* – кодирующего аминокислотную последовательность белковой молекулы тромбоцитарного рецептора фибриногена [48], и др. Как указывалось выше, клопидогрел является пролекарством, требующим биоактивации для реализации антиагрегантного эффекта. После абсорбции около 85% препарата превращаются в неактивный метаболит SR 26334 под воздействием карбоксилэстеразы-1. Оставшиеся 15% подверга-

ются двухэтапной биотрансформации в печени при участии изоферментов системы цитохромов P450. На 1-м этапе образуется 2-оксо-клопидогрел, на 2-м – активный метаболит R130964, препятствующий связыванию АДФ с P2Y₁₂-рецепторами на поверхности тромбоцитов. При этом развиваются необратимое ингибирование связывания фибриногена с GP IIb/IIIa-рецепторами и снижение АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов, что в конечном счете угнетает процесс тромбообразования. Наибольший вклад в печеночный метаболизм клопидогрела вносит изофермент *CYP2C19*. Данный изофермент характеризуется значительным генетическим полиморфизмом, что может послужить причиной изменения фармакокинетики, фармакодинамики и клинической эффективности клопидогрела. Влияние полиморфизма гена *CYP2C19* как непосредственно на плазменную концентрацию активного метаболита клопидогрела [12], так и в целом на клиническую эффективность и безопасность фармакотерапии доказана в нескольких крупных исследованиях [12, 47, 49, 50, 51]. В мета-анализе J. Mega и соавт. [52] ($n = 9685$) показано значительное повышение риска комбинированной конечной точки в виде сердечно-сосудистой смерти, ИМ или инсульта у носителей 1 (ОШ=1,55; 95% ДИ – 1,11–2,27; $p = 0,01$) или 2 (ОШ=1,76; 95% ДИ – 1,24–2,50; $p = 0,002$) аллелей *CYP2C19* с пониженной функциональной активностью по сравнению с носителями нормальных аллелей. Кроме того, отмечалось значительное повышение риска тромбоза стента у носителей по крайней мере 1 аллели с пониженной функциональной активностью (ОШ=2,67; 95% ДИ – 1,69–4,22; $p < 0,0001$). Необходимо отметить, что большинство пациентов, включенных в этот метаанализ, был подвергнуты ЧКВ. В другом мета-анализе ($n = 42016$) M. Holmes и соавт. [53] пришли к выводу, что нет значимой связи между носительством функционально дефектных аллелей и генотипов *CYP2C19* и неблагоприятными ССС у пациентов, принимающих клопидогрел. Выводы, сделанные авторами, нельзя трактовать однозначно, так как проведенный мета-анализ имеет некоторые ограничения. Во-первых, не проведена оценка гетерогенности популяции, что может привести к смещению полученных результатов. Во вторых, в мета-анализ включено большое количество обследованных, которым не проводились ЧКВ, в то время как клопидогрел необходим прежде всего пациентам, перенесшим ЧКВ (уровень доказательности IA) [39]. Таким образом, перечисленные факторы, на наш взгляд, привели к преждевременным необоснованным выводам.

Агентство по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) в 2010 г. внесло изменения в инструкцию по медицинскому применению оригинального препарата (Плавикс), где содержится предупреждение, что препарат может быть малоэффективен у носителей функ-

ционально дефектных аллелей гена *CYP2C19* [54]. В 2011 г. в руководство Европейского общества кардиологов (ESC) по лечению больных ОКС было включено фармакогенетическое тестирование с целью выбора антиагрегантного препарата у некоторых категорий пациентов (уровень доказательности ПВ) [39]. А согласно рекомендациям Американской ассоциации сердца (АНА)/Американской коллегии кардиологов (ACC), в фармакогенетическом тестировании нуждаются только пациенты из группы риска развития тромбоза стента (уровень доказательности IIIС) [55].

В России проведено 2 проспективных исследования с целью оценки влияния полиморфизма гена *CYP2C19* на частоту неблагоприятных ССС у пациентов, получающих клопидогрел. При этом получены противоположные результаты. Кроме того, проведено одно относительно небольшое исследование по оценке влияния носительства аллельного варианта *CYP2C19*2* на тромбоцитарную агрегацию у пациентов, перенесших ЧКВ.

В исследовании А.Л. Комарова и соавт. [34] было включено 399 больных (314 мужчин; средний возраст 58 ± 9 лет) из Москвы и Московского региона; период наблюдения составил 18 мес. Основными критериями включения были: реваскуляризация миокарда, стабильные проявления ИБС, перенесенный эпизод ОКС более 1 мес назад, монотерапия клопидогрелом (75–150 мг) либо клопидогрелом+АКС (75–100 мг). При этом 83 пациента получали монотерапию клопидогрелом и 316 – двойную антиагрегантную терапию (ДАТ); 248 пациентов принимали препарат в дозе 75 мг на протяжении 18 мес и 68 – 150 мг в течение 2 мес, далее – по 75 мг в день. Первичные конечные точки: смерть от ССП, ОКС, инсульт, транзиторная ишемическая атака (ТИА), реваскуляризация и случаи кровотечения. Генотипирование было проведено у 396 пациентов, из них 316 получали ДАТ. Генотип *CYP2C19*1/*1* имели 288 (72,7%) больных, *CYP2C19*1/*2* – 101 (25,0%) пациентов, *CYP2C19*2/*2* – 7 (1,8%), а частота аллельного варианта *CYP2C19*2* составила 14,5%. В группе больных, принимающих только клопидогрел, носительство по крайней мере 1 аллели *CYP2C19*2* (**1/*2+*2/*2*) было связано с более высоким риском тромботических осложнений по сравнению с носителями «дикого» генотипа – *CYP2C19*1/*1*: 27,7% против 3,2% ($p=0,001$). В этой же группе кровотечение наблюдалось в 8,0% случаев среди носителей генотипа *CYP2C19*1/*1* и ни одного случая не зафиксировано среди носителей функционально дефектной аллели. В группе ДАТ тромботические осложнения чаще встречались только у носителей аллели *CYP2C19*2*, принимавших 75 мг клопидогрела (соответственно 14,0 и 8,7%). В целом среди 108 носителей полиморфного маркера *CYP2C19*2* риск неблагоприятных ССС оказался достоверно выше только у больных с генотипом *CYP2C19*2/*2* (ОР=4,9, 95% ДИ – 1,5–16,3;

$p=0,003$). А кровотечения в этой же группе достоверно чаще встречались только среди носителей генотипа **1/*1*, получавших 150 мг клопидогрела – 9,5% против 0 среди носителей других генотипов. Следует отметить, что в данном исследовании достоверное повышение риска неблагоприятных ССС наблюдалось только у больных с генотипом *CYP2C19*2/*2*, который относительно редко встречается среди этнических групп, проживающих на территории РФ: в среднем среди русских – у 2,6%, среди монголоидов и кавказских народов по 4,5% (см. таблицу). Таким образом, при оценке целесообразности фармакогенетического тестирования для подбора оптимальной антитромбоцитарной терапии у российских пациентов немаловажным является определение их этнической принадлежности. Другим ограничивающим фактором является то, что в исследовании представлены «нетипичные» больные, так как оно проводилось на базе медицинского учреждения федерального уровня, что могло привести к формированию выборки, недостаточно характеризующей генеральную совокупность.

В другом аналогичном исследовании [37] получены противоположные результаты среди жителей Казани. В исследовании участвовали 97 больных ИМ (24 женщины и 73 мужчины) в возрасте от 41 года до 79 лет. Срок наблюдения составил 6 мес; первичными конечными точками были: смерть от ССП, тромбоз стента, повторный ИМ, повторная госпитализация и желудочно-кишечное кровотечение. 76 (78,4%) пациентов имели генотип *CYP2C19*1/*1*, 20 (20,6%) – генотип *CYP2C19*1/*2* и 1 (1%) – генотип *CYP2C19*2/*2*. Частота аллельного варианта *CYP2C19*2* составила 11,3%. Первичные конечные точки наблюдались у 10,0% носителей аллели *CYP2C19*2* (2 повторные госпитализации). Среди носителей «дикого» генотипа (*CYP2C19*1/*1*) частота первичных конечных точек составила 9,2% (1,3% – смерть, 2,6% – повторный ИМ, 4,0% – повторные госпитализации и 1,3% – желудочно-кишечное кровотечение). Несмотря на то, что комбинированные конечные точки чаще встречались среди носителей полиморфного маркера *CYP2C19*2*, у них не было ни одной жесткой первичной конечной точки (смерть от ССП, тромбоз стента, повторный ИМ, кровотечение). На основании полученных данных автор заключает, что полиморфизм гена *CYP2C19* не влияет на прогноз больных, перенесших ИМ, в течение последующих 6 мес. На наш взгляд, полученные результаты делают преждевременным вывод об отсутствии влияния полиморфизма гена *CYP2C19* на эффективность и безопасность клопидогрела у больных ИМ, что связано с рядом ограничений у данного исследования. Во-первых, исследование проведено на небольшой выборке пациентов, во-вторых, срок наблюдения пациентов относительно короткий (6 мес).

В исследовании З.Ф. Кудзоевой и соавт. [56] было включено 34 пациента с ИБС, перенесших

ЧКВ и получающих ДАТ. 22 (64,7%) пациента имели генотип *CYP2C19*1/*1*, 12 (35,2%) – генотип *CYP2C19*1/*2*, а частота аллельного варианта *CYP2C19*2* составила 17,6%. Генотип *CYP2C19*2/*2* не обнаружен. АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов измеряли у всех пациентов при лечении клопидогрелом в стандартной дозе (75 мг/сут), а также после коррекции терапии в случае выявления медленного аллельного варианта – *CYP2C19*2*. Доля пациентов с агрегацией тромбоцитов >40%, среди носителей нормального генотипа *CYP2C19*1/*1* – 13,0%, а среди «промежуточных метаболизаторов» (*CYP2C19*1/*2*) – 66% ($p=0,103$). После коррекции терапии (увеличение дозы клопидогрела до 150 мг/сут 5 пациентам и замена на тикагрелор у 2 пациентов) у всех пациентов тромбоцитарная агрегация оказалась <40%. Для экстраполяции результатов данного исследования на более широкую популяцию необходимо: увеличить число пациентов, оценить клинические исходы в подгруппах, уточнить метод измерения агрегации тромбоцитов, уточнить этническую принадлежность пациентов, перед коррекцией терапии определять носительство аллельного варианта *CYP2C19*17*, ассоциированного с повышенным риском кровотечений.

Таким образом, результаты исследований, проведенных в РФ, не позволяют однозначно оценить значение носительства полиморфных маркеров гена *CYP2C19* для прогноза у больных ИБС, принимающих клопидогрел. Для получения более достоверных результатов необходимо проведение качественных исследований с большим числом пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы оценили распространенность полиморфных маркеров гена *CYP2C19* среди 11 этнических групп в РФ, а также проанализировали влияние на эффективность и безопасность антиагрегантной терапии клопидогрелом, по данным отечественных исследований. Как и ожидалось, распространенность аллельного варианта *CYP2C19*2*, по данным проанализированных исследований, была выше среди представителей монголоидной расы. Наибольшая частота данного генотипа наблюдалась среди калмыков, а наименьшая – среди ингушей (соответственно 25,0 и 8,0%). Носительство *CYP2C19*3* изучалось не во всех исследованиях; наибольшая частота составила 21,2% среди татар.

Обнаружение такой высокой частоты аллеля *CYP2C19*3*, несомненно, является необычным фактом и требует уточнения, так как этот аллельный вариант встречается довольно редко (в среднем – у 5–7% азиатского населения и до 1% – у европео-

идов) [16]. Частота *CYP2C19*17* изучалась только в 2 исследованиях среди русских [34, 35] и оказалась близка к значениям среди европеоидов (14,0%). В целом распространенность клинически значимых аллелей и генотипов *CYP2C19* среди калмыков, татар, якутов, тувинцев, бурятов и алтайцев близка к таковой среди монголоидов, а частота среди русских, карачаевцев, черкесов и ингушей близка к показателям для европеоидов.

Несмотря на полученные доказательства влияния гена *CYP2C19* на частоту неблагоприятных ССС, по данным анализа зарубежных [12, 47, 49–52] и российских [34, 37] исследований, остается множество нерешенных вопросов, касающихся коррекции антиагрегантной терапии клопидогрелом у носителей определенных аллелей гена *CYP2C19*, а также экономической эффективности внедрения фармакогенетического тестирования. В случае выявления аллелей, ассоциированных с риском тромботических осложнений (*CYP2C19*2* или *CYP2C19*3*), возможны следующие варианты коррекции антиагрегантной терапии:

- увеличение дозы клопидогрела [57];
- назначение других ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов (prasugrel, ticagrelor) [58, 59];
- добавление к антиагрегантной терапии ингибиторов гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов P_{1b}/P_{3a} [60];
- добавление к антиагрегантной терапии цилостазола [61].

На основе изложенного можно сделать следующие выводы:

1. Изучение межэтнических особенностей распространенности клинически значимых полиморфизмов гена *CYP2C19* особенно актуально для такой многонациональной страны, как Российская Федерация. Результатом обнаружения таких различий может стать разработка рекомендаций и предупреждений для практикующих врачей в отдельно взятом регионе РФ.

2. Вопрос выбора оптимального антитромбоцитарного препарата с учетом всех генетических, клинических и конституциональных особенностей больного остается дискуссионным; для окончательного его решения необходимо больше крупных рандомизированных контролируемых исследований.

3. Несмотря на то, что фармакогенетическое тестирование не позволяет определять оптимальные терапевтические дозы препаратов у конкретного человека, оно помогает выявлять пациентов с высоким риском тяжелых неблагоприятных лекарственных реакций или даже смерти и корректировать фармакотерапию для их профилактики, а также снижать затраты на лечение.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Klingenberg M. et al. Pigments of liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 1958; 75: 376–86.
2. Garfinkel D. et al. Studies on pig liver microsomes. Enzymes and pigment composition of different microsomal fractions. Arch. Biochem. Biophys. 1958; 77: 493–509.
3. Evans W., McLeod H. et al. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. N. Engl. J. Med. 2003; 348 (6): 538–49.
4. Goldstein J. et al. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. Br. J. Clin. Pharmacol. 2001; 52: 349–55.
5. Kupfer A., Desmond P., Schenker S. Family study of a genetically determined deficiency of mephenytoin hydroxylation in man (letter). Pharmacologist. 1979; 21: 173.
6. Wrighton S., Stevens J., Becker G. et al. Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys. 1993; 306 (1): 240–5.
7. Goldstein J., De Morais S. et al. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. Pharmacogenetics. 1994; 4 (6): 285–99.
8. De Morais S., Wilkinson G., Blaisdell J. et al. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. J. Biol. Chem. 1994; 269 (22): 15419–22.
9. Chang M., Dahl M., Tybring G. et al. Use of omeprazole as a probe drug for CYP2C19 phenotype in Swedish Caucasians: comparison with S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype. Pharmacogenetics. 1995; 5 (6): 358–63.
10. De Morais S., Wilkinson G., Blaisdell J. et al. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. Mol. Pharmacol. 1994; 46 (4): 594–8.
11. Brösen K., de Morais S., Meyer U. et al. A multifamily study on the relationship between CYP2C19 genotype and s-mephenytoin oxidation phenotype. Pharmacogenetics. 1995; 5 (5): 312–7.
12. Mega J., Close S., Wiviott S. et al. Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel. N. Engl. J. Med. 2009; 360 (4): 354–62.
13. Luo H., Poland R., Lin K. et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study. Clin. Pharmacol. Ther. 2006; 80: 33–40.
14. Giusti B., Gori A., Marcucci R. et al. Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. Am. J. Cardiol. 2009; 103 (6): 806–11.
15. Bonello L., Armero S., AitMokhtar O. et al. Clopidogrel loading dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients carrying the 2C19*2 loss of function polymorphism. J. Am. Coll. Cardiol. 2010; 56 (20): 1630–6.
16. Collet J., Hulot J., Pena A. et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. Lancet. 2009; 373: 309–17.
17. Geisler T., Schaeffeler E., Dippon J. et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. Pharmacogenomics. 2008; 9 (9): 1251–9.
18. Pedersen R., Brasch-Andersen C., Sim S. et al. Linkage disequilibrium between the CYP2C19*17 allele and wildtype CYP2C8 and CYP2C9 alleles: identification of CYP2C haplotypes in healthy Nordic populations. Eur. J. Clin. Pharmacol. 2010; 66 (12): 1199–205.
19. Ramsjö M., Akillu E., Bohman L. et al. CYP2C19 activity comparison between Swedes and Koreans: effect of genotype, sex, oral contraceptive use, and smoking. Eur. J. Clin. Pharmacol. 2010; 66 (9): 871–7.
20. Sim S., Risinger C., Dahl M. et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. Clin. Pharmacol. Ther. 2006; 79 (1): 103–13.
21. Sugimoto K., Uno T., Yamazaki H. et al. Limited frequency of the CYP2C19*17 allele and its minor role in a Japanese population. Br. J. Clin. Pharmacol. 2008; 65 (3): 437–9.
22. Sohn D., Kusaka M., Ishizaki T. et al. Incidence of S-mephenytoin hydroxylation deficiency in a Korean population and the interphenotypic differences in diazepam pharmacokinetics. Clin. Pharmacol. Ther. 1992; 52: 160–9.
23. Roh H-K., Dahl M-L., Tybring G. et al. CYP2C19 genotype and phenotype determined by omeprazole in a Korean population. Pharmacogenetics. 1996; 6: 547–51.
24. Nakamura K., Goto F., Ray W. et al. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquine and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. Clin. Pharmacol. Ther. 1985; 38: 402–8.
25. Jurima M., Inaba T., Kadar T. et al. Genetic polymorphism of mephenytoin p-(4') hydroxylation—ndifference between Oriental and Caucasians. Br. J. Clin. Pharmacol. 1985; 19: 483–7.
26. Berilsson L., Lou Y-Q., Du Y-L. et al. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylation of debrisoquine and S-mephenytoin. Clin. Pharmacol. Ther. 1992; 51: 388–97.
27. Фрейдин М.Б., Брагина М.Ю., Петровский Ф.И. Анализ связи полиморфизма генов GSTT1, GSTM1, CYP2C19, CYP2E1c атопией у жителей г. Томска. Медицинская иммунология. 2003; 1–2: 107–112. (Freidin M.B., Bragina E.Yu., Petrowskiy F.I. Association of the GSTT1, GSTM1, CYP2C19, CYP2E1 Genes polymorphism with atopy. Medicinskaja immunologija. 2003; 1–2: 107–112. (in Russian))
28. Bonello L., Armero S., AitMokhtar O. et al. Clopidogrel loading dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients carrying the 2C19*2 loss of function polymorphism. J. Am. Coll. Cardiol. 2010; 56 (20): 1630–6.
29. Кантемирова Б.И., Тимофеева Н.В., Сычев Д.А. и др. Сравнительное изучение полиморфизма гена CYP2C19 у детей, проживающих в Астраханском регионе. Астраханский медицинский журнал. 2011; 4: 85–9. (Kantemirova B.I., Timofeeva N.V., Sychev D.A. A comparative study of cyp2c19 gene polymorphism in children living in the Astrakhanian region. Astrahanskij zhurnal. 2011; 4: 85–9. (in Russian))
30. Ромодановский Д.П., Хапаев Б.А., Игнатъев И.В. и др. Частоты «медленных» аллельных вариантов генов, кодирующих изоферменты цитохрома P450 CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 у карачаевцев и черкесов. Биомедицина. 2010; 2: 33–7. (Romodanovsky D.P., Kharapov B.A., Ignatiev V. Frequencies of the «slow» allele variants of the genes coding isoenzymes of cytochrome P450 CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 in Karachaevs and Circassians. Biomedicina. 2010; 2: 33–7. (in Russian))
31. Нижевич А.А., Юнусбаев Б.Б., Туйгунов М.М., и др. Изучение полиморфизма генов, ответственных за метаболизм ингибиторов протонной помпы у детей с H. PYLORI инфекцией: есть ли связь с эффективностью эрадикационной терапии? Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2009; 3: 101–4. (Nizhevich A.A., Yunusbaev B.B., Tuynunov M.M. Studying the polymorphisms of genes responsible for the metabolism of proton pump inhibitors in children with H. PYLORI infection: is there a connection with the effectiveness of eradication therapy? Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija. 2009; 3: 101–4. (in Russian))
32. Makeeva O., Stepanov V., Puzyrev V. et al. Global pharmacogenetics: genetic substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes. Pharmacogenomics. 2008; 9 (7): 847–68.
33. Горбаченко Е.А. Генетический полиморфизм ферментов метаболизма ксенобиотиков и формирования устойчивости к химиотерапии у больных хроническими лимфопролиферативными заболеваниями. Материалы XLIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»; 16–20 апреля 2011; Новосибирск; стр: 62–3. (Gorbachenko E.A. Genetic polymorphism of enzymes of xenobiotic metabolism and the formation of resistance to chemotherapy in patients with chronic lymphoproliferative disorders. Materials XLIX International Scientific Student Conference «Student and scientific and technological progress», 16–20 April 2011, Novosibirsk, pp: 62–3. (in Russian))
34. Комаров Л.А., Панченко Е.П., Донников А.Е. и др. Факторы, определяющие клиническую эффективность клопидогрела, и прогноз больных со стабильной формой ишемической болезни сердца. Кардиология. 2011; 2: 8–18. (Komarov A.L., Panchenko E.P., Donnikov A.E. Factors determining clinical effectiveness of clopidogrel and prognosis of patients with stable ischemic heart disease. Kardiologija. 2011; 51 (2): 8–18. (in Russian))
35. Мирзаев К.Б., Сычев Д.А., Каркищенко В.Н. и др. Частота полиморфных маркеров CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 среди русской популяции и сравнение распространенности CYP2C19*2 у пациентов с ишемической болезнью сердца, получающих терапию клопидогрелом, и здоровых добровольцев. Биомедицина. 2013; 1: 117–28. (Mirzaev K.B., Sychev O.A., Karkischenko V.N. et al. CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 Allele and Genotype Fre-

- quencies in Clopidogrel-Treated Patients with Coronary Heart Disease from the Russian Population. *Biomedicina*. 2013; 2: 117–28. (in Russian))
36. Gaikovitch E., Cascorbi I., Mrozikiewicz P. et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2003; 59 (4): 303–12.
 37. Галевич А.С., Валеева Д.Д., Миннетдинов Р.Ш. и др. Полиморфизм гена CYP2C19 у больных инфарктом миокарда, применяющих клопидогрел. *Кардиология*. 2012; 4: 20–4. (Galavich A.S., Valeeva D.D., Minnetdinov R.Sh. Gene polymorphism in patients with myocardial infarction who use clopidogrel. *Kardiologiya*. 2012; 4: 20–4. (in Russian))
 38. Халикова А.Р., Архипова А.А., Ахметов И.И. и др. Изучение полиморфизма гена цитохрома P-450 CYP2C19 в популяции татар, проживающих на территории Республики Татарстан. *Практическая медицина*. 2012; 3 (58): 53–5. (Khalikova A.R., Arkhipova A.A., Ahmetov I.I. The study of cytochrome P-450 CYP2C19 gene polymorphisms in population of Tatars living in Republic of Tatarstan. *Prakticheskaja Medicina*. 2012; 3 (58): 53–5. (in Russian))
 39. Steg P., James S., Atar D. et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* 2012; 33 (20): 2569–619.
 40. Hamm C., Bassand J., Agewall S. et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* 2011; 32 (23): 2999–3054.
 41. Yusuf S., Zhao F., Mehta S. et al. The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 494–502.
 42. Chen Z., Jiang L., Chen Y. et al. COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005; 366: 1607–21.
 43. Isaacs D., Lander C., McNeil J. et al. Clopidogrel – haemorrhage and haematological disorders. *Aust. Adv. Drug. Reactions. Bull.* 2004; 23 (4).
 44. Sabatine M., Cannon C., Gibson C. et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352 (12): 1179–89.
 45. Angiolillo D., Fernandez-Ortiz A., Bernardo E. et al. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel. *Arterioscler Thromb. Vasc Biol.* 2006; 26 (8): 1895–900.
 46. Taubert D., von Beckerath N., Grimberg G. et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006; 80 (5): 486–501.
 47. Simon T., Verstuyft C., Mary-Krause M. et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (4): 363–75.
 48. Weiss E., Bray P., Tayback M. et al. A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein Receptor as an Inherited Risk Factor for Coronary Thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 1090–4.
 49. Trenk D., Hochholzer W., Fromm M. et al. Cytochrome P450 2C19 681G >A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51: 1925–34.
 50. Shuldiner A., O'Connell J., Gurbel P. et al. Influence of CYP2C19 polymorphism on antiplatelet effects of clopidogrel and long-term recurrent ischemic event occurrence. *JAMA*. 2009; 302: 849–58.
 51. Sibbing D., Stegherr J., Latz W. et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J.* 2009; 30 (8): 916–22.
 52. Mega J., Simon T., Collet J. et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA*. 2010; 304 (16): 1821–30.
 53. Holmes M., Perel P., Shah T. et al. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011; 306 (24): 2704–14.
 54. FDA Drug Safety Communication: reduced effectiveness of Plavix (clopidogrel) in patients who are poor metabolizers of the drug. <http://www.fda.gov/Drugs/Drug-Safety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm203888.htm> (28 April 2010)
 55. Levine G., Bates E., Blankenship J. et al. ACCF /AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention. *JACC*. 2011; 58 (24): 44–122.
 56. Кудзоева З.Ф., Бокерия Л.А., Бокерия О.Л. XVII Ежегодная сессия научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева; 19–21 мая 2013; Москва; стр: 111. (Kudzoeva Z.F., Boqueria L.A., Boqueria O.L. et al. XVII Annual Session of Scientific Center of Cardiovascular Surgery. AN Bakuleva, 19–21 May 2013, Moscow, pp: 111. (in Russian))
 57. Bonello L., Camoin-Jau L., Arques L. et al. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51: 1404–11.
 58. Mega J., Close S., Wiviott S. et al. Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation*. 2009; 119: 2553–60.
 59. Gurbel P., Bliden K., Butler K. et al. Response to ticagrelor in clopidogrel non responders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation*. 2010; 121: 1188–99.
 60. Valgimigli M., Campo G., deCesare N. et al. Intensifying platelet inhibition with tirofiban in poor responders to aspirin, clopidogrel, or both agents undergoing elective coronary intervention: results from the double-blind, prospective, randomized tailoring treatment with tirofiban in patients showing resistance to aspirin and/or resistance to clopidogrel study. *Circulation*. 2009; 119: 3215–22.
 61. Jeong Y., Lee S., Choi B. et al. Randomized comparison of adjunctive cilostazol versus high maintenance dose clopidogrel in patients with high post-treatment platelet reactivity: results of the ACCEL-RESIST-ANCE (Adjunctive Cilostazol Versus High Maintenance Dose Clopidogrel in Patients With Clopidogrel Resistance) randomized study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 53: 1101–9.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОЦЕНКА МИОГЕНЕЗА И СОСТОЯНИЯ РУБЦА НА МАТКЕ ПОСЛЕ МИОМЭКТОМИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ ДОСТУПАХ

А.К. Долинский, Г.Х. Толибова, кандидат медицинских наук,
Т.Г. Траль, В.Ф. Беженарь, доктор медицинских наук, профессор
НИИ акушерства и гинекологии Д.О. Отта СЗО РАМН,
Российская Федерация, 199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3
E-mail: dolinskiy.andrey@yandex.ru

Введение. В связи со стремительным развитием эндовидеохирургии в гинекологии все чаще для выполнения реконструктивно-пластических операций на матке используется лапароскопический доступ. Однако в доступной литературе до настоящего времени нет однозначного мнения по поводу целесообразности использования лапароскопии для удаления миомы матки у пациенток с бесплодием или планирующих беременность.

Цель исследования. Сравнение гистологических и иммуногистохимических параметров состояния рубца на матке после выполнения миомэктомии лапароскопическим и лапаротомным доступами.

Материал и методы. Было исследовано 9 биоптатов миометрия из области рубца на матке после лапароскопической миомэктомии (LS), 9 биоптатов миометрия после лапаротомной миомэктомии (LT), для контроля изучили 10 биоптатов нормального миометрия (группа К).

Результаты. Результаты гистологических исследований показали, что при применении стандартизированной методики лапароскопической миомэктомии в биоптатах из области рубцов на матке отмечаются слабо выраженные фибропластические изменения с преимущественно высокой степенью вставания мышечных волокон и васкуляризацией в зоне соединительнотканного рубца по сравнению с биоптатами в группе с лапаротомным доступом.

Заключение. Полученные данные коррелировали с иммуногистохимическими характеристиками рубца, согласно которым экспрессия миозина и десмина (как показателей мышечной ткани) и коллагена IV типа (как показателя васкуляризации в области рубца) была достоверно выше в группе LS, чем в группе LT.

Ключевые слова: рубец на матке, миомэктомия, лапароскопия, иммуногистохимическое исследование

MOLECULAR ESTIMATION OF MYOGENESIS AND STATE OF UTERINE SCAR AFTER MYOMECTOMY IN DIFFERENT SURGICAL APPROACHES

A.K. Dolinskiy, G.Kh. Tolibova, T.G. Tral', V.F. Bezhenar'

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Federation, 199034, Saint-Petersburg, Mendeleevskaya line, 3

Introduction. Due to the impetuous development of endovideosurgery in gynecology, laparoscopic access technique is increasingly frequently used to perform myomectomy. However in the available literature until now there is no decisive opinion on the feasibility of using laparoscopy for removal of uterine fibroids in females with infertility or in cases of planning pregnancy.

The aim of the study. The aim of the study was to compare the histological and immunohistochemical parameters of the uterine scar after myomectomy performed by laparoscopic or laparotomic access.

Methods. The study included 9 myometrial biopsies from the area of the uterine scar after laparoscopic myomectomy (LS), 9 myometrial biopsies after laparotomic myomectomy (LT) and 10 biopsies of normal myometrium (control group, K).

Results. The results of histological studies have shown that in cases of the application of a standardized laparoscopic technique of myomectomy in biopsy scar on the uterus mild fibroblastic changes were observed with prevalently high degree of ingrowth of muscle fibers and vascularization in the zone of connective tissue scar, if compared with histological changes in bioplates in groups with laparotomic access.

Conclusions. The obtained data correlated with immunohistochemical characteristics, according to which the expression of myosin and desmin, as an indices of muscle tissue, and type IV collagen as a measure of vascularization of the scar in the LS group was significantly higher in comparison with LT group.

Key words: uterine scar, myomectomy, laparoscopy, immunohistochemical study

Актуальность проблемы. В последние годы миома матки все чаще встречается у женщин репродуктивного возраста, планирующих беременность [1]. Это связано, с одной стороны, с улучшением каче-

ства диагностики этой доброкачественной опухоли, с другой — с увеличением числа женщин, планирующих беременность в старшем репродуктивном возрасте. Основным патогенетически обоснован-

ным хирургическим методом лечения у данной категории больных является миомэктомия. В связи со стремительным развитием эндовидеохирургии в гинекологии все чаще для выполнения данного хирургического вмешательства используется лапароскопический доступ [2]. При этом до настоящего времени в литературе нет однозначного мнения по поводу целесообразности использования малоинвазивного доступа для удаления миомы матки у пациенток с бесплодием или планирующих беременность. Основным недостатком лапароскопической миомэктомии принято считать невозможность наложения полноценного шва на дефект стенки матки, использование избыточного количества электрохирургической энергии, приводящей к термическому некрозу миометрия, а значит, риск формирования неполноценного рубца на матке, а следовательно – высокий риск разрыва матки во время беременности и родов [7].

С этих позиций морфологическая характеристика состояния миометрия в области рубца на матке после выполнения миомэктомии различными хирургическими доступами является одним из важнейших критериев оценки эффективности и безопасности данных хирургических вмешательств. Так, степень васкуляризации, взаимосвязь рубца с мышечной тканью, отсутствие воспалительных изменений могут служить признаками качества состоятельности рубца. С другой стороны, даже минимальная воспалительная реакция приводит к рассасыванию коллагеновых волокон соединительной ткани и, таким образом, приводит к формированию неполноценного рубца на матке [8].

По данным литературы, наиболее выраженные гистологические изменения в зоне рубца на матке после выполнения миомэктомии лапароскопическим доступом выявлены в случаях, когда использовалась диатермокоагуляция ложа удаленного узла для обеспечения гемостаза. Так, при беременности на срезе рубцов миометрия после лапароскопической миомэктомии с коагуляцией ложа миомы была выше относительная площадь сосудистого компонента (в частности, вен, лимфатических сосудов и межклеточных щелей) по сравнению с состоянием микроциркуляторного русла рубцов после миомэктомии с последующим ушиванием ложа миомы. В рубцах после коагуляции также были выше процентное содержание и численная плотность нейтрофилов и эритроцитов, значительно чаще встречались лейкоцитарные инфильтраты. Такие изменения связаны с формированием после коагуляции толстого неоднородного по структуре рубца, в котором при растяжении во время беременности образуются микроразрывы. Особый интерес представляет тот факт, что, по данным литературы, изменения в пограничных тканях между миометрием и рубцом на матке после консервативной миомэктомии более значительны, чем в области самого рубца, что выражается в расширении лимфатических сосудов и

межклеточных щелей, значительной диффузной и очаговой лейкоцитарной инфильтрации, появлении эритроцитов, сидерофагов и отложений гемосидерина [4, 5]. Подобные изменения на границе рубца на матке и миометрия связаны с разрывами тканей при беременности. Происходит не расслоение или разрыв рубца, а его отрыв по границе – по месту прикрепления к гладкомышечным клеткам.

Данные об иммуногистохимической оценке состояния миометрия в области рубца на матке после выполнения миомэктомии в литературе малочисленны.

Целью исследования было сравнить гистологические и иммуногистохимические параметры состояния рубца на матке после выполнения миомэктомии лапароскопическим и лапаротомным доступом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовано 9 биоптатов миометрия из области рубца на матке после лапароскопической миомэктомии (LS), 9 биоптатов миометрия после лапаротомной миомэктомии (LT) и 10 биоптатов неизмененного миометрия (группа контроля (К)). Биопсию рубцов в большинстве случаев выполняли интраоперационно во время плановой операции кесарева сечения при помощи биопсийной трепан-иглы (Bard) (рис. 1, 2). Лишь 2 биоптата из группы LS и 1 – из группы LT были взяты во время плановой гинекологической операции с использованием лапароскопического доступа.



Рис. 1. Биопсийная игла Bard



Рис. 2. Рубец на матке после LS при проведении операции кесарева сечения

Всем пациенткам из группы LS в период 2010–2012 гг. выполнено вмешательство в отделении оперативной гинекологии НИИ акушерства и гинекологии Д.О. Отта СЗО РАМН с применением стандартизированной методики, использованием УЗ-скальпеля, минимальным использованием электрохирургической энергии и интракорпоральной методикой наложения эндошвов [3]. Пациентам из группы LT была выполнена миомэктомия при лапаротомии в различных лечебных учреждениях.

После получения биоптатов материал фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 ч. В последующем материал обезвоживали с помощью автоматической станции Leica TP1020, после чего выполняли стандартную обработку в спиртах нарастающей концентрации (70–95%), ксилоле и парафине с целью изготовления гистологических и иммуногистохимических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 3–7 мкм. Для обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин. Морфологическое исследование проводили по стандартной методике.

Для изучения экспрессии миозина с целью оценки развития мышечной ткани в области рубца использовали моноклональные антитела (Myosin, Smooth Muscle Clone SMMS-1, 1:50, Dako). Для оценки степени развития базальной мембраны, выполняющей опорную функцию стенки во вновь образующиеся сосуды в зоне рубцовой ткани, и адекватности кровотока, в них использовали антитела к коллагену IV типа (Collagen IV Clone CIV 22; 1:50, Dako). Для характеристики миогенеза в зоне рубца и дальнейшей косвенной оценки сократительной способности мышечного волокна, а также митохондриальной дисфункции в мышечных клетках использовали антитела к десмину (Desmin. 1:100, Clone D33, Isotype: IgG1/kappa).

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах. Срезы ткани толщиной 5 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). В качестве системы визуализации использовали Dako Cytomation LSAB2 System-HRP («Dako», Дания), содержащие биотинилированные козы антикроличьи и антимышиные антитела, стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена и 3,3'-диаминобензидин. Для проведения иммуногистохимической реакции использовали стандартный двухэтапный протокол с демаскировкой антигена (высокотемпературной обработкой ткани) в 0,01 М цитратном буфере pH 7,6.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполняли по стандартной методике.

Количественная оценка результатов исследования

Микропрепараты исследовали под микроскопом с настройкой освещения по Келлеру при увеличении 40×100 с целью получения общего представления о результатах ИГХ-реакции. Количественную оценку

результатов ИГХ-реакции проводили на микрофотографиях, полученных с помощью системы фиксации микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4, программного обеспечения «АСТ-1», версия 2.12. Из фотосъемки исключались поля зрения, содержащие дефекты ткани, дефекты окрашивания и артефакты.

Фотосъемку производили с увеличением ×400 (ок. ×10, об. ×40), с полным открытием апертурной диафрагмы, при поднятом конденсоре, в режиме Photo, время экспозиции – 1/20 с, чувствительность камеры – максимальная, размер изображения – 1280×1024 пикселей, графический формат изображения – JPEG (normal).

Дальнейшее количественное исследование проводили с помощью программы компьютерного анализа изображений «Морфология 5.0» (ВидеоТест, Россия).

Относительную площадь экспрессии (S, %) вычисляли как отношение площади иммунопозитивных клеток к общей площади препарата, оптическую плотность экспрессии – в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера по формуле:

$$A = \epsilon c l,$$

где $A = -\ln(I/I_0)$; I – интенсивность светового потока, прошедшего через слой светопоглощающего вещества; I_0 – интенсивность падающего светового потока; c – концентрация вещества, моль/л; l – толщина светопоглощающего слоя, см; ϵ – молярный коэффициент поглощения.

Использование показателя так называемой «оптической плотности экспрессии», являющегося базовым параметром программы «ВидеоТест-Морфология 5.0», для анализа оптических параметров микрофотографий является приемлемым, поскольку измерения осуществляются по аналогии со спектрофотометрическим анализом.

Метод спектрофотометрии позволяет рассчитать концентрацию вещества в растворе на основании оптической плотности данного раствора (в данном случае светопоглощающим слоем является не кювета с раствором, а гистологический препарат; анализируемым веществом – исследуемый маркер, при связывании с системой визуализации получивший искомое окрашивание) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты проведенного гистологического исследования показали, что в биоптатах рубцов после LS степень разрастания фиброзной ткани в зоне рубца была распределена следующим образом: в 6 (66,7%) случаях – слабое разрастание фиброзной ткани, в 2 (22,2%) – умеренно выраженное и в 1 (11,1%) – выраженный фиброз (рис. 3, а).

Как видно из рисунка 3, а, в толще полноценного миометрия определяется тонкая прослойка

грубоволокнистой соединительной ткани. В то же время среди пациенток, оперированных лапаротомическим доступом (ЛТ), у 4 (44,4%) было слабо выраженное разрастание фиброзной ткани, у 4 (44,4%) – умеренно выраженное и у 1 (11,1%) – выраженное разрастание фиброзной ткани. В контрольной группе в 3 (33,3%) случаях выявлены слабые фибропластические изменения.

На рис. 3, б определяются множественные хаотично расположенные волокна грубоволокнистой соединительной ткани с разной степенью интенсивности разрастания.

Гиалиноз послеоперационного рубца при лапароскопическом и при лапаротомном доступе отмечался в каждой группе у 2 (22,2%) больных: у 1 – со слабо выраженными и у 1 – со значительно выраженными изменениями (рис. 3, в).

На рис. 3, в представлен умеренно выраженный гиалиноз в зоне рубца после LS с сохранением миомеритрии и полями слабовыраженной соединительнотканной прослойки. В то же время в биоптатах после ЛТ определяется выраженный гиалиноз рубца с частично сохраненной васкуляризацией и полным отсутствием мышечной ткани (рис. 3, г).

Во всех препаратах склеротических изменений зоны рубца не диагностировано. Вростание мышечной ткани в зоне рубца является одним из главных диагностических критериев состоятельности рубца при последующих беременностях.

Результаты исследования показали, что в препаратах после LS степень врастания коррелировала с морфологической картиной фиброза: в 6 (66,7%) слу-

чаях – выраженная степень врастания и слабовыраженный фиброз, в 2 (22,2%) – умеренно выраженный и в 1 (11,1%) – слабовыраженный фиброз.

На рис. 3, д прослеживается упорядоченное расположение мышечных волокон с тонкими соединительнотканными прослойками и наличием сосудов капиллярного типа.

В сравнении с гистологическими характеристиками биоптатов после лапароскопического доступа при лапаротомии отмечались очаговая дисконструкция мышечных волокон и неравномерная степень их врастания с незначительным количеством сосудов капиллярного типа (рис. 3, е).

Морфологические признаки удовлетворительной васкуляризации рубца являются благоприятным прогностическим критерием состоятельности рубца. На рис. 3, ж представлена картина обширной васкуляризации после LS.

Морфологическая оценка препаратов показала, что в биоптатах после LS в 5 (55,6%) случаях степень васкуляризации была выражена значительно и характеризовалась наличием сосудов различного калибра, что свидетельствовало о хорошем кровоснабжении в зоне рубца (рис. 3, ж). В то же время в биоптатах рубцов после полостного доступа данный показатель составил 22,2% (2 случая) с недостаточным количеством сосудов капиллярного типа (рис. 3, з).

Воспалительные изменения продуктивного типа отмечались в 2 случаях при лапаротомическом и в 1 – при лапароскопическом доступе.

ИГХ-исследования показали, что экспрессия миозина в группе LS достоверно отличалась от та-

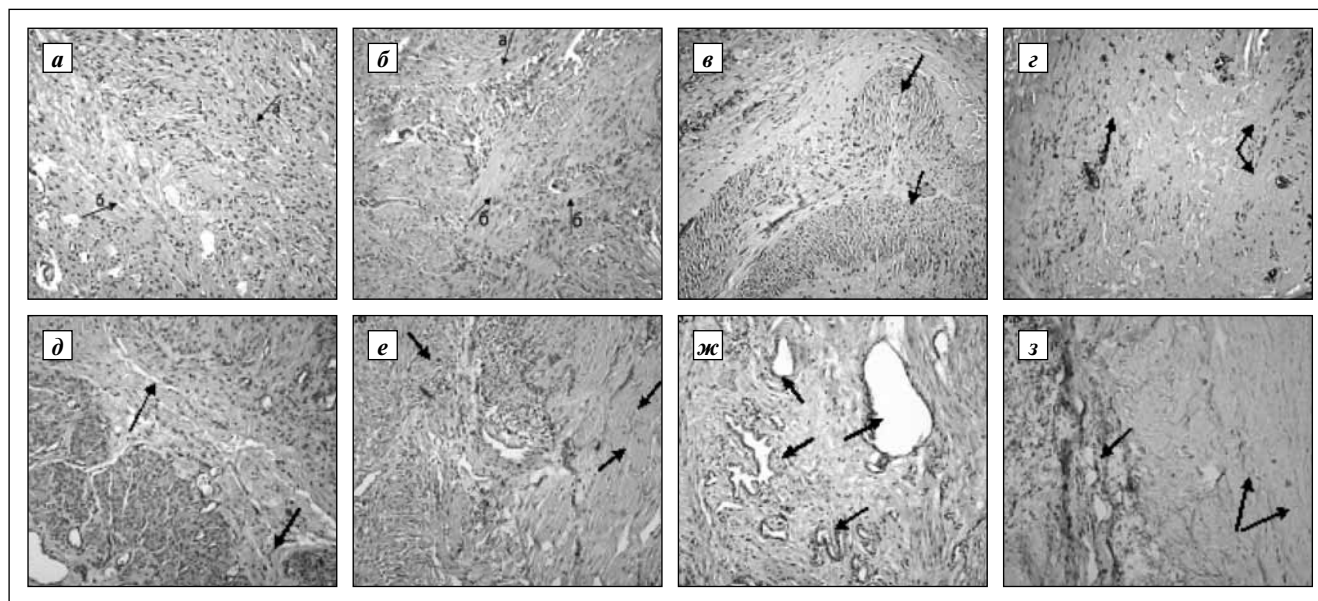


Рис. 3. а – степень выраженности фиброза у пациенток после LS (А – мышечная ткань Б – соединительная ткань); б – степень выраженность фиброза у пациенток после ЛТ (А – мышечная ткань; Б – соединительная ткань); в – гиалиноз рубца после LS; г – гиалиноз рубца после ЛТ; д – врастание миомеритрии в зоне рубца после LS; е – врастание мышечных волокон в зоне рубца после ЛТ; ж – степень васкуляризации в зоне рубца после LS; з – степень васкуляризация в зоне рубца после ЛТ; окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

ковой в группах LT и контрольной (соответственно $25,1 \pm 3,09$; $16,8 \pm 3,34$ и $16 \pm 2,09\%$; $p < 0,05$). В то же время при сравнении LT с контролем экспрессия миозина практически не изменялась ($16,8 \pm 3,34$ и $16 \pm 2,09\%$; $p = 0,08$). Можно полагать, что достоверное увеличение экспрессии миозина в группе LS по сравнению с неизменным миометрием связано с активным формированием мышечной ткани в области рубца. При сравнении LT с контролем данные об экспрессии миозина не различались ($p = 0,82$) (табл. 1). При сравнении оптической яркости (P) и оптической плотности экспрессии миозина в группах сравнения не наблюдалось достоверных отличий ($166,3 \pm 2,43$ и $165,2 \pm 7,43$; $0,19 \pm 0,021$ и $0,19 \pm 0,005$ усл. ед.), но при этом данные показатели были ниже, чем в контрольной группе (табл. 1).

При сравнении экспрессии коллагена IV типа отмечалось достоверное уменьшение экспрессии коллагена в группе LT по сравнению с LS ($11,6 \pm 2,31$ и $37,6 \pm 2,74\%$; $p < 0,001$). Данный результат совпадает с гистологическими данными, которые продемонстрировали более выраженную васкуляризацию зоны рубца в группе LS, чем в группе LT. В то же время экспрессия коллагена IV по сравнению с контролем в группе LT статистически не отличалась (соответственно $11,6 \pm 2,31$ и $14,7 \pm 1,5\%$; $p = 0,27$),

а в группе LS отмечено достоверное ее увеличение ($37,6 \pm 2,74$ и $14,7 \pm 1,48\%$; $p < 0,01$). По совокупности ИГХ- и гистологических исследований можно полагать, что васкуляризация рубца, маркером которой является коллаген IV типа, больше выражена в лапароскопических рубцах, нежели в лапаротомических, что, возможно, связано с неиспользованием избыточного количества шовного материала, а также с применением современного ареактивного шовного материала. При сравнении оптической яркости (P) экспрессии коллагена между группами LS и LT отмечено достоверное ее повышение в группе LS ($204,6 \pm 36,48$ и $161,3 \pm 2,68$ усл. ед.; $p < 0,05$), но без статистически значимых отличий по сравнению с контролем. При лапаротомическом доступе обнаружено достоверное уменьшение оптической яркости по сравнению с показателем в контрольной группе ($161,3 \pm 2,68$ и $190,6 \pm 4,83$ усл. ед.; $p < 0,05$; табл. 2). При анализе оптической плотности экспрессии коллагена IV в группах LT и LS отмечалось достоверное увеличение показателя по сравнению с контролем ($0,17 \pm 0,01$ и $0,19 \pm 0,007$ и $0,12 \pm 0,011$ усл. ед.; $p < 0,01$) без статистически значимых отличий между группами сравнения ($p = 0,19$; см. табл. 2).

При анализе экспрессии десмина между группами LS и LT отмечалось достоверное увеличение экспрессии в группе LS ($36,7 \pm 4,23$ и $15,1 \pm 4\%$; $p < 0,001$), однако различия с контролем оказались недостоверными ($42,5 \pm 4,92\%$; $p = 0,39$). Экспрессия десмина в группе LT была достоверно меньше, чем в контрольной ($15,1 \pm 4,0$ и $42,5 \pm 4,92\%$; $p < 0,001$).

Полученные результаты показали, что снижение экспрессии десмина в группе LT по сравнению с LS согласуются с гистологическими исследованиями, показавшими, что после лапаротомической миомэктомии зона рубца состоит из множества хаотично расположенных волокон грубоволокнистой соединительной ткани с разной степенью интенсивности разрастания и нарушением васкуляризации в зоне рубца. При сравнении оптической яркости (P) между группами LS и LT отмечалось достоверное увеличение экспрессии десмина в группе LS ($176,2 \pm 6,09$ и $149,4 \pm 3,67\%$; $p < 0,001$), при этом при сравнении с контрольной группой данный показатель имел те же значения ($176,2 \pm 6,09$ и $177,7 \pm 4,29\%$; $p > 0,05$). В то же время в группе LT отмечалось достоверное снижение оптической

Таблица 1

ЭКСПРЕССИЯ МИОЗИНА В БИОПТАТАХ (M±m)

Группа	Экспрессия, %	Яркость, p	Оптическая плотность, усл. ед.
LS	$25,1 \pm 3,09^{* \Delta}$	$165,2 \pm 7,43^{***}$	$0,19 \pm 0,021^{**}$
LT	$16,8 \pm 3,34$	$166,3 \pm 2,43^{***}$	$0,19 \pm 0,005^{***}$
К	$16 \pm 2,09$	$195,8 \pm 4,23$	$0,11 \pm 0,009$

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (К); Δ – $p < 0,05$ – по сравнению с группой LT.

Таблица 2

ЭКСПРЕССИЯ КОЛЛАГЕНА IV ТИПА В БИОПТАТАХ (M±m)

Группа	Экспрессия, %	Яркость, p	Оптическая плотность, усл. ед.
LS	$37,6 \pm 2,74^*$	$204,6 \pm 36,48$	$0,19 \pm 0,007^{**}$
LT	$11,6 \pm 2,31^{\Delta}$	$161,3 \pm 2,68^{* \Delta}$	$0,17 \pm 0,01^*$
К	$14,7 \pm 1,48$	$190,6 \pm 4,83$	$0,12 \pm 0,011$

Примечание: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем (К); Δ – $p < 0,05$ по сравнению с группой LS (здесь и в табл. 3).

Таблица 3

ЭКСПРЕССИЯ ДЕСМИНА В БИОПТАТАХ (M±m)

Группа	Экспрессия, %	Яркость, p	Оптическая плотность, усл. ед.
LS	$36,7 \pm 4,23^{\Delta}$	$176,2 \pm 6,09^{\Delta}$	$0,15 \pm 0,01^{\Delta}$
LT	$15,1 \pm 4,0^{**}$	$149,4 \pm 3,67^{**}$	$0,21 \pm 0,01^*$
К	$42,5 \pm 4,92$	$177,7 \pm 4,29$	$0,15 \pm 0,01$

яркости экспрессии десмина по сравнению с контрольной группой ($149,4 \pm 3,6$ и $177,7 \pm 4,29$ усл. ед.; $p < 0,001$). В группе LS отмечалось достоверное снижение оптической плотности экспрессии десмина по сравнению с группой LT ($0,15 \pm 0,01$ и $0,21 \pm 0,01$ усл. ед.; $p < 0,01$) и не отличалось от группы контроля ($0,15 \pm 0,01$ и $0,15 \pm 0,01$ усл. ед.; $p < 0,05$). При этом в группе LT оптическая плотность экспрессии десмина была достоверно больше в сравнении с контрольной группой $0,21 \pm 0,01$; $0,15 \pm 0,01$ усл. ед.; $p < 0,01$) (табл. 3).

Выводы. Таким образом, результаты гистологических исследований показали, что при применении стандартизированной методики LS с использованием щадящих видов хирургических энергий, атравматичного и ареактивного шовного материала, в биоптатах рубцов на матке отмечаются слабо выраженные фибропластические изменения с

преимущественно высокой степенью вставления мышечных волокон и васкуляризацией в зоне соединительнотканного рубца, по сравнению с гистологическими изменениями биоптатов в группе с лапаротомным доступом, где степень фиброза была значительно выше, а вращение мышечной ткани и васкуляризация в зоне рубца — ниже. Данные гистологического исследования коррелировали с ИГХ-данными, согласно которым экспрессия миозина и десмина, как показателей мышечной ткани и коллагена IV типа как показателя васкуляризации в области рубца была достоверно выше в группе, где применялся лапароскопический доступ (по сравнению с лапаротомией).

Полученные данные позволяют сделать вывод о безопасности применения лапароскопического доступа для выполнения миомэктомии у пациенток, планирующих беременность.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Айламазян Э.К. и соавт. Гинекология от пубертата до постменопаузы. М., 2006. (Aylamazian E.K. Gynecology: from pubertat till menopause. M.: 2006 (in Russian))
2. Беженарь В.Ф., Медведева Н.С., Айламазян Э.К. Современная стратегия и хирургическая техника при лапароскопической миомэктомии. Здоровье женщины. 2008; 4 (36): 22–6. (Bezhenar' V.F., Medvedeva N.S., Ajlamazjan Je.K. Modern strategy and surgical technique in laparoscopic myomectomy. Zdorov'e zhenshhiny. 2008; 4 (36): 22–6 (in Russian))
3. Беженарь В.Ф., Цыпурдеева А.А., Долинский А.К., Поленов Н.И., Опыт применения стандартизированной методики лапароскопической миомэктомии. Журн. акушерства и женских болезней. 2012; 4 (61): 23–33. (Bezhenar V.F., Tsipurdeeva A.A., Dolinsky A.K., Polenov N.I., Bayluk E.N., Kahiani M.I., Rusina E.I. Experience of using a standardized technique of laparoscopic myomectomy. Jurnal akusherstva i genskih bolezney. 2012; 4 (61): 23–33 (in Russian))
4. Насирова Р.Г. Сравнительная морфология рубцов миометрия после консервативной миомэктомии, выполненной различными хирургическими способами. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2010. (Nasirova R.G. Comparative morphology of scarring myometrium after conservative myomectomy performed various surgical methods, 2010 (in Russian))
5. Перминова Е.И. Патоморфологический анализ рубцов миометрия после кесарева сечения и консервативной миомэктомии. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2010. (Perminova E.I. Pathomorphologic analysis of the myometrium scar after cesarean section and conservative myomectomy, 2010 (in Russian))
6. Смирнова М.Ю., Джемлиханова Л.Х., Костючек И.Н. и др. Количественная иммуногистохимия: оптимизация анализа экспрессии сигнальных молекул в миометрии. Архив патологии. 2010; 1: 51–5. (Smirnova M.U., Dzhemlihanova L.H., Kostuchek I.N., Kvetnoyl M., Niauri D.A., Paltsev M.A. Quantitative immunohistochemistry: optimization analysis of the expression of signaling molecules in the myometrium. Arhivpatologii. 2010; 1: 51–55 (in Russian))
7. Dubuisson J., Chavet X. Uterine rupture during pregnancy after laparoscopic myomectomy. Hum. Reprod. 1995; 10: 1475–7.
8. Pozowski J., Poreba R., Buchacz P. Pregnancy and labor after uterine operations. Ginekol. Pol. 2003; 74 (2): 98–101.

Новости науки

ГИБРИДНЫЙ ВИРУС ГРИППА, СОЗДАННЫЙ В ЛАБОРАТОРИИ, СПОСОБЕН ПЕРЕДАВАТЬСЯ АЭРОЗОЛЬНО

Китайские ученые из Харбинского ветеринарно-исследовательского института создали гибридный вирус гриппа H5N1, несущий гены вируса 2009/H1N1, способный аэрозольно передаваться между млекопитающими. В прошлом вирус птичьего гриппа смог преодолеть межвидовой барьер и стал передаваться от птиц человеку, контактировавшему с тканями больной и погибшей птицы. Вирусы гриппа H5N1, способные инфицировать свиней, имеют аффинность к рецепторам на клетках дыхательных путей млекопи-

тающих. При помощи реверсивной генетики были созданы 127 вирусов-реассортантов между вирусами птичьего гриппа H5N1 и высокотрансмиссивным вирусом человека H1N1. Вирулентность реассортантов оценивали на мышах, а трансмиссивность — на морских свинках, которые имеют рецепторы как к человеческому, так и к птичьему гриппу. Некоторые варианты имели как высокую вирулентность, так и трансмиссивность. Таким образом, вирус птичьего гриппа H5N1 способен приобретать трансмиссивность.

Science Published Online May 2 2013. — DOI: 10.1126/science.1229455.

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Е.С. Герштейн, доктор биологических наук, профессор, **А.Н. Николаев**,
Е.А. Короткова, младший научный сотрудник, кандидат биологических наук,
В.В. Делекторская, доктор медицинских наук, **Д.А. Головков**, доктор медицинских наук

*Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24*

E-mail: biochimia@mtu-net.ru

Введение. Сигнальная система инсулиноподобных факторов роста (ИФР) играет важнейшую роль в возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей, поэтому ее компоненты могут рассматриваться в качестве перспективных диагностических и прогностических маркеров, а также потенциальных мишеней таргетной терапии.

Цель исследования. Сравнительная оценка содержания ИФР-1 и ИФР-2, ИФР-связывающих белков (ИФРСБ) 1 и 3 в сыворотке крови больных колоректальным раком (КРР) и практически здоровых людей, а также анализ взаимосвязи изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

Материал и методы. Иммуноферментными методами (Mediagnost) определено содержание ИФР-1 и 2 и ИФРСБ-1 и 3 в сыворотке крови 74 первичных больных КРР и 30 практически здоровых доноров.

Результаты. Продemonстрировано достоверное повышение уровня ИФР-1 и снижение уровня ИФРСБ-3 в сыворотке больных КРР по сравнению с показателями в контроле. Чувствительность ИФР-1 как потенциального диагностического маркера КРР при пороговом уровне 140 нг/мл составляет 80%, специфичность – 75%. Обнаружена достоверная отрицательная корреляция между возрастом обследованных и содержанием ИФР-1, однако у больных КРР она была значительно слабее, чем в контроле. У пациентов мужского пола обнаружено также достоверное повышение уровня ИФР-2 в сыворотке крови по сравнению с таковым в контроле. У больных КРР отсутствовала корреляционная взаимосвязь между уровнями ИФР и ИФРСБ, отмеченная в контрольной группе. Взаимосвязи с основными показателями распространенности КРР не выявлено.

Заключение. У больных КРР выявлены нарушения в системе ИФР/ИФРСБ, свидетельствующие об увеличении биодоступности данных факторов роста.

Ключевые слова: ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1, ИФРСБ-3, колоректальный рак

INCULIN-LIKE GROWTH FACTORS IN SERUM OF COLORECTAL CANCER PATIENTS

E.S. Gershtein, A.N. Nikolayev, E.A. Korotkova, V.V. Delektorskaya, D.A. Golovkov

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the RAMS, Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24

Introduction. Insulin-like growth factors (IGFs) signaling system plays a key role in development and progression of various malignant tumors, and its components may be considered as prospective diagnostic and prognostic markers and potential objects of targeted therapy.

The aim of the study. Comparative assessment of IGF-1 and 2, and type 1 and 3 IGF-binding proteins (IGFBP) levels in blood serum of colorectal cancer (CRC) patients and practically healthy persons, and analysis of associations between the parameters studied and main clinical and pathological features of this disease.

Methods. IGF-1 and 2 and type 1 and 3 IGFBPs levels were measured in pre-operative blood serum of 74 primary CRC patients and 30 practically healthy persons by standard ELISA kits (Mediagnost).

Results. IGF-1 level was significantly increased and IGFBP-3 level – decreased in CRC patients' sera as compared to control group. Sensitivity of IGF-1 as a prospective diagnostic CRC marker at 140 ng/ml cut-off level comprised 80%, specificity – 75%. Significant negative association was demonstrated between patients' and donors' age and serum IGF-1 levels, but in CRC patients it was less pronounced than in control group. In male patients a significant increase of serum IGF-2 level as compared to control group was also observed. Some correlations between serum IGFs and IGFBPs observed in control groups were not found in CRC patients. No associations were revealed between serum IGFs and IGFBPs levels and main criteria of colorectal cancer progression.

Conclusion. IGF/IGFBP system disturbances indicating to an increase of IGFs bioavailability were revealed in CRC patients.

Key words: IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-3, colorectal cancer

Разработка новых подходов к лечению колоректального рака (КРР) – одна из важнейших проблем онкологии, привлекающая пристальное внимание

клиницистов. Однако несмотря на успехи, достигнутые в клинической диагностике и совершенствовании хирургических и комплексных методов ле-

чения, смертность при этом заболевании остается довольно высокой. Многие исследователи связывают дальнейший прогресс в повышении эффективности лечения КРР не только с рациональным использованием существующих методов лечения, но и с разработкой принципиально новых патогенетических методов терапии, основанных на современных достижениях в изучении биохимии и молекулярной биологии опухолей.

Сигнальная система инсулиноподобных факторов роста играет значительную роль в возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей [1]. Она включает инсулиноподобные факторы роста 1-го и 2-го типа (ИФР-1 и ИФР-2) – митогенные пептиды, высокомолекулярные друг другу и инсулину, синтезирующиеся в печени и некоторых других тканях под влиянием гормона роста гипофиза и воздействующие на периферические ткани, распространяясь по организму с кровью (центральный или эндокринный механизм действия), их трансмембранные клеточные рецепторы и связывающие белки крови (ИФРСБ). ИФР-1 и ИФР-2 синтезируются также клетками различных опухолей и являются ауто/паракринными медиаторами, опосредующими рост, метастазирование и антиапоптотические ответы злокачественных клеток. ИФР, рецепторы ИФР и ИФРСБ образуют сложно регулирующую сеть взаимодействий как между собой, так и с другими биологическими регуляторами роста и выживаемости клеток. В настоящее время известно 6 ИФРСБ, а также семейство гомологичных связывающих белков, которые обладают значительно меньшим сродством к ИФР-лигандам. ИФРСБ модулируют биологическую доступность и активность ИФР несколькими способами: они осуществляют перенос ИФР из периферической крови к тканям-мишеням (ИФРСБ-1, 2 и 4), поддерживают резервный уровень ИФР в крови (это преимущественно функция ИФРСБ-3), потенцируют или ингибируют эффекты ИФР, а также опосредуют некоторые ИФР-независимые биологические эффекты. Расщепление ИФРСБ специфическими протеазами модулирует уровни свободных ИФР и ИФРСБ, а значит, и эффекты ИФР в тканях.

Результаты экспериментальных и предварительных клинических исследований свидетельствуют о том, что в клетках КРР присутствуют все компоненты, необходимые для реализации аутокринного механизма действия ИФР-1 и ИФР-2 [2–8]. Показано, что белки семейства ИФР стимулируют не только пролиферативную, но также инвазивную и ангиогенную активность клеток, а ИФРСБ, напротив, оказывают подавляющее действие на эти процессы [9]. Уровни и соотношение различных компонентов системы ИФР в периферической крови неразрывно связаны с факторами питания, которые, в свою очередь, играют ключевую роль в этиологии КРР [10–12]. Так, высокий уровень ИФР-1 считается фактором повы-

шенного риска развития этого заболевания [13, 14], роль других компонентов ИФР-сигнальной системы менее ясна.

Еще одной причиной для исследования роли ИФР-сигнальной системы при КРР является возможность использования специфических («таргетных») ингибиторов для подавления ее активности. Существует несколько подходов к решению этого вопроса: снижение уровня и(или) биологической активности циркулирующих факторов роста, блокирование функции рецепторов и активация АМР-киназы, блокирующей нижележащие эффекты рецепторов ИФР [15]. В экспериментальных исследованиях продемонстрирована возможность торможения роста КРР с помощью моноклональных антител к ИФР-рецепторам [16] и низкомолекулярных ингибиторов их активности [17–19]. Предпринимаются также попытки использовать в качестве терапевтических агентов, ингибирующих активность ИФР-сигнальной системы, рекомбинантные ИФРСБ [20, 21].

Целью данного исследования были сравнительная оценка содержания ИФР-1 и ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови больных КРР и практически здоровых людей, а также анализ взаимосвязи изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовали 74 больных с впервые выявленным КРР (39 мужчин и 35 женщин) в возрасте от 20 до 85 лет (медиана – 62 года), проходивших обследование и лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2011–2012 гг. Рак прямой кишки был диагностирован у 45 больных, ободочной кишки – у 12, анального канала – у 9. У 18 больных была I, у 24 больных – II, у 20 – III и у 12 – IV стадия заболевания. Все больные с I–III стадиями были оперированы в радикальном объеме. Больным с IV стадией были выполнены преимущественно циторедуктивные операции. В контрольную группу вошли 30 практически здоровых людей (17 мужчин и 13 женщин) в возрасте от 29 до 84 лет (медиана – 61 год).

Концентрацию ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа производства компании «Mediagnost» (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом универсальном ридере для микропланшет EL×800 (Bio-Tek Instruments Inc., США). Содержание всех исследованных белков в сыворотке крови выражали в нг/мл.

Данные обрабатывали с помощью программы «Statistica 7.0». В связи с тем, что распределение большинства исследованных показателей отличалось от нормального, при сравнении показателей

СОДЕРЖАНИЕ ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1 И ИФРСБ-3 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

Группа	Медиана, квартили, нг/мл			
	ИФР-1	ИФР-2	ИФРСБ-1	ИФРСБ-3
Больные КРР	167 (136–227)	830 (665–958)	2,7 (1,4–4,3)	2341 (2035–3245)
Контрольная	127 (108–150)	720 (550–930)	2,4 (0,8–6,6)	3670 (3010–4860)
5–95% контроля	84,2–180	490–1205	0–12,5	256–11384
p	0,00004	0,1	0,6	0,000009

и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические методы: критерии Манна–Уитни и Kruskal–Wallis, тест корреляции рангов Спирмена (R). Различия и корреляции считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены статистические показатели концентрации исследованных маркеров в сыворотке крови общей группы больных КРР и группы контроля.

Обнаружено высокодостоверное увеличение медианного уровня ИФР-1 и снижение уровня ИФРСБ-3 у больных КРР по сравнению с контролем. Однако только у 35 из 74 (47%) пациентов с КРР уровень ИФР-1 превышал верхний 95% доверительный интервал (ДИ) контроля, равный 181 нг/мл ($p = 0,002$), т.е. чувствительность этого теста при данном пороговом значении была невысокой. Однако если снизить специфичность до 75% (пороговый уровень – 140 нг/мл), то диагностическая чувствительность ИФР-1 в общей группе повышается до 80%.

Как в контроле, так и у больных КРР обнаружена достоверная отрицательная корреляция между возрастом обследованных и содержанием ИФР-1, однако связь с возрастом у больных КРР была значительно слабее, чем в контроле (соответственно $R = -0,29$; $p = 0,014$ и $R = -0,76$; $p = 0,0001$).

В контрольной группе также выявлена прямая зависимость между уровнями ИФР-2 и ИФРСБ-3

($R = 0,82$; $p = 0,0001$) и обратная – между ИФР-1 и ИФРСБ-1 ($R = -0,4$; $p = 0,03$) в сыворотке крови, отсутствовавшие в группе больных КРР. Таким образом, можно предположить, что у больных КРР нарушен баланс между ИФР и связывающими их белками крови, что свидетельствует об изменении биодоступности данных факторов роста.

В табл. 2 представлены данные о содержании исследованных маркеров в контрольной группе и у больных КРР в зависимости от пола.

В группе контроля уровни ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 были достоверно выше в сыворотке крови женщин, чем мужчин (во всех случаях $p < 0,01$). У больных КРР аналогичные достоверные различия отмечены только для ИФРСБ-3 ($p = 0,003$). При этом если в общей группе пациентов уровень ИФР-2 не отличался от такового в контроле, то у пациентов мужского пола этот показатель достоверно превышал показатели у мужчин в контроле ($p = 0,007$). Различия, выявленные для ИФР-1 и ИФРСБ-3 в общей группе пациентов, сохранялись как у мужчин, так и у женщин. В целом нарушения в балансе сывороточных ИФР/ИФРСБ при КРР более выражены у мужчин, чем у женщин.

При анализе взаимосвязи содержания ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови с основными показателями распространенности КРР, а также с гистологическим строением, степенью дифференцировки (аденокарцином) и локализацией опухоли статистически достоверных различий не выявлено (табл. 3). Можно отметить тенденцию к повышению

Таблица 2

СОДЕРЖАНИЕ ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1 И ИФРСБ-3 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА

Группа	Медиана, квартили, нг/мл			
	ИФР-1	ИФР-2	ИФРСБ-1	ИФРСБ-3
Контрольная:				
мужчины (n=39)	128 (108–150)	675 (525–785)	1,4 (0,3–2,5)	3150 (2965–3550)
женщины (n=35)	125 (109–150)	930 (670–1140)	4,6 (2,3–9,1)	4860 (4180–5630)
Больные КРР:				
мужчины (n=39)	179 (140–228)	815 (697–927)	2,1 (1,4–4,2)	2166 (1957–2716)
женщины (n=35)	161 (131–230)	829 (697–978)	3,2 (1,3–5,4)	2958 (2212–3703)

**СОДЕРЖАНИЕ ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1 И ИФРСБ-3
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ
С УЧЕТОМ ОСНОВНЫХ КЛИНИЧЕСКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

Группа	Медиана (пределы колебания), нг/мл			
	ИФР-1	ИФР-2	ИФРСБ-1	ИФРСБ-3
С учетом стадии:				
I (n=18)	182 (69–282)	701 (534–3121)	3,4 (0,2–6,5)	2535 (3,3–5704)
II (n=24)	163 (64,3–637)	799 (478–2044)	2,1 (0,8–11,3)	2216 (1887–3910)
III (n=20)	208 (66,5–541)	829 (459–1676)	3,0 (0,7–10,7)	2320 (1748–9097)
IV (n=12)	152 (71,4–408)	954 (463–2946)	4,6 (0,6–47,2)	2777 (1502–24700)
По критерию T:				
T ₁ (n=7)	211 (146–282)	793 (664–959)	4,2 (0,2–6,5)	3800 (3,3–5403)
T ₂ (n=14)	149 (69–249)	694 (459–3121)	2,2 (0,7–6,5)	2094 (1678–5703)
T ₃ (n=36)	167 (64,3–637)	837 (459–2946)	2,7 (0,6–18,9)	2314 (1806–24700)
T ₄ (n=17)	176 (109–541)	824 (463–1027)	3,1 (0,7–47,2)	2780 (1502–2193)
По критерию N:				
N ₀ (n=46)	172 (64,3–637)	781 (463–3122)	2,0 (0,2–11,3)	2309 (3,3–9976)
N ₁ (n=22)	179 (66,5–491)	841 (459–2946)	3,4 (0,6–47,2)	2627 (1748–24700)
N ₂ (n=6)	190 (113–541)	976 (773–1019)	2,3 (0,7–10,7)	2409 (1832–2780)
По критерию M:				
M ₀ (n=62)	178 (64,3–637)	806 (459–3122)	2,7 (1,5–12,1)	2308 (3,3–9096)
M ₁ (n=12)	152 (71,4–408)	954 (463–2946)	4,6 (0,6–47,2)	2777 (1501–24700)
По локализации:				
прямая кишка (n=45)	164 (69–541)	778 (463–2946)	2,1 (0,6–10,7)	2305 (550–24700)
сигмовидная кишка (n=12)	234 (132–637)	963 (459–3122)	3,0 (1,4–47,2)	2334 (1748–4771)
анальный отдел (n=9)	181 (108–282)	842 (573–2228)	3,2 (0,2–5,4)	2625 (3,3–4551)
прочие (n=8)	105 (64,3–230)	792 (477–987)	5,4 (0,8–18,9)	2708 (1978–9976)
<i>Гистологический вариант строения опухоли</i>				
По гистологическому строению опухоли:				
аденокарцинома (n=65)	168 (64,3–637)	811 (459–3121)	2,8 (0,6–47,2)	2340 (550–24700)
плоскоклеточный рак (n=9)	181 (108–282)	842 (573–2228)	3,2 (1,3–4,2)	2624 (3,3–4551)
По степени дифференцировки аденокарцином:				
высокая (n=14)	185 (86,4–491)	696 (565–1028)	5,0 (0,8–47,2)	2684 (550–5403)
умеренная (n=35)	164 (71,4–637)	839 (459–3121)	3,1 (0,6–18,9)	2482 (1806–24700)
низкая (n=16)	199 (64,3–317)	818 (477–1677)	3,4 (0,8–11,3)	2042 (1748–3615)

уровня ИФР-2 с утяжелением стадии заболевания, а также степени поражения лимфатических узлов (индекс N). В то же время уровни всех маркеров, кроме ИФР-2, были наиболее высокими при индексе T₁ – (отсутствие инвазии в окружающие ткани). При сопоставлении с показателем отдаленного метастазирования (M) обнаружено недостоверное увеличение уровня всех исследованных маркеров в сыворотке крови больных КРР при наличии отдаленных метастазов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе полученных результатов в сыворотке крови больных КРР было выявлено достоверно повышенное содержание ИФР-1 и пониженный уровень ИФРСБ-3. Чувствительность ИФР-1 как потенциального диагностического маркера КРР составляет 80% при 75% специфичности (пороговый уровень – 140 нг/мл). У пациентов мужского пола

обнаружено также достоверное повышение уровня ИФР-2 в сыворотке крови по сравнению с таковым в контроле. Кроме того, как в контрольной группе, так и у больных КРР обнаружена достоверная отрицательная корреляционная связь между возрастом и содержанием ИФР-1, однако связь с возрастом у больных КРР была значительно слабее, чем в контроле. У больных КРР также отсутствовала корреляционная взаимосвязь между уровнями ИФР и ИФРСБ, отмеченная в контрольной группе, что свидетельствует о нарушении биодоступности ИФР. Не обнаружено достоверной взаимосвязи уровней ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови у больных КРР с основными показателями распространенности процесса, а также с гистологическим строением и локализацией опухоли.

*Исследование поддержано РФФИ,
грант 12-03-00401.*

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Костылева О.И., Герштейн Е.С., Дигаева М.А. Инсулиноподобные факторы роста, их рецепторы и связывающие белки как патогенетические факторы и потенциальные мишени терапии в онкологии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2009; 6: 3–8. (Kostyleva O.I., Gershtein E.S., Digayeva M.A. Insulin-like growth factors, their receptors and binding proteins as pathogenetic factors and potential therapy targets in oncology. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmacevticheskoy khimii*. 2009; 6: 3–8 (in Russian))
2. Durai R., Yang W., Gupta S. et al. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int. J. Colorectal Dis.* 2005; 20 (3): 203–20.
3. Koda M., Reszec J., Sulkowska M. et al. Expression of the insulin-like growth factor-I receptor and proapoptotic Bax and Bak proteins in human colorectal cancer. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1030: 377–83.
4. Fu P., Thompson J., Leeding K. et al. Insulin-like growth factors induce apoptosis as well as proliferation in LIM 1215 colon cancer cells. *J. Cell Biochem.* 2007; 100 (1): 58–68.
5. Yavari K., Taghikhani M., Maragheh M. et al. Knockdown of IGF-1R by RNAi inhibits SW480 colon cancer cells growth in vitro. *Arch. Med. Res.* 2009; 40 (4): 235–40.
6. Davies M., Gupta S., Goldspink G., Winslet M. The insulin-like growth factor system and colorectal cancer: clinical and experimental evidence. *Int. J. Colorectal Dis.* 2006; 21 (3): 201–8.
7. Vrieling A., Voskuil D., Bosma A. et al. Expression of insulin-like growth factor system components in colorectal tissue and its relation with serum IGF levels. *Growth Horm. IGF Res.* 2009; 19 (2): 126–35.
8. Sztefko K., Hodorowicz-Zaniewska D., Popiela T., Richter P. IGF-I, IGF-II, IGFBP2, IGFBP3 and acid-labile subunit (ALS) in colorectal cancer patients before surgery and during one year follow up in relation to age. *Adv. Med. Sci.* 2009; 54 (1): 51–8.
9. Bustin S., Dorudi S., Phillips S. et al. Local expression of insulin-like growth factor-I affects angiogenesis in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2002; 23 (3): 130–38.
10. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J. Nutr.* 2001; 131 (Suppl. 1): 3109–20.
11. Jenab M., Riboli E., Cleveland R. et al. Serum C-peptide, IGFBP-1 and IGFBP-2 and risk of colon and rectal cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int. J. Cancer.* 2007; 121 (2): 368–76.
12. Park J. Inhibition of colon cancer cell growth by dietary components: role of the insulin-like growth factor (IGF) system. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2008; 17 (Suppl. 1): 257–60.
13. Nomura A., Stemmermann G., Lee J., Pollak M. Serum insulin-like growth factor I and subsequent risk of colorectal cancer among Japanese-American men. *Am. J. Epidemiol.* 2003; 158 (5): 424–31.
14. Rinaldi S., Cleveland R., Norat T. et al. Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Cancer.* 2010; 126 (7): 1702–15.
15. Bruchim I., Werner H. Targeting IGF-1 signaling pathways in gynecologic malignancies. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2013; 17 (3): 307–20.
16. Mitsiades C., Mitsiades N., McMullan C. et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell.* 2004; 5 (3): 221–30.
17. Perer E., Madan A., Shurin A. et al. Insulin-like growth factor I receptor antagonism augments response to chemoradiation therapy in colon cancer cells. *J. Surg. Res.* 2000; 94 (1): 1–5.
18. Maloney E., McLaughlin J., Dagdigian N. et al. An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 2003; 63 (16): 5073–83.
19. Vanamala J., Reddivari L., Radhakrishnan S., Tarver C. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer.* 2010; 10: 238.
20. Leng S., Leeding K., Whitehead R., Bach L. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II-induced but not basal proliferation and adhesion of LIM 1215 colon cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 2001; 174 (1–2): 121–7.
21. Alami N., Page V., Yu Q. et al. Recombinant human insulin-like growth factor-binding protein 3 inhibits tumor growth and targets the Akt pathway in lung and colon cancer models. *Growth Horm. IGF Res.* 2008; 18 (6): 487–96.

Новости науки

ЛИХОРАДКА ДЕНГЕ ВСТРЕЧАЕТСЯ В 3 РАЗА ЧАЩЕ, ЧЕМ СЧИТАЛОСЬ

Лихорадка Денге принадлежит к числу наиболее опасных вирусных заболеваний, против которых нет вакцины, а также специфических препаратов для лечения. Лихорадка Денге распространяется через укусы moskitov; она известна и как «костоломная лихорадка» — по боли, которую вызывает. Больные с острой формой выздоравливают при общей поддерживающей терапии, но осложнения часто ведут к летальному исходу.

По мнению эпидемиолога и врача J. Farrar из Оксфордского клинического центра, работающего в городе Хо-Ши-Мин (Вьетнам), количество случаев заболеваний лихорадкой Денге на Земле ежегодно

увеличивается. Однако информация, поступающая в ВОЗ из различных регионов, недостаточно полная. Проанализировав 8300 сообщений о лихорадке Денге, а также учитывая новые сведения о факторах риска (таких, как рост популяции, урбанизация территорий, на которых живет москит-переносчик *Aedes aegypti*) и используя технологию компьютерного моделирования, исследователь пришел к выводу, что в 2010 г. лихорадка Денге поразила 96 млн человек, которые попали в клинику, и сообщения об этих случаях поступили в ВОЗ. При этом еще 294 млн человек перенесли мягкую или бессимптомную форму инфекции. При этом общее количество случаев заболевания достигает 390 млн и более чем в 3 раза превышает оценку ВОЗ (от 50 до 100 млн).

Nature. — 2013; 496 (25): 504–7.

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О.И. Костылева, кандидат медицинских наук, **А.В. Масляев**, **В.Д. Ермилова**, кандидат медицинских наук, **И.В. Высоцкая**, доктор медицинских наук, профессор, **М.В. Грицкевич**, **Л.К. Овчинникова**, кандидат медицинских наук, **С.М. Портной**, доктор медицинских наук

*Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24*

E-mail: esgershtein@gmail.com

Введение. Патогенез РМЖ связан с нарушениями функционирования сложной системы регулирования эффектов ИФР и активацией ИФР-сигнального пути. Исследования последнего 10-летия выявили прямую взаимосвязь между высоким уровнем ИФР-1 в крови и риском развития злокачественных опухолей предстательной и молочной желез, толстой кишки, яичников, легкого, шейки матки.

Цель исследования. Оценка содержания ИФР-1 и ИФР-2 в сыворотке крови больных РМЖ и практически здоровых женщин, а также анализ взаимосвязи изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

Материал и методы. Обследовали 79 больных РМЖ и 16 практически здоровых женщин в возрасте от 27 до 76 лет. Концентрацию ИФР-1 и ИФР-2 в сыворотке крови определяли наборами для прямого иммуноферментного анализа «IGF-I ELISA», «IGF-II ELISA» (Mediagnost GmbH, Германия). Рецепторы Her-2/neu эстрогенов (РЭ) и прогестерона (РП) в ткани РМЖ исследовали стандартными иммуногистохимическими методами.

Результаты. Не выявлено взаимосвязи исходного содержания ИФР-1 и ИФР-2 в сыворотке с показателями системы TNM. Достоверная связь уровней ИФР выявлена только со статусом репродуктивной функции, а также с (РЭ)(РП)Her-2/neu-статусом РМЖ

Заключение. Полученные в исследовании данные подтверждают гипотезу об участии ИФР-сигнального пути в регуляции функционирования рецептор-негативных РМЖ.

Ключевые слова: ИФР-1, ИФР-2, рак молочной железы

INCULIN-LIKE GROWTH FACTORS IN THE SERUM OF BREAST CANCER PATIENTS

O.I. Kostyleva, A.V. Maslyaev, V.D. Ermilova, I.V. Vysotskaya, M.V. Gritskovich, L.K. Ovchinnikova, S.M. Portnoy
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24

Introduction. Breast cancer pathogenesis is associated with alterations in processes of regulating of IGF effects and also in IGF-signaling pathway activation. The direct correlation between high IGF blood serum levels and the rescue of malignancies in prostate, breast, ovarium, colon, lung and cervix.

The aim of the study. Evaluation of IGF-I and IGF-II blood serum levels in breast cancer patients and in practically healthy women, and also analysis of links between obtained data and basic clinico-morphological characteristics of breast cancer.

Methods. Insulin-like growth factors 1 and 2 (IGF 1 and IGF 2) were measured in blood serum of 79 patients with primary breast cancer and 16 control practically healthy women aged 27–76 using standard ELISA kits («IGF-I ELISA», «IGF-II ELISA» (Mediagnost GmbH, Germany). HER2/neu, ER and PR receptor status of breast cancer tissues was evaluated by standart immunohistochemical methods.

Results. No correlation was found between basic IGF-I and IGF-II serum levels and TNM rates. The IGF serum levels correlated reliably only with menopausal status and with (ER)(PR)Her-2/neu status of breast cancer.

Conclusions. Obtained data confirm hypothesis about involvement of IGF-signaling pathway in regulation of receptor-negative breast cancer growth.

Key words: IGF 1, IGF 2, breast cancer

Связанный с инсулиноподобными факторами роста (ИФР) сигнальный путь регуляции канцерогенеза включает ИФР-лиганды, а также их рецепторы и связывающие белки, которые образуют сложно регулирующую сеть взаимодействий не только между собой, но и с другими биологическими модуляторами роста и выживаемости клеток [1–6]. Воздействие ИФР на клетки опосредуется 2 типами специфических ИФР-рецепторов — рецепторами инсулина и гибридным

рецептором, связывающим как инсулин, так и ИФР-1 [2, 5, 6]. ИФР-рецептор 1-го типа (ИФР-Р1) является медиатором первичного ответа всех ИФР, экспрессируется во всех типах клеток, кроме гепатоцитов и Т-лимфоцитов, и служит важным элементом обеспечения нормального развития организма. У эмбрионов мышей, лишенных ИФР-Р1, выявляются дефекты развития легких, кожи, костей, неврологические нарушения [7]. Связывание лигандов с ИФР-Р1 при-

водит к его олигомеризации, аутофосфорилированию и активации внутренней тирозинкиназы. Далее тирозинкиназа ИФР-Р1 прямо фосфорилирует различные клеточные субстраты и сигнальные молекулы, участвующие в регуляции апоптоза, построении цитоскелета и процессах клеточной адгезии, а также во множестве других физиологических процессов в клетках [4]. Рецептор ИФР 2-го типа (ИФР-Р2) представляет собой катионнезависимый маннозо-6-фосфатный рецептор, и его роль в реализации эффектов ИФР пока неясна [2]. Известно, что ИФР-Р2 не связывает инсулин. О механизмах реализации эффектов ИФР через ИФР-Р2 известно, что он работает прежде всего как рецептор-поглотитель (scavenger receptor), регулируя интернализацию и деградацию экстраклеточного ИФР-2 и, соответственно, уровень циркулирующего ИФР-2 [2].

В отличие от инсулина, циркулирующие ИФР взаимодействуют с высокоаффинными связывающими белками (ИФРСБ). В настоящее время известно 6 ИФРСБ, а также семейство гомологичных связывающих белков, которые обладают значительно меньшим сродством к ИФР-лигандам. ИФРСБ модулируют биологические эффекты ИФР по крайней мере следующими способами: они переносят ИФР по кровеносному руслу к тканям-мишеням (ИФРСБ-1, -2, -3 и -4), поддерживают резервный уровень ИФР в крови (это преимущественно функция ИФРСБ-3), потенцируют или ингибируют эффекты ИФР, а также опосредуют ИФР-независимые биологические эффекты [5].

ИФР-1 синтезируется гепатоцитами под влиянием гормона роста. Клетки стромы опухолей и собственно опухолевые клетки также синтезируют ИФР, которые ауто/паракринным путем опосредуют рост, метастазирование и антиапоптотический ответ злокачественных клеток [1–3]. ИФР-1 экспрессируется стромальными клетками как в доброкачественных, так и в злокачественных новообразованиях молочной железы, в то время как ИФР-2 обнаруживается в строме большинства аденокарцином молочной железы и в небольшом количестве – в злокачественном эпителии [10–11]. В результате активных исследований системы ИФР в последние 10 лет установлена прямая зависимость между высоким уровнем ИФР-1 в крови и риском развития злокачественных опухолей. У человека ИФР-1 играет существенную роль в развитии рака предстательной и молочной (РМЖ) желез, толстой кишки, яичников, легкого, шейки матки [2, 13–16].

Целью настоящего исследования были оценка содержания ИФР-1 и ИФР-2 в сыворотке крови больных РМЖ и практически здоровых женщин, а также анализ взаимосвязи изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 79 больных РМЖ и 16 практически здоровых женщин в возрасте от 27 по 76 лет. Распределение больных РМЖ с учетом

основных показателей распространенности процесса представлено в табл. 1. Средний возраст составил $54,0 \pm 1,3$ года. 30 больных РМЖ находились в репродуктивном периоде, большинство (49) – в менопаузе длительностью от 1 года до 25 лет. По гистологическому строению большинство опухолей относилось к инфильтративно-протоковому раку (56), остальные были представлены единичными наблюдениями (инфильтративно-дольковый – 6 случаев, смешанный – 7, тубулярный – 6 и слизистый тип – 4), в связи с чем данные о сывороточном уровне ИФР-1 и ИФР-2 с учетом гистологического строения РМЖ не приводятся.

Концентрацию ИФР-1 и ИФР-2 в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов для прямого иммуноферментного анализа «IGF-I ELISA», «IGF-II ELISA», (Mediagnost GmbH, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом универсальном ридере для микропланшет EL \times 800 (Bio-Tek Instruments Inc., США). Исследование рецепторов Her-2/neu, рецепторов эстрогенов и прогестерона в ткани РМЖ проводили стандартными иммуногистохимическими методами. Данные обрабатывали с помощью программы «Statistica 7.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Патогенез РМЖ связан с нарушениями функционирования сложной системы регулирования эффектов ИФР. В активации ИФР-сигнального пути принимают участие по крайней мере несколько механизмов:

- экспрессия стромальными клетками опухоли ИФР-2;
- мутации маннозо-6-фосфат/ИФР-2 рецептора, ведущие к снижению деградации ИФР-2;
- гиперэкспрессия ИФР-1Р клетками злокачественного эпителия молочной железы;
- комплексные нарушения экспрессии ИФР-связывающих белков, модулирующих сывороточные уровни ИФР [17].

Можно предположить, что в крови пациентов РМЖ должен обнаруживаться повышенный уровень ИФР, однако опубликованные по этому вопросу данные противоречивы. На первом этапе нашего исследования были определены уровни ИФР-1 и ИФР-2 в сыворотке крови у 16 практически здоровых женщин (контрольная группа) и 79 больных РМЖ до лечения (табл. 1). Содержание ИФР-1 в сыворотке крови в контрольной группе было достоверно выше, чем у пациенток основной группы. Уровень ИФР-2, напротив, был достоверно выше при РМЖ, чем в контроле. На основании этого можно предположить, что ИФР-2 также вносит существенный вклад в развитие суммарного ответа на ИФР клетками стромы и эпителия молочной железы.

Установлено, что высокий сывороточный уровень ИФР-1 является маркером повышенного риска РМЖ у женщин в постменопаузе, однако взаимосвязь сыво-

вороточных ИФР-1 и ИФР-2 с менопаузальным статусом в целом, РЭ-статусом и основными клинико-морфологическими характеристиками РМЖ пока установить не удалось [17].

Обнаружены достоверно более высокие уровни ИФР-1 в сыворотке крови у больных РМЖ репродуктивного возраста, чем в постменопаузе (табл. 2), а содержание ИФР-2, напротив, было достоверно выше у пациенток в постменопаузе.

Не найдено связи между исходным уровнем ИФР-1 и ИФР-2 в сыворотке крови и показателями

системы TNM ($p=0,22$; табл. 3). Таким образом, содержание ИФР-1 в сыворотке крови больных РМЖ до лечения достоверно не отражало стадию заболевания. Многофакторный анализ показал, что достоверная связь уровней ИФР выявлена только со статусом репродуктивной функции.

Известно, что эстрогены и ИФР оказывают синергетические эффекты на пролиферацию РЭ⁺-клеток РМЖ. Функциональная активность ИФР-сигнального пути в РЭ⁻-клетках РМЖ активно исследуется в последние 3 года, однако ясности пока

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ ИФР-1 И ИФР-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РМЖ

Группа	Число больных	ИФР-1, нг/мл		ИФР-2, мкг/мл	
		М±m	Медиана (квартили)	М±m	Медиана (квартили)
1-я (контроль)	16	181,0±16,9	173,0 (132–246)	1,5±0,1	1,5 (1,3–1,8)
2-я (РМЖ)	79	100,0±3,8	93,8 (76,1–120)	2,5±0,1	2,5 (2,0–2,8)
p		<0,0001		<0,0001	

Таблица 2

СОДЕРЖАНИЕ ИФР-1 И ИФР-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РМЖ С УЧЕТОМ СОСТОЯНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ПАЦИЕНТОК

Репродуктивная функция	Число больных	ИФР-1, нг/мл		ИФР-2, мкг/мл	
		М±m	Медиана (квартили)	М±m	Медиана (квартили)
Сохранена	30	116,0±6,5	111,0 (88,9–136)	2,3±0,09	2,4 (1,8–2,6)
Менопауза	49	91,1±4,2	88,0 (69,9–107)	2,6±0,1	2,5 (2,0–3,1)
p		0,0014		0,049	

Таблица 3

ИСХОДНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИФР-1 И ИФР-2 С УЧЕТОМ КРИТЕРИЕВ TNM

Критерий	Число больных	ИФР-1, нг/мл		ИФР-2, мкг/мл	
		М±m	Медиана (квартили)	М±m	Медиана (квартили)
Размер опухоли					
T1	37	97,2±5,6	95,2 (69,6–111)	2,4±0,1	2,5 (2,0–2,7)
T2	36	103,0±5,6	94,8 (79,4–127)	2,5±0,1	2,5 (2,1–2,9)
T3	4	102,0±18,5	92,3 (79,6–124)		
Tis	2	75,7 и 110*			
Регионарные метастазы					
N0	40	95,7±5,2	92,8 (69,8–111)	2,48±0,1	2,5 (2,0–2,9)
N1	31	108,0±6,2	99,4 (81,4–136)	2,5±0,1	2,5 (2,1–2,8)
N2	3	67,2±7,4	68,0 (54–79,7)	2,5±0,06	–
N3	5	106,0±9,9	107,0 (93,7–127)	2,2±0,2	2,5 (1,8–2,5)
Отдаленные метастазы					
M0	42	98,5±5,4	94,1 (69,9–118)	2,5±0,1	2,5 (2,0–2,9)
M1	37	100,0±8,9	88,0 (79,4–106)	2,6±0,2	2,5 (2,3–2,9)

Примечание. Во всех случаях $p>0,22$.

СОДЕРЖАНИЕ ИФР-1 И ИФР-2 И РЕЦЕПТОРНЫЙ СТАТУС РМЖ

Рецепторный статус РМЖ	Число больных	ИФР-1, нг/мл		ИФР-2, мкг/мл	
		М±m	Медиана (квартили)	М±m	Медиана (квартили)
РЭ ⁺ (1)	44	98,8±5,7	93,3 (69–121)	2,7±0,1	2,6 (2,2–3,2)
РЭ ⁻ (2)	35	100,6±7,6	96,4 (76,1–118)	2,3±0,1	2,3 (2,0–2,5)
РП ⁺ (3)	39	106±5,9	102,0 (76–132)	2,6±0,1	2,5 (2,1–2,9)
РП ⁻ (4)	40	91,2±6,1	86,2 (72,1–118)	2,4±0,1	2,5 (2,0–2,9)
Her-2/neu ⁺ (5)	17	73,9±4,0	76,1 (63,3–80)	2,3±0,08	2,4 (2,1–2,5)
Her-2/neu ⁻ (6)	62	114,4±7,8	116,0 (76–157)	2,5±0,2	2,6 (2,1–2,9)

Примечание: $p_{1-2} < 0,01$; $p_{3-4} < 0,05$; $p_{5-6} < 0,04$.

нет [17]. В исследованиях на трипленегативных линиях клеток РМЖ (с фенотипом РЭ⁻РП⁻Her-2/neu⁻), характеризующихся резистентностью к антиэстрогенам и блокаторам тирозинкиназной активности рецептора эпидермального фактора роста Her-2/neu [17], было показано, что эти клеточные линии тем не менее экспрессируют рецепторы ИФР-1 на уровне, сопоставимом с экспрессией в эстроген- и ИФР-чувствительных клеточных линиях. Несмотря на противоречивость полученных результатов, продолжаются активные клинические исследования антагонистов ИФР-гуманизированных антител к ИФР-Р1 и ингибиторов тирозинкиназы при РМЖ [17].

Полученные нами данные о сывороточных уровнях ИФР-1 и ИФР-2 с учетом рецепторного статуса РМЖ (табл. 4) подтверждают гипотезу об участии ИФР-сигнального пути в регуляции функционирования рецепторнегативных РМЖ. Нами обнару-

жены достоверные отличия в группах с различным статусом Her-2/neu: достоверно больше ИФР-1 содержалось у пациенток с Her-2/neu-негативными опухолями, чем с Her-2/neu-позитивными ($p < 0,01$) и в РП-позитивных опухолях (по сравнению с РП-негативными); достоверные отличия выявлены также между уровнем ИФР-2 в РЭ⁺- и РЭ⁻-опухолях.

ВЫВОДЫ

1. Не выявлено связи исходного содержания ИФР-1 и ИФР-2 в сыворотке крови больных РМЖ с показателями системы ТНМ.

2. Многофакторный анализ показал, что достоверная связь исходного содержания сывороточного ИФР выявлена только с репродуктивным статусом больных РМЖ.

3. Обнаружены достоверные отличия в уровнях ИФР-1 и ИФР-2 в зависимости от рецепторного РЭ, РП, Her-2/neu статуса РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Современные представления о механизмах передачи сигналов факторов роста как основа эффективной молекулярно-направленной противоопухолевой терапии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2007; 1: 4–9. (Gershtein E.S., Kushlinskii N.E. Modern concepts of transmitting mechanisms of growth factors signals as a base for effective molecular targeting antitumour therapy. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii. 2007; 1: 4–9 (in Russian))
2. Frasca F., Pandini G., Sciacca L. et al. The role of insulin receptors and IGF-1 receptors in cancer and other diseases. Arch. Physiol. Biochem. 2008; 114 (1): 23–37.
3. Grimberg A. Mechanisms by which IGF-1 may promote cancer. Cancer Biol. Ther. 2003; 2 (6): 630–35.
4. Hartog H., Wesseling J., Boezen H. et al. The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: old focus, new future. Eur. J. Cancer. 2007; 43 (13): 1895–1904.
5. Laviola L., Natalicchio A., Giorgino F. The IGF-1 signaling pathway. Curr. Pharm. Des. 2007; 13 (7): 663–9.
6. Pavelić J., Matijević T., Knezević J. Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. Indian J. Med. Res. 2007; 125 (4): 511–22.
7. Pollak M., Schernhammer E., Hankinson S. Insulin-like growth factors and neoplasia. Nat. Rev. Cancer. 2004; 4: 505–18.
8. Yakar S., Leroith D., Brodt P. The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. Cytokine Growth Factor Rev. 2005; 16: 407–20.
9. Chen C., Lewis S., Voigt L. et al. Prostate carcinoma incidence in relation to pre-diagnostic circulating levels of insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein-3, and insulin. Cancer. 2004; 103 (1): 76–84.
10. Schernhammer E., Holly J., Hunter D. et al. Insulin-like growth factor-I, its binding proteins (IGFBP-1 and IGFBP-3), and growth hormone and breast cancer risk in The Nurses Health Study II. Endocr. Relat. Cancer. 2006; 13 (2): 583–92.
11. Eppler E., Zapf J., Bailor N. et al. IGF-1 in human breast cancer: low differentiation stage is associated with decreased IGF-1 content. Eur. J. Endocrinol. 2002; 146: 813–21.
12. Belfiore A., Frasca F. IGF and insulin receptor signaling in breast cancer. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 2008; 13 (4): 381–406.
13. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key T.J., Appleby P.N., Reeves G.K., Roddam A.W. et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. Lancet Oncol. 2010; 11 (6): 530–42.
14. Moschos S., Mantzoros C. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. Oncology. 2002; 64: 317–32.
15. Platz E., Pollak M., Leitzmann M. et al. Plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and subsequent risk of prostate cancer in the PSA era. Cancer Causes Control. 2005; 16 (3): 255–62.
16. Samani A., Yakar S., LeRoith D. et al. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. Endocr. Rev. 2007; 28 (1): 20–47.
17. Davison Z., de Blacquièrre G., Westley B., May F. Insulin-like growth factor-dependent proliferation and survival of triple-negative breast cancer cells: implications for therapy. Neoplasia. 2011; 13 (6): 504–15.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ α И ИНТЕРЛЕЙКИНА 6 В СЛЮННОМ СЕКРЕТЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПРОТОВОКОВЫМ СИАЛАДЕНИТОМ

А.С. Алейников¹, аспирант, И.В. Гайдук¹, кандидат медицинских наук, доцент,
Н.Е. Кушлинский^{1,2}, член-корреспондент РАМН, профессор

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова
МЗ РФ, Российская Федерация, 127473, Москва, ул. Десятская, д. 20, стр. 1;

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: biochimia@mtu-net.ru

Введение. Хронический сиаладенит — воспалительное заболевание слюнной железы с неясной этиологией и до конца не изученным патогенезом. В патогенетических механизмах сиаладенитов особое внимание исследователи уделяют изучению секреции различных молекулярно-биологических маркеров, которые сопровождают хронический воспалительный процесс, в частности, цитокинам.

Цель исследования: сравнительное изучение уровня TNF α и ИЛ6 в слюнном секрете околоушной слюнной железы больных хроническим протоковым сиаладенитом с учетом основных клинико-лабораторных показателей.

Материал и методы. Провели лечение 18 пациентов с обострением хронического сиаладенита. Острые воспалительные явления купировали при проведении стандартной комплексной терапии, после стихания обострения брали слюнный секрет. Иммуноферментными методами исследовано содержание TNF α и ИЛ6 в слюнном секрете околоушной железы больных хроническим протоковым сиаладенитом.

Результаты. Обнаружено достоверное сочетанное увеличение уровней TNF α и ИЛ6 в слюнном секрете у больных с жалобами со стороны слюнных желез по сравнению с пациентами, у которых жалобы отсутствовали. Уровень ИЛ6 достоверно взаимосвязан с клиническим характером воспалительного процесса.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют в высокой информативности показателей концентрации ИЛ6 в слюнном секрете больных хроническим протоковым сиаладенитом, что позволяет рекомендовать определение этого цитокина в практической стоматологии для динамического наблюдения за этими пациентами.

Ключевые слова: слюнный секрет, протоковый сиаладенит, TNF α , ИЛ6

THE CONTENT OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES OF TNF α AND IL6 IN PAROTID SALIVARY FLUID IN DUCTAL CHRONIC SIALADENITIS PATIENTS

A.S. Aleinikov¹, I.V. Gaiduk¹, N.E. Kushlinskiy^{1,2}

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Russian Federation, 127473, Moscow, Delegatskaya street, 20/1; ²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24

Introduction. Chronic sialadenitis is an inflammatory salivary gland disease with unclear etiology and not fully understood pathogenesis. A special attention of researchers is paid to the study of various molecular markers secreted in the course of chronic inflammatory process, especially to cytokines.

Aim of the study. Comparative evaluation of TNF α and IL6 levels in salivary fluid from parotid gland of patients with chronic ductal sialadenitis with relation to main clinical and laboratory factors.

Methods. 18 patients with exacerbation of chronic sialadenitis underwent standard anti-inflammatory complex therapy, and after abatement of acute inflammation salivary fluid was collected. TNF α and IL6 content in parotid gland salivary fluid was measured by ELISA techniques.

Results. Highly significant concordant increase of TNF α and IL6 levels was found in saliva of patients complaining of salivary glands' problems as compared to those without such complaints. IL6 level was significantly positively associated with disease stage and clinical character of inflammatory process.

Conclusions. The data obtained testify high informative value of IL6 concentration level in parotid salivary fluid of patients with chronic ductal sialadenitis, and this allows to recommend this cytokine's measurement in practical dentistry for dynamic follow-up of such patients.

Key words: saliva, ductal sialadenitis, TNF α , IL6

Хронический сиаладенит — воспалительное заболевание слюнной железы с неясной этиологией и не до конца изученным патогенезом [1]. Хронический

сиаладенит составляет 2,3–10,1% всей патологии челюстно-лицевой области. В настоящее время выделяют 3 формы хронического сиаладенита по преиму-

шественному поражению различных анатомических отделов слюнной железы: интерстициальный, паренхиматозный и протоковый [2].

Хроническим поражением системы выводных протоков околоушной слюнной железы (протоковый сиаладенит, сиалодохит) обычно болеют люди пожилого возраста (77%), несколько чаще женщины (57%). Полагают, что снижение иммунитета создает предпосылки для возникновения хронического сиалодохита. Немаловажную роль играют также врожденные изменения протоковой ткани слюнной железы. Хронический сиаладенит часто бывает двусторонним, однако клинические признаки заболевания могут длительное время выявляться только в одной из желез.

В патогенетических механизмах сиаладенита особое внимание исследователи уделяют изучению секреции различных молекулярно-биологических маркеров, которые сопровождают хронический воспалительный процесс, в частности, цитокинам – группе белков и пептидов, которые синтезируются и секретируются клетками иммунной системы и другими типами клеток. Важную роль играют такие цитокины, как фактор некроза опухолей- α (ФНО α) [4–6], интерлейкин-1 β (ИЛ1 β) – медиатор острого и хронического воспаления [7] и ИЛ8, основной функцией которого является обеспечение хемотаксиса в зону воспаления нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, Т-лимфоцитов. Известно, что ИЛ8 обладает выраженными провоспалительными свойствами, вызывает экспрессию молекул межклеточной адгезии и усиливает прилипание нейтрофилов. ИЛ8 продуцируют макрофаги, лимфоциты, эпителиальные клетки и фибробласты [8].

Показано, что уровни экспрессии ИЛ1 β , ИЛ8, TGF β и GM-CSF при хроническом сиаладените достоверно выше, чем в неизменной ткани слюнной железы [11]. Секреция цитокинов при воспалении происходит последовательно: сначала интенсивно выделяется TNF α , затем ИЛ1, позже ИЛ6 [12]. Повышение уровней TNF α и ИЛ6 – важных медиаторов острой фазы воспаления (как реакции организма на повреждение ткани) отмечается при многих травматических, хирургических, аутоиммунных заболеваниях.

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение уровней TNF α и ИЛ6 в слюнном секрете околоушной слюнной железы больных хроническим протоковым сиаладенитом с учетом основных клинико-лабораторных показателей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 18 пациентов в возрасте от 26 до 67 лет (женщин – 14, мужчин – 4) с хроническим сиалодохитом (основная группа) и 7 практически здоровых людей соответствующего возраста (контроль).

У всех пациентов исследуемой группы в анамнезе выявлено обострение хронического воспалительного

процесса в виде одностороннего болезненного увеличения околоушной слюнной железы и выделение гноя из выводного протока. Острые воспалительные явления купировали с помощью стандартной комплексной терапии, которая включала: общую антибактериальную, противовоспалительную, десенсибилизирующую, иммунокорректирующую терапию, а также местное лечение (компресс с 30% димексидом, новокаиновые блокады по Вишневскому и внутрипротоковое введение стерильного физиологического раствора в объеме 0,1–0,2 мл).

После стихания воспалительных явлений первую пробу секрета из пораженной слюнной железы брали через 20 \pm 7 сут, вторую – через 90 \pm 7 сут.

Обследование слюнной железы проводили через 20 \pm 7 сут с использованием стандартных общих, частных и специальных методов: УЗИ, сиалографии, сиалометрии при помощи капсулы Лешли–Ющенко–Красногорского, цитологического исследования секрета и определения концентрации ФНО α и ИЛ6 в слюнном секрете методом ELISA.

Слюнной секрет собирали в градуированную пробирку, которую затем помещали в контейнер со льдом и в течение 2 ч доставляли в лабораторию для биохимического и цитологического исследования.

В лаборатории слюнный секрет разливали на аликвоты по 1 мл, замораживали и хранили при -70 $^{\circ}$ C до исследования. Концентрацию ФНО α и ИЛ6 в слюнном секрете определяли в лаборатории клинической биохимии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН методом ELISA наборами реактивов фирм «Invitrogen» (США) и «R&D Systems» (США) соответственно. Оптическую плотность измеряли на ридере для микропланшет EL \times 800, Bio-Tek Instruments, США, при длине волны λ =450 нм. Концентрацию ФНО α и ИЛ6 в слюнном секрете выражали в пг/мл. В качестве центральной характеристики использовали медиану, в качестве меры разброса – квартили, для сравнения групп использовали непараметрические критерии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включены пациенты, у которых на сиалограмме выявляли расширение протоковой системы различной степени выраженности, что указывало на наличие хронического сиаладенита. Стадии процесса устанавливали на основании классификации И.Ф. Ромачевой и соавт.: в начальной стадии расширение главного выводного протока составило 0,24 \pm 0,07 см (n=6), в клинически выраженной стадии – 0,34 \pm 0,03 см (n=10), в поздней стадии – 0,55 \pm 0,09 см (n=2).

После стихания острых воспалительных явлений у всех пациентов и к 20 \pm 7 сут, и к 90-м суткам не выявлено визуального увеличения околоушной слюнной железы. Однако 13 (72%) пациентов за период наблюдения отмечали периодические припухания пораженной железы (2–3 эпизода) в основном во время приема пищи, что сопровождалось слабой

болезненностью в области железы. При осмотре у 4 пациентов железа пальпировалась, была слабоболезненной, мягкоэластической консистенции, у 1 пациента главный выводной проток пальпировался в виде тяжа в щечной области. 7 (38%) пациентов жаловались на периодическое появление солоноватого привкуса. У 9 (50%) пациентов из выводного протока околоушной слюнной железы при массировании выделялся мутный секрет или мутный с хлопьями или слизистыми включениями (у 4, т.е. 22,2% пациентов) к 20-м суткам и у 5, т.е. 27,7% больных – к 90-м суткам).

При проведении сиалометрии при помощи капсулы Лешли–Ющенко–Красногорского в течение 5 мин при периодической стимуляции 3% раствором аскорбиновой кислоты: к 20-м суткам у 4 (22,0%) пациентов определено нормальное количество секрета (медиана 3,0 мл), у 7 (38,9%) – от 0,7 до 2,0 мл (гипосаливация II степени), у 3 (16,6%) – менее 0,7 мл (гипосаливация III степени). К 90-м суткам нормальные показатели были у 9 (50%) обследованных, гипосаливация I степени (2,0–2,5 мл) – у 4 (22,2%) и II степени – у 5 (27,7%) пациентов. Таким образом, у большинства пациентов ($n=9$, что составило 50%) через 3 мес сохранялась гипосаливация различной степени выраженности.

ФНО α . Частота обнаружения измеримых концентраций ФНО α в протоковом слюнном секрете из околоушной слюнной железы практически здоровых людей и больных хроническим протоковым сиаладенидом достоверно не различалась (соответственно 29 и 30%; табл. 1).

Не обнаружено корреляционной связи между концентрацией ФНО α в слюнном секрете и возрастом пациентов. Выявлена тенденция к обратной корреляции показателей сиалометрии с концентрацией ФНО α в слюнном секрете больных ($r=-0,34$; $p=0,2$). Значит, низким показателям сиалометрии, характерным для больных с наиболее неблагоприятными факторами, чаще соответствовал высокий уровень ФНО α в слюнном секрете.

При анализе взаимосвязи уровня ФНО α в слюнном секрете больных хроническим протоковым сиаладенидом с основными клинико-лабораторными показателями (табл. 2) выявлены следующие закономерности и тенденции: достоверное увеличение частоты обнаружения высокого уровня ФНО α (>5 пг/мл) при наличии такого фактора, как солоноватый при-

вкус (44,4%), и недостоверное увеличение частоты обнаружения высоких показателей при наличии болей (25%) и включений в слюнном секрете (25%), а также в подострой (28%) и поздней (25%) стадиях заболевания и у пациентов в возрасте 50 лет и старше (25–40%).

У 12 больных хроническим протоковым сиаладенидом сравнили уровень ФНО α в слюнном секрете в период подострой стадии и в состоянии ремиссии. Оказалось, что данный показатель в состоянии ремиссии был достоверно ниже, чем в подострой стадии ($p=0,028$; парный критерий Вилкоксона; табл. 3).

У 6 из 11 пациентов с нулевым уровнем ФНО α в состоянии ремиссии данный цитокин не был обнаружен и в подострой стадии, у 3 пациентов выявлено повышение ФНО α до уровня, не превышающего 5 пг/мл, и у 2 – 5 пг/мл и более. У 1 больного с исходным уровнем ФНО α при ремиссии <5 пг/мл он превысил значение в подострой стадии. Таким образом, у 50% больных хроническим протоковым сиаладенидом произошло повышение концентрации ФНО α в слюнном секрете при обострении.

ИЛ6 обнаружен во всех изученных пробах. Сопоставление уровней ИЛ6 в контроле и у больных по тесту Манна–Уитни выявило достоверные различия ($p=0,025$; табл. 4).

Для дальнейшего анализа показатели концентрации ИЛ6 в слюнном секрете объединены в 4 группы с учетом интервала: 1) $<1,3$ пг/мл; 2) от 1,3 до 3,5 пг/мл; 3) от 3,6 до 50 пг/мл и 4) >50 пг/мл. Частота выявления уровня ИЛ6 $<1,3$ пг/мл составила 57% (у 4 из 7 обследованных) в контроле и 24% (у 8 из 33) в основной группе; в диапазоне от 1,3 до 3,5 пг/мл – 43% (у 3 из 7) в контроле и 27% (у 9 из 33 пациентов) – в основной группе. Концентрация от 3,5 до 50 пг/мл обнаружена у 27% (у 9 из 33 больных), 50 пг/мл и более – у 21% (7 из 33) больных; в группе контроля такие уровни ИЛ6 не обнаружены. Превышение порогового уровня ИЛ6 выявлено у 16 из 33 (48,5%) больных ($p=0,019$). Таким образом, почти у половины больных хроническим протоковым сиаладенидом уровни ИЛ6 в слюнном секрете превышают показатели в контрольной группы, причем у каждого 5-го пациента – более чем в 10 раз.

Установлено, что у пациентов концентрация ИЛ6 в слюнном секрете связана прямой корреляционной зависимостью с возрастом ($r=0,36$; $p=0,04$),

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ ФНО α В СЛЮНЕ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПРОТОВОКОВЫМ СИАЛАДЕНИДОМ

Группа	Число образцов слюны	Наличие ФНО α	Уровень TNF α , пг/мл			P
			медиана	квартили	пределы колебаний	
Контрольная	7	2 (29%)	4,7	4,65–4,7	4,65–4,72	0,75
Основная	33	10 (30%)	3,3	2,3–14,9	0,54–346	

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЕЙ ФНО α В СЛЮННОМ СЕКРЕТЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПРОТОКОВЫМ СИАЛАДЕНИТОМ С УЧЕТОМ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ФАКТОРОВ

Признак	Градация	Количество проб	ФНО α не обнаружен	Уровень ФНО α	
				<5 пг/мл	\geq 5 пг/мл
Пол (p=0,3)	Мужской	7	4 (57,1)	1 (14,3)	2 (28,6)
	Женский	26	19 (73,1)	5 (19,2)	2 (7,7)
Возраст, годы (p=0,07)	До 40	6	6 (100)	–	–
	40–49	18	13 (72,2)	4 (22,2)	1 (5,6)
	50–59	5	3 (60,0)	–	2 (40,0)
	60 и более	4	1 (25,0)	2 (50,0)	1 (25,0)
Стадия (p=0,59)	Начальная	11	9 (81,8)	2 (18,2)	–
	Выраженная	18	12 (66,7)	3 (16,7)	3 (16,7)
	Поздняя	4	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)
Состояние (p=0,03)	Ремиссия	16	14 (87,5)	2 (12,5)	–
	Подострая стадия	17	9 (52,9)	4 (28,6)	4 (28,6)
Прозрачность (p=0,15)	Полная	9	8 (88,9)	1 (11,1)	–
	Мутность	8	7 (87,5)	1 (12,5)	–
	Наличие включения	16	8 (50,0)	4 (25,0)	4 (25,0)
Припухлость (p=0,57)	Нет	6	5 (83,3)	1 (16,7)	–
	Есть	27	18 (66,7)	5 (18,5)	4 (14,8)
Ретенционная боль (p=0,079)	Нет	17	14 (82,4)	3 (17,7)	–
	Есть	16	9 (56,3)	3 (18,8)	4 (25,0)
Солоноватый привкус (p=0,0023)	Нет	21	17 (81,0)	4 (19)	–
	Есть	9	4 (44,4)	1 (11,1)	4 (44,4)
Сиалометрия, мл (p=0,3)	<1,3	13	10 (76,9)	1 (7,7)	2 (15,4)
	\leq 2,5	13	10 (76,9)	2 (15,4)	1 (7,7)
	>2,5	7	3 (42,9)	3 (42,9)	1 (14,3)

Примечание. В скобках – %.

при этом частота превышения порогового уровня ИЛ6 у больных в возрасте до 50 лет составила 37,5%, старше 50 лет – 77,7%, т.е. повышение уровня ИЛ6 наблюдали в 2 раза чаще (p=0,039). Частота превышения порогового уровня ИЛ6 была достоверно повышена при наличии следующих неблагоприятных факторов: непрозрачности слюны (многократно), наличии болей (в 3,2 раза), в подострой стадии (в 3,2

раза), наличии солоноватого привкуса (в 2,7 раза) и припухлости (59,3%), в выраженной и поздней стадиях (в 3,7 раза), показателях сиалометрии <1,3 мл (в 2,7 раза) (табл. 5).

Таким образом, на начальном этапе хронического протокового сиаладенита экспрессия ИЛ6 может быть незначительной и усиливается по мере длительности заболевания и его клинической вы-

СОДЕРЖАНИЕ ФНО α В СЛЮННОМ СЕКРЕТЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПРОТОКОВЫМ СИАЛАДЕНИТОМ В СОСТОЯНИИ РЕМИССИИ И В ПОДОСТРОЙ СТАДИИ

Состояние	Число больных	Уровень ФНО α , пг/мл		p
		медиана (квартили)	пределы колебаний	
Ремиссия	12	0 (0–0)	0–0,54	0,028
Подострая стадия	12	1,2 (0–6,4)	0–36,8	

Таблица 4

СОДЕРЖАНИЕ ИЛ6 В СЛЮННОМ СЕКРЕТЕ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПРОТОКОВЫМ СИАЛАДЕНИТОМ

Группа	Число образцов слюны	Уровень ИЛ6>0 (пг/мл)			P
		медиана	квартили	пределы колебаний	
Контрольная	7	0,72	0,55–1,6	0,38–3,45	0,025
Основная	33	3,5	1,4–11,5	0,26–683	

раженности. Эти данные позволяют использовать измерение ИЛ6 в слюнном секрете пациентов с хроническим протоковым сиаладенитом для контроля лечения заболевания и оценки состояния больного. Следует отметить, что если в состоянии ремиссии в 8 из 16 (50%) наблюдений уровень ИЛ6 не превышал 1,3 пг/мл, то в подострой стадии ни в одном из 17 наблюдений его концентрация <1,3 пг/мл не выявлена ($p=0,004$). Эти результаты показывают, что для контроля эффективности лечения больных хроническим протоковым сиаладенитом

возможно использование и более низкого порогового уровня ИЛ6 в слюнном секрете, равного 1,3 пг/мл.

В группе больных хроническим протоковым сиаладенитом выявлена также достоверная прямая корреляционная связь между уровнем ИЛ6 и ФНО α в слюнном секрете ($r=0,83$; $p=0,01$). Эта зависимость показывает, что в немногочисленной группе из 10 больных с выявленным ФНО α уровень этого цитокина в слюнном секрете был пропорционален уровню ИЛ6.

Таблица 5

СОДЕРЖАНИЕ ИЛ6 В СЛЮННОМ СЕКРЕТЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПРОТОКОВЫМ СИАЛАДЕНИТОМ С УЧЕТОМ ОСНОВНЫХ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Признак	Градация	Количество проб	Уровень ИЛ6, пг/мл		Число больных с уровнем ИЛ6 \geq 3,5 пг/мл, абс. (%)
			медиана (квартили)	p	
Пол ($p=0,3$)	Мужской	7	11,5 (1,2–280)	0,3	4 (57,1)
	Женский	26	2,5 (1,4–7,2)		12 (46,2)
Возраст, годы ($p=0,07$)	До 50	24		0,07	9 (37,5)
	50 и более	9			7 (77,7)
Стадия ($p=0,04$)	Начальная	11	1,4 (1,2–3,5)	0,04	2 (18,2)
	Выраженная	18	5,8 (1,5–95,1)		12 (66,7)
	Поздняя	4	54,8 (1,5–194)		2 (50,0)
Состояние ($p=0,0015$)	Ремиссия	19	1,4 (1,2–4,4)	0,003	5 (26,3)
	Подострая стадия	14	7,4 (3,8–280)		11 (78,6)
Прозрачность ($p=0,00005$)	Полная	9	1,3 (0,3–1,5)	0,0001	–
	Мутность	8	1,4 (1,2–3,9)		2 (25,0)
	Наличие включений	16	9,5 (5,8–199)		14 (87,5)
Припухлость ($p=0,009$)	Нет	6	1,4 (1,2–1,5)	0,023	–
	Есть	27	5,5 (1,4–95,1)		16 (59,3)
Ретенционная боль ($p=0,003$)	Нет	17	1,4 (1,2–3,5)	0,008	4 (23,5)
	Есть	16	17,8 (2,8–199)		12 (75,0)
Солоноватый привкус ($p=0,0045$)	Нет	21	1,5 (1,2–6,3)	0,0026	8 (33,3)
	Есть	9	108 (6,1–316)		8 (88,9)
Сиалометрия, мл ($p=0,04$)	<1,3	13	7,6 (3,8–108)	0,03	10 (76,9)
	1,3–2,5	13	1,5 (1,2–4,4)		4 (30,8)
	\geq 2,5	7	1,4 (1,2–5,5)		2 (28,6)

Примечание. В скобках – %.

СОДЕРЖАНИЕ ИЛ6 В СЛЮННОМ СЕКРЕТЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПРОТОКОВЫМ СИАЛАДЕНИТОМ В СОСТОЯНИИ РЕМИССИИ И В ПОДОСТРОЙ СТАДИИ

Состояние	Число больных	Уровень ИЛ6, пг/мл		p (парный тест Вилкоксона)
		медиана (квартили)	пределы колебаний	
Ремиссия	12	1,5 (1,2–43,1)	0,3–119	0,0022
Подострая стадия	12	7,1 (2,8–188)	1,4–441	

Обнаружено достоверное увеличение концентрации ИЛ6 в слюнном секрете 12 больных хроническим протоковым сиаладенитом в подострой стадии по сравнению с показателями в состоянии ремиссии ($p=0,0022$; табл. 6), при этом повышение уровня ИЛ6 обнаружено у всех 12 пациентов. Этот факт свидетельствует о том, что измерение концентрации ИЛ6 в протоковом слюнном секрете больных хроническим протоковым сиаладенитом надежно отражает клинические изменения в состоянии больного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных выявлено, что ФНО α обнаружен в слюнном секрете примерно у 30% больных хроническим протоковым сиаладенитом и здоровых людей, а его уровень достоверно не различался у пациентов основной группы и в контроле. Частота выявления высоких (>5 пг/мл) уровней ФНО α в образцах слюнного секрета у больных

хроническим протоковым сиаладенитом был достоверно выше в подострой стадии, чем в состоянии ремиссии, а также при положительном факторе солончатый привкус. Повышение показателя ФНО α в подострой стадии продемонстрировано у половины больных с наличием солончатого привкуса. Кроме того, содержание ИЛ6 в слюнном секрете больных хроническим протоковым сиаладенитом было достоверно выше, чем у здоровых людей, при этом уровень ИЛ6 достоверно взаимосвязан со стадией заболевания, клиническим характером воспалительного процесса (состояние ремиссии или подострая стадия), а также жалобами больных на солончатый привкус. Полученные данные свидетельствуют о высокой информативности показателей концентрации ИЛ6 в слюнном секрете больных хроническим протоковым сиаладенитом, что позволяет рекомендовать определение этого цитокина в практической стоматологии для динамического наблюдения за этими пациентами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Афанасьев В.В. Слюнные железы болезни и травмы. ГЭОТАР-Медиа. 2012; 103–63. (Afanasyev V.V. Salivary glands diseases and traumas. GEOTAR-Media. 2012; pp. 103–63 (in Russian))
2. Ромачева И.Ф., Юдин Л.А., Морозов А.Н. Заболевания и повреждения слюнных желез. Медицина. 1987; 240 с. (Romacheva I.F., Yudin L.A., Morozov A.N. Diseases and lesions of salivary glands. Meditsina. 1987 (in Russian))
3. Панин А.М., Гайдук И.В. Хирургическая стоматология – воспалительные и дистрофические заболевания слюнных желез. М.: Литература. 2011; 126–43. (Panin A.M., Gaiduk I.V. Surgical stomatology – inflammatory and dystrophic salivary gland diseases. M. Literatura. 2011; pp. 126–43 (in Russian))
4. Wang Y., Shnyra A., Africa C. et al. Activation of the extrinsic apoptotic pathway by TNF-alpha in human salivary gland (HSG) cells in vitro, suggests a role for the TNF receptor (TNF-R) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in Sjogren's syndrome-associated autoimmune sialadenitis. Arch. Oral. Biol. 2009; 54 (11): 986–96.
5. Matsumura R., Umemiya K., Kagami M. et al. Expression of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) on infiltrating cells and of TRAIL receptors on salivary glands in patients with Sjogren's syndrome. Clin. Exp. Rheumatol. 2002; 20 (6): 791–8.
6. Yamakawa M., Weinstein R., Tsuji T. et al. Age-related alterations in IL-1beta, TNF-alpha, and IL-6 concentrations in parotid acinar cells from BALB/c and non-obese diabetic mice. J. Histochem. Cytochem. 2000; 48 (8): 1033–42.
7. Tsuneyama K., Saito K., Ruebner B. et al. Immunological similarities between primary sclerosing cholangitis and chronic sclerosing sialadenitis: report of the overlapping of these two autoimmune diseases. Dig. Dis. Sci. 2000; 45: 366–72.
8. Baggiolini M., Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Lett. 1992; 307 (1): 97–101.
9. Tanaka M., Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2003; 149: 39–52.
10. Lee H., Cho J., Kang H. et al. Expression of oncostatin M in chronic obstructive sialadenitis of the submandibular gland. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 2008; 117 (5): 347–52.
11. Cauli A., Yanni G., Pitzalis C. et al. Cytokine and adhesion molecule expression in the minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and chronic sialoadenitis. Ann. Rheum. Dis. 1995; 54 (3): 209–15.
12. David T. Wong. Salivary Diagnostics. Wiley-Blackwell. 2008; 167–74.

АССОЦИИРОВАННЫЕ С ОПУХОЛЬЮ МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМИ САРКОМАМИ КОСТЕЙ

Н.Е. Кушлинский, член-корреспондент РАМН, профессор,
И.В. Бабкина, доктор медицинских наук, профессор, **И.Н. Кузнецов**, кандидат биологических наук,
Е.А. Короткова, кандидат биологических наук, **Е.А. Тен**, **И.В. Булычева**, доктор медицинских наук,
Ю.Н. Соловьев, академик РАМН, профессор, **М.Д. Алиев**, академик РАН и РАМН, профессор

*Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24*

E-mail: docbabkina@rambler.ru

Введение. Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство внеклеточных, цинксодержащих протеиназ. К настоящему времени известно 25 ММП. Повышение активности ММП наблюдается при некоторых физиологических процессах – во время фолликулярной фазы менструального цикла и при имплантации оплодотворенной яйцеклетки. Известно участие ММП в инвазивном росте и метастазировании опухолей.

Цель. Изучение содержания металлопротеиназ (ММП-2, ММП-7, ММП-9) и их ингибитора ТИМП-1 в сыворотке крови больных первичными злокачественными новообразованиями костей и практически здоровых людей соответствующего возраста для выявления возможной взаимосвязи с гистологическим строением опухоли.

Материал и методы. Обследовали 54 больных с опухолями костей (29 мужчин и 25 женщин) в возрасте от 14 до 59 лет и 26 практически здоровых людей (14 мужчин и 12 женщин) соответствующего возраста. У всех больных диагноз установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли. Типичная остеосаркома диагностирована у 21 (39%) пациента, саркома Юинга – у 11 (20%), гигантоклеточная опухоль кости (ГКО) – у 9 (16%), первичная хондросаркома – у 6 (11%), периостальная остеосаркома – у 4 (8%), злокачественная фиброзная гистиоцитома кости (ЗФГ) – у 3 (6%).

Результаты. Достоверных различий в содержании ММП-2 и ММП-7 в сыворотке крови у практически здоровых людей и больных с опухолями костей, а также при сравнении значений с учетом гистологического строения опухоли не выявлено. При злокачественных опухолях костей содержание ММП-9 в сыворотке крови достоверно ниже, чем у практически здоровых людей. Уровни ТИМП-1 при типичной остеосаркоме и особенно при периостальной остеосаркоме, характеризующейся агрессивным течением, были достоверно выше, чем у практически здоровых людей, что, возможно, связано с участием ТИМП-1 в механизмах инвазии и метастазирования опухоли. Выявлена прямая корреляция между содержанием ТИМП-1 и ММП-9 в сыворотке крови при типичной остеосаркоме, периостальной остеосаркоме и саркоме Юинга.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что экспрессия ТИМП-1 и ММП-9 может иметь связь с патогенетическими механизмами, связанными с ростом типичной и периостальной остеосарком, а также саркомы Юинга, и могут служить предметом дальнейших исследований.

Ключевые слова: металлопротеиназы, остеосаркома, хондросаркома, саркома Юинга

TUMOR-ASSOCIATED METALLOPROTEINASES IN SERUM OF PRIMARY BONE SARCOMA PATIENTS

*N.E. Kushlinskii, I.V. Babkina, I.N. Kuznetsov, E.A. Korotkova, E.A. Ten, I.V. Bulycheva, Yu.N. Soloviev, M.D. Aliev
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the RAMS, Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24*

Introduction. Matrix metalloproteinase (MMP) – a family of extracellular zinc-containing proteases. There are currently 25 known MMP. Increased activity of MMP observed in some physiological processes – during the follicular phase of the menstrual cycle and during implantation of a fertilized oocyte. Known part of MMP in invasive tumor growth and metastasis.

The aim of the study. Study of the content of metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, MMP-9) and their inhibitor TIMP-1 in serum of patients with primary malignant tumors of bone and healthy age-matched persons to identify the possible correlation with the histological structure of the tumor.

Methods. Examined 54 patients with bone tumors (29 males and 25 females) aged 14–59 years and 26 healthy subjects (14 men and 12 women) of the appropriate age. In all patients, diagnosis is confirmed by the data for the first time, and histology of the tumor. Typical osteosarcoma was diagnosed in 21 patients (39%), Ewing's sarcoma – in 11 (20%), giant cell tumor of bone – in 9 (16%), primary chondrosarcoma – in 6 (11%), periosteal osteosarcoma – in 4 (8%), bone malignant fibrous histiocytoma – 3 (6%).

Results. No significant differences in the content of MMP-2 and MMP-7 in the serum of healthy individuals and patients with bone tumors, as well as in the comparison of values with the histological structure of the tumor were found. The content MMP-9 in the serum of patients with malignant bone tumors was significantly lower than in healthy cases. TIMP-1 levels in a typical osteosarcoma and periosteal osteosarcoma especially when characterized by a very aggressive course were significantly higher than in healthy individuals, possibly because due to involvement of TIMP-1 in the mechanisms of tumor invasion and metastasis.

Conclusions. A direct correlation between TIMP-1 and MMP-9 in the serum in typical osteosarcoma, periosteal osteosarcoma and Ewing's sarcoma were found. The data suggest that the expression of TIMP-1 and MMP-9 may be linked to the pathogenic mechanisms associated with the growth of the typical and periosteal osteosarcoma and Ewing's sarcoma, and may be the subject of further research.

Key words: metalloproteinases, osteosarcoma, chondrosarcoma, Ewing's sarcoma

Саркомы костей – чрезвычайно злокачественные опухоли, склонные к быстрому гематогенному метастазированию. Одной из важных особенностей течения сарком костей является формирование микрометастазов в легких еще до возникновения клинических проявлений заболевания, и именно прогрессирующее основное заболевание становится причиной летального исхода [3]. Поэтому предупреждение развития заболевания на ранних стадиях – одна из актуальных проблем при лечении злокачественных опухолей костей. Известно, что в процессах инвазии опухолей участвуют протеолитические ферменты (протеазы или протеиназы). Выделяют следующие классы протеиназ: 1) металлопротеиназы (коллагеназы, желатиназы и стромелизины); 2) цистеиновые протеиназы (катепсины В и L); 3) аспартиловая протеиназа (катепсин D); 4) сериновые протеиназы (плазмин, активаторы плазминогена тканевого – t-PA и урокиназного – u-PA-типа). Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) в развитии метастазов опухолей костей не изучена.

Данная работа посвящена исследованию именно этих ферментов и их ингибитора 1-го типа, так как эффективность действия многих связанных с опухолью протеиназ в значительной мере зависит от активности их специфических ингибиторов в тканях или плазме. Известно 4 типа тканевых ингибиторов ММП.

ММП – это семейство внеклеточных, цинк-содержащих протеиназ [11]. Они синтезируются и секретируются рядом клеток в виде неактивных проферментов, активируются после отщепления пропептида и участвуют в резорбции и ремоделировании тканей, миграции, адгезии, дифференцировке и пролиферации клеток. К настоящему времени известно 25 ММП. Повышение активности металлопротеиназ наблюдается при некоторых физиологических процессах – во время фолликулярной фазы менструального цикла и при имплантации оплодотворенной яйцеклетки. Известно участие ММП в инвазивном росте и метастазировании опухолей [8, 10].

В метастазах ММП вырабатываются как самими опухолевыми клетками, так и фибробластами, активируемыми опухолевыми клетками. В норме выработка ММП и их тканевых ингибиторов (ТИМП) уравновешена. Во время инвазивного роста это равновесие периодически нарушается: отмечается повышение синтеза клетками опухоли протеиназ. Однако зафиксировать такие изменения, определяя уровень протеиназ и их ингибиторов в органе или в организме в целом, трудно. Результаты экспериментальных исследований послужили толчком к разработке препаратов-ингибиторов ММП как перспективных лекарственных средств с противоопухолевой активностью.

Роль ММП в патогенезе опухолей костей неизвестна. В ткани остеосаркомы обнаружены

ММП-2, -8, -13, -26 и ТИМП-1 [4]. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови при остеосаркоме коррелирует с содержанием ММП-9 в опухоли [2]. В экспериментальных исследованиях показано, что ингибирование синтеза жирных кислот в клетках остеосаркомы U2-OS приводит к снижению экспрессии ММП-2 и -9 и снижению миграции и инвазии клеток [6]. В процессах инвазии клеток остеосаркомы 143-B с высокой степенью метастазирования активное участие принимает ММП-1. Предполагают, что определение активности ММП-1 можно использовать в качестве маркера прогрессирования остеосаркомы [3].

На экспрессию ММП и их ингибиторов оказывают влияние факторы роста и другие биологически активные вещества. Показано, что блокирование рецептора инсулиноподобного фактора роста (ИФР)-1 снижает экспрессию ММП-2 и -9 в различных типах сарком костей, что приводит к снижению миграции клеток в клетках остеосаркомы MG-63 [5].

В настоящее время препараты-ингибиторы для лечения злокачественных опухолей костей не применяются, однако некоторые группы исследователей на основании экспериментальных данных рекомендуют включать в схемы химиотерапии вещества растительного происхождения, ингибирующие рост опухолей *in vitro*. Показано, что Gambogic acid (GA) снижает экспрессию ММП-9 и повышает экспрессию ТИМП-1 и тем самым снижает инвазию остеосаркомы Saos-2, MG-63 [12]. Экстракт лекарственного растения *Phyllanthus urinaria* снижает экспрессию ММП-2 и uPA в клетках остеосаркомы Saos-2 [7]. *Baicalein* (флавоноид, выделенный из корня шлемника байкальского), снижает экспрессию ММП-2 и ММП-9 в клетках остеосаркомы. [13]. Геништейн – вещество, выделенное из сои, снижает экспрессию ММП-2 линии клеток остеосаркомы мышей LM8 [9]. *Columbamine* (COL), – вещество, содержащееся в растении *Coptis chinensis*, ингибирует пролиферацию и неоангиогенез в культуре клеток остеосаркомы U2OS [1].

Целью настоящего исследования было изучение содержания металлопротеиназ ММП-2, -7, -9 и их ингибитора ТИМП-1 в сыворотке крови пациентов первичными злокачественными новообразованиями костей и практически здоровых людей соответствующего возраста для выявления возможной взаимосвязи с гистологическим строением опухоли.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовали 54 пациента с опухолями костей (29 мужчин и 25 женщин) возрасте 14–59 лет и 26 практически здоровых людей (14 мужчин и 12 женщин) того же возраста. У всех больных диагноз установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли. Типичная остеосаркома диагностирована у 21 (39%) пациента, саркома Юинга – у 11 (20%), гигантокле-

точная опухоль кости (ГКО) – у 9 (16%), первичная хондросаркома – у 6 (11%), периостальная остеосаркома – у 4 (8%), злокачественная фиброзная гистиоцитома кости (ЗФГ) – у 3(6%). ТИМП-1 определяли с помощью готовых наборов реактивов фирмы «Biosource» (США) при использовании автоматического ридера «Elx800» («Biotek Instruments Inc.», США).

У 48 пациентов опухоль локализовалась в трубчатых костях, у 6 – в плоских. Следует отметить, что остеосаркома выявлена только в трубчатых костях.

У 28 пациентов удалось определить размер первичной опухоли, в связи с чем они были разделены на 2 группы. В 1-ю группу включили 12 больных с опухолями, максимальный размер которых был ≤ 8 см, во 2-ю – 16 больных с опухолями размером > 8 см.

Определение ТИМП-1 проводили с помощью наборов реактивов фирмы «Biosource» (США), ММП-2, -7, -9 фирмы «R&D» (США) при использовании автоматического ридера «Elx800» («Biotek Instruments Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ММП-2, -7, -9 и ТИМП-1 обнаружили в сыворотке крови практически всех обследованных – здоровых и больных опухолями костей.

Уровень ТИМП-1 у практически здоровых людей находился в пределах 352–571 нг/мл (медиана – 436 нг/мл), при типичной остеосаркоме – 369–701 нг/мл (медиана – 484 нг/мл), периостальной остеосаркоме – 571–637 нг/мл (медиана – 609 нг/мл) хондросаркоме – 294–569 нг/мл (медиана – 455 нг/мл), саркоме Юинга – 357–662 нг/мл (медиана – 486 нг/мл), ГКО – 339–702 нг/мл (медиана – 457 нг/мл), ЗФГ – 367–785 нг/мл (медиана – 584 нг/мл). Достоверными оказались различия только при сравнении содержания ТИМП-1 в сыворотке крови у практически здоровых людей и больных остеосаркомой ($p=0,038$) и периостальной остеосаркомой ($p=0,007$).

Различий в содержании ТИМП-1 в сыворотке крови с учетом пола, возраста больных, локализации и размера первичной опухоли не обнаружили.

Содержание ММП-2 в сыворотке крови практически здоровых людей было в пределах 144–318 нг/мл (медиана – 196 нг/мл), при типичной остеосаркоме – 92–243 нг/мл (медиана – 158 нг/мл), периостальной остеосаркоме – 130–193 нг/мл (медиана – 149 нг/мл), хондросаркоме – 117–262 нг/мл (медиана – 168 нг/мл), саркоме Юинга – 116–203 нг/мл (медиана – 161 нг/мл), ГКО – 117–241 нг/мл (медиана – 159 нг/мл), ЗФГ – 142–178 нг/мл (медиана – 149 нг/мл). Достоверных различий в содержании ММП-2 в сыворотке крови у практически здоровых людей и пациентов с опухолями костей, а также при сравнении значений с учетом гистологического строения опухоли не выявлено.

Уровень ММП-7 в сыворотке крови практически здоровых людей был в пределах 1,07–5,15 нг/мл

(медиана – 2,35 нг/мл), при типичной остеосаркоме – 1,75–5,56 нг/мл (медиана – 2,94 нг/мл), периостальной остеосаркоме – 2,16–8,18 нг/мл (медиана – 2,88 нг/мл), хондросаркоме – 1,79–6,15 нг/мл (медиана – 3,32 нг/мл), саркоме Юинга – 1,20–4,49 нг/мл (медиана – 2,62 нг/мл), ГКО – 2,21–5,97 нг/мл (медиана – 3,41 нг/мл), ЗФГ – 2,24–3,98 нг/мл (медиана – 2,97 нг/мл). Достоверных различий в содержании ММП-7 в сыворотке крови у практически здоровых людей и у пациентов с опухолями костей не выявлено. При сравнении значений с учетом гистологического строения опухоли достоверные различия получены только при сравнении содержания ММП-7 в сыворотке крови больных ГКО и саркомой Юинга ($p=0,046$).

Содержание ММП-9 в сыворотке крови практически здоровых людей было в пределах 92–915 нг/мл (медиана – 501 нг/мл), у пациентов с опухолями костей – 169–1057 нг/мл (медиана – 377 нг/мл), при типичной остеосаркоме – 210–1057 нг/мл (медиана – 372 нг/мл), периостальной остеосаркоме – 495–593 нг/мл (медиана – 552 нг/мл), хондросаркоме – 169–428 нг/мл (медиана – 311 нг/мл), саркоме Юинга – 221–558 нг/мл (медиана – 378 нг/мл), ГКО – 259–612 нг/мл (медиана – 377 нг/мл), ЗФГ – 283–491 нг/мл (медиана – 435 нг/мл). Статистический анализ показал, что у практически здоровых людей содержание ММП-9 в сыворотке крови было достоверно выше, чем при опухолях костей ($p<0,05$). Кроме того, достоверные различия получены при сравнении содержания ММП-9 в сыворотке крови больных хондросаркомой и периостальной остеосаркомой ($p<0,05$).

Корреляционный анализ показал наличие прямой достоверной зависимости между содержанием ТИМП-1 и ММП-9 в сыворотке крови при типичной остеосаркоме, периостальной остеосаркоме и саркоме Юинга ($r=0,37$, $p=0,024$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, уровень ТИМП-1 при типичной остеосаркоме и особенно при периостальной остеосаркоме, характеризующейся очень агрессивным течением, были достоверно выше, чем у практически здоровых людей, что, возможно, связано с участием ТИМП-1 в механизмах инвазии и метастазирования опухоли. Кроме того, при злокачественных опухолях костей содержание ММП-9 в сыворотке крови было достоверно ниже, чем у практически здоровых людей. Выявлена прямая корреляция между содержанием ТИМП-1 и ММП-9 в сыворотке крови при типичной остеосаркоме, периостальной остеосаркоме и саркоме Юинга. Полученные данные позволяют предположить, что экспрессия ТИМП-1 и ММП-9 может иметь связь с патогенетическими механизмами роста типичной и периостальной остеосаркомы и саркомы Юинга, что может служить предметом дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bao M., Cao Z., Yu D. et al. Columbamine suppresses the proliferation and neovascularization of metastatic osteosarcoma U-2OS cells with low cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 2012; 215 (3): 174–80.
2. Han J., Yong B., Luo C. et al. High serum alkaline phosphatase cooperating with MMP-9 predicts metastasis and poor prognosis in patients with primary osteosarcoma in Southern China. *World J. Surg. Oncol.* 2012; 10: 37.
3. Husmann K., Arit M., Muff R. et al. Matrix Metalloproteinase 1 promotes tumor formation and lung metastasis in an intratibial injection osteosarcoma mouse model. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1832 (2): 347–54.
4. Korpi J., Hagström J., Lehtonen N. et al. Expression of matrix metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in human osteosarcoma. *Surg. Oncol.* 2011; 20 (1): 18–22.
5. Lin F., Shen Z., Xu X. et al. Evaluation of the expression and role of IGF pathway biomarkers in human sarcomas. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2013; 26 (1): 169–77.
6. Liu Z., Mao J., Peng A. et al. Inhibition of fatty acid synthase suppresses osteosarcoma cell invasion and migration via downregulation of the PI3K/Akt signaling pathway *in vitro*. *Mol. Med. Rep.* 2013; 7 (2): 608–12.
7. Lu K., Yang H., Su C. et al. Phyllanthus urinaria suppresses human osteosarcoma cell invasion and migration by transcriptionally inhibiting u-PA via ERK and Akt signaling pathways. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 52: 193–9.
8. Mohammed M., Seleim M., Abdalla M. et al. Urinary high molecular weight matrix metalloproteinases as non-invasive biomarker for detection of bladder cancer. *BMC Urol.* 2013; May 14; 13:25.
9. Nakamura A., Aizawa J., Sakayama K. et al. Genistein inhibits cell invasion and motility by inducing cell differentiation in murine osteosarcoma cell line LM8. *BMC Cell Biol.* 2012; Sep. 26; 13:24.
10. Weng Y., Cai M., Zhu J. et al. Matrix metalloproteinase activity in early-stage lung cancer. *Onkologie.* 2013; 36 (5): 256–59.
11. Woessner J.F.Jr. MMPs and TIMPs—an historical perspective. *Mol. Biotechnol.* 2002; 22 (1): 33–49.
12. Xin Z., Shen C., Tao L. et al. Gambogic acid inhibits invasion of osteosarcoma via up-regulation of TIMP-1. *Int. J. Mol. Med.* 2013; 31 (1): 105–12.
13. Zhang Y., Song L., Cai L. et al. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 53: 325–33.

Новости науки

ПЛОХО С МАТЕМАТИКОЙ? ПОЛЕЧИТЕСЬ ЭЛЕКТРИЧЕСТВОМ!

В 2010 г. специалист в области неврологии R. Kadosh (Оксфорд, Великобритания) установил, что электрический ток может стимулировать развитие математических способностей человека. Недавно проведенная серия экспериментов на добровольцах показала, что несильные безболезненные воздействия электрическим током на определенные зоны головы могут улучшить математические способности, и этот эффект сохраняется в течение 6 мес. Исследователи не до конца понимают механизмы такой стимуляции и допускают, что она может вызвать побочный эффект.

Примеры использования электрического шока в психиатрии еще довольно свежи в памяти, что обуславливает отрицательное отношение к исследованиям в области действия тока на нервную систему. Тем не менее показано, что более мягкое действие тока величиной 1 мА (приблизительно равное току от «мизинчиковой» батарейки AA) в течение 5 дней по 20 мин ежедневно приводит к достоверному улучшению результатов при выполнении математических заданий.

Current Biology. — 2013; 23: 1–6.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОТВЕТА МОЗГА НА ПИЩЕВОЙ СИГНАЛ

Идентификация пищи как энергетического источника зависит от способности образовывать связи между пищевым сигналом и питательной ценностью пищи. При достаточной калорийной ценности пищи происходит образование связи с центром удовольствия (прилежащее ядро мозга). При употреблении пищи с похожим вкусом, но не содержащей калорий, и сравнении ее испытуемыми по принципу «нравится/не нравится» установлено, что повышение калорийности за счет не определяемого по вкусу мальтодекстрина приводит к повышению удовольствия, получаемого от продукта. Активация центра удовольствия зависит от повышения содержания в крови глюкозы. В связи с наличием у каждого испытуемого индивидуального уровня метаболизма глюкозы степень активации прилежащего ядра была связана не столько с количеством потребленной глюкозы, сколько с особенностями углеводного обмена у конкретного человека.

Current Biology. — 2013; 02: 2–7.

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И ЗАБОЛЕВАНИЯ ПАРОДОНТА

Е.А. Соловых¹, кандидат медицинских наук, Т.Б. Караогланова¹,
Н.Е. Кушлинский^{1,2}, член-корреспондент РАМН, профессор

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова
МЗ РФ, Российская Федерация, 127473, Москва, ул. Десятская, д. 20, стр. 1;

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: solovykh75@gmail.com

Введение. В представленной работе изложены основные современные сведения о роли ММП в различных биохимических процессах в организме. Основное внимание уделено роли ММП в патогенезе пародонтита. Приведенные литературные данные свидетельствуют о неоднозначности научных взглядов на роль ММП в этиологии и патогенезе воспалительных и воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта.

Цель. Выяснение диагностического значения увеличения концентрации воспалительных цитокинов в ротовой жидкости у пациентов с воспалительными и воспалительно-деструктивными заболеваниями пародонта.

Материал и методы. Проведено комплексное стоматологическое обследование 145 пациентов в возрасте от 18 до 52 лет, из них 63 – с интактным пародонтом, 25 – с легкой, 45 – со средне-тяжелой и 12 – с тяжелой степенью пародонтита. Концентрации ММП-8 и ММП-9 определяли в нестимулированной слюне иммуноферментным анализом.

Результаты. Выявлен ряд закономерностей в концентрации воспалительных цитокинов в ротовой жидкости у пациентов с различным состоянием тканей пародонта. На начальном этапе воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта важнейшее значение имеет фактор гигиенического состояния, в частности, микробной обсемененности полости рта. В дальнейшем прогрессирование заболевания связано с присоединением возрастных изменений в организме человека, причем данный фактор, согласно результатам корреляционного анализа, начинает играть важную роль в патогенезе пародонтита.

Заключение. Воспалительно-дистрофический процесс в пародонте развивается поэтапно, и на каждом этапе возможны появление новых патогенетических факторов или суммирование их негативного влияния. ММП-9 в ротовой жидкости может служить маркером хронического генерализованного пародонтита. Наличие в полости рта этих пациентов ортопедических конструкций из хромокобальтового или хромоникелевого сплава ведет к увеличению содержания ММП-2, ИЛ-1β и ИЛ-6 в ротовой жидкости.

Ключевые слова: заболевания пародонта, патогенез пародонтита, матриксные металлопротеиназы, воспалительные цитокины

MATRIX METALLOPROTEINASES AND PERIODONTAL DISEASES

E.A. Solovykh¹, T.B. Karaoglanova¹, N.E. Kushlinskiy^{1,2}

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Russian Federation,
127473, Moscow, Delegatskaya street, 20/1; ²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24

Introduction. The paper presents basic information about the modern role of the IMF in various biochemical processes. Emphasis is placed on the role of MMPs in the pathogenesis of periodontitis. These published data suggest ambiguity of scientific views on the role of MMPs in the etiology and pathogenesis of inflammatory and inflammatory-destructive periodontal disease.

The aim of the study. Ascertainment diagnostic value increasing concentrations of inflammatory cytokines in saliva of patients with inflammatory and inflammatory-destructive periodontal disease.

Methods. We conducted a comprehensive dental examination in 145 patients aged 18 to 52 years, 63 of them – with an intact periodontium, 25 – with mild periodontitis, 45 – with an average severity parodontitai 12 – with severe periodontitis. Concentrations of MMP-8 and MMP-9 in unstimulated saliva was measured by enzyme immunoassay.

Results. Revealed a number of regularities concentrations of inflammatory cytokines in saliva of patients with different state of periodontal tissues. At the initial stage of the inflammatory and degenerative diseases periodontal crucial factor hygienic conditions and, in particular microbial contamination of the oral cavity. In the future progression of the disease due to the addition of age-related changes in the human body, and this factor according to the results of correlation analysis, begins to play an important role in the pathogenesis of periodontitis. From this we can assume that the inflammatory- dystrophic process in periodontitis develops in stages and at each stage it is possible the emergence of new pathogenic factors or summation of their negative impact. MMP-9 in oral fluid may serve as a marker of chronic generalized periodontitis.

Conclusions. The presence in these patients oral prosthetic constructions made of nickel-chromium alloys or chrom-cobalt leads to increased levels of MMP-2, IL-1β and IL-6 in saliva.

Key words: periodontal disease, the pathogenesis of periodontitis, matrix metalloproteinases, proinflammatory cytokines

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство внеклеточных цинксодержащих протеиназ [14].

ММП синтезируются в виде неактивных проферментов и активируются после отщепления пропептида. Активность ММП регулируется на разных уровнях, включая транскрипцию, активацию белка и взаимодействие с ингибиторами, такими, как тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMPs).

ММП расщепляют большинство белков внеклеточного матрикса (ВКМ) и базальной мембраны [14]; они также вовлечены в деградацию и процессинг факторов роста, цитокинов, веществ, участвующих в апоптозе и клеточной адгезии. Кроме того, ММП вместе с другими внеклеточными протеиназами участвуют в различных физиологических процессах: физиологической и послераневой перестройке тканей, воспалении и иммунном ответе, имплантации яйцеклетки в стенку матки, неоангиогенезе. ММП – нейтральные протеиназы, которые активны при физиологических pH и температуре. Однако при наличии патологии ММП могут вызывать повреждение тканей.

К настоящему времени описано около 30 ММП. Традиционно они классифицируются по субстратной специфичности. За способность этих ферментов специфически гидролизовать все основные белки ВКМ они были названы матриксными металлопротеиназами или матриксинами. Известно, что ММП играют центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития матрикса, при онкогенной трансформации клеток, при ангиогенезе, аутоиммунных и воспалительно-дистрофических заболеваниях. Семейству белков ММП присущи некоторые общие характерные черты. По составу ММП гомологичны на 32–49%, большинство из них имеют общую 5-доменную структуру в своей основе. Типичная ММП состоит из пропептида, включающего 80 аминокислот, каталитического металлопротеиназного домена из 170 аминокислот, связывающего пептида различной длины и гемопексина – домена, состоящего из 200 аминокислот.

В то же время на основании данных по структурной организации и субстратной специфичности в семействе ММП выделены следующие подсемейства:

- коллагеназы кишечника (ММП-1, -8, -13);
- желатиназы (коллагеназы коллагена-IV: ММП-2 и ММП-9);
- матрилизины (ММП-7, ММП-26);
- стромелизины (ММП-3, ММП-10);
- мембранный тип (MT) ММП (трансмембранный тип и GPI-связанная эластаза);
- другие ММП, не относящиеся к перечисленным подсемействам, а именно: эластаза макрофагов, энамелизин, эпилизин.

ММП представленных подсемейств могут отличаться способом активации проферментов и особенностями взаимодействия с эндогенными ингибиторами.

Вместе с тем все члены семейства ММП обладают общими характерными чертами:

- содержат цинк в активном центре, относятся также и к кальций-зависимым протеиназам и поэтому ингибируются хелатными агентами;
- каталитический домен содержит мотив – HEXXHXXGXXH , 3 остатка гистидина которого связывают атом цинка в активном центре;
- обладают сходной доменной структурой;
- гидролизуют один или несколько компонентов матрикса и базальной мембраны;
- секретируются в виде проферментов, пропептидный домен содержит консервативную последовательность, отвечающую за активацию про-ММП;
- проферменты активируются рядом протеиназ, тиолмодифицирующими агентами и хаотропными реагентами;
- ингибируются специфическими тканевыми ингибиторами;
- последовательности кДНК всех ММП имеют высокую степень гомологии с кДНК коллагеназы;
- промоторные участки генов содержат несколько сходных регуляторных последовательностей.

Функции ММП в норме. В физиологических условиях матриксинасы играют центральную роль в процессах морфогенеза, ремоделирования и резорбции тканей. Они участвуют в деструкции ВКМ при ряде заболеваний (пародонтиты, хронические язвенные процессы, аутоиммунные заболевания, в процессах инвазии и метастазирования опухолей). Матриксинасы в физиологических условиях секретируются из клеток в очень незначительных количествах. Одной из характерных особенностей синтеза этих ферментов является их способность к индукции, т.е. синтез и секреция ММП могут контролироваться многими факторами. В процессах эмбрионального развития и морфогенеза деструкция соединительнотканного матрикса является центральной, критической стадией. Экспериментально на мышах было показано, что на стадии имплантации эмбриональных клеток в матку в них экспрессируются гены *MMP-1, -2, -3* и особенно *MMP-9*, а также *TIMP-1*. В клетках материнской ткани, окружающей эмбрион, в течение 5–6 дней экспрессируется ген *TIMP-3* (ингибитора желатиназ), но экспрессии и синтеза *TIMP-1* и *TIMP-2* ни в материнских, ни в эмбриональных клетках не наблюдается. Определенное соотношение синтеза ММП и специфических эндогенных ингибиторов обеспечивает внедрение эмбриона в стенку матки. Образование новых кровеносных сосудов – необходимый этап в процессах развития организма, заживления ран и воспаления. Процесс требует отделения эндотелиальных клеток от базальных мембран и их миграции через соединительнотканый барьер. Во время миграции клетки эндотелия продуцируют ряд ММП, которые облегчают миграцию клеток.

Стало известно, что ряд факторов стимулируют не только неоангиогенез, но и продукцию ММР. ММР-1, -2, -3 и -9; такие ферменты были обнаружены в стимулированных эндотелиальных клетках, а уровень каждого из них зависел от источника и вида клеток. Действие ингибиторов ММР, в том числе TIMP-1, на инвазивный процесс эндотелиального клеточного, подтверждает участие ММР в ангиогенезе.

Сделан еще один важный шаг в понимании молекулярных основ регуляции процесса инвазии на уровне межклеточного взаимодействия. Известно, что инвазия зависит от кооперации процессов адгезии и протеолиза. Интегрины рассматриваются как молекулы адгезии, выполняющие функции внеклеточных рецепторов матрикса. Установлено, что ММР-2 может быть локализована в активной форме на поверхности инвазирующих клеток путем взаимодействия с интегрином- $\alpha\beta$ -3. Комплексы с интегрином обнаружены на поверхности эндотелиальных клеток. Эти данные указывают на участие единого рецепторного механизма в регуляции процессов деградациии матрикса и миграции клеток. В настоящее время проводятся многочисленные исследования по разработке ингибиторов ММР как лекарственных препаратов.

Показано, что повышенная активность ММР оказывает непосредственное влияние на физиологию молочной железы, так как контролируемый процесс ремоделирования внеклеточного матрикса путем окологклеточного протеолиза является важной частью морфогенеза молочной железы, циклических изменений в течение менструального цикла и дифференциации, необходимой для лактации. Хотя разрушение внеклеточного матрикса необходимо для эпителиальных клеток, стромальные клетки, включая фибробласты, наряду с клетками воспаления и иммунными клетками, являются главными продуцентами ММР.

РОЛЬ ММР ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПАРОДОНТА

Пародонтит — хронический воспалительный процесс, индуцированный бактериальной инфекцией и затрагивающий десны и поддерживающие зубы структуры, включая кость. Длительно существующая инфекция пародонта активирует защитные, в том числе иммунные, механизмы, которые могут оказаться деструктивными для организма и привести к потере зубов и(или) зубных имплантатов. Современные методы клинического обследования больных пародонтитом и оценки природы бактериальной инфекции достаточно надежны и информативны, однако в большей степени оценивают историю и природу заболевания, чем его активность. В этой связи существенную помощь в оценке тяжести заболевания и формировании групп пациентов с повышенным риском прогрессирования пародонтита и возникновения необратимых деструктивных из-

менений могли бы оказать современные неинвазивные молекулярно-биохимические методы оценки состояния пародонта.

В здоровой ткани пародонта уровень TIMPs обычно выше, чем в воспаленной ткани, в которой соотношение между активностью ММР и уровнем TIMPs сдвигается в сторону ММР. Чем тяжелее воспаление, тем выше активность ММР. В десневой жидкости при пародонтите активность ММР-1, -2, -3 и -9 существенно повышается, а TIMP-1 и TIMP-2 резко понижена по сравнению с уровнем у здоровых людей. Некоторые исследования указывают на рост уровня TIMPs при пародонтите, которого, однако, недостаточно, чтобы блокировать повышенную активность ММР.

Известно, что одним из главных факторов в этиологии пародонтита является микробный. Большинство воспалительных заболеваний пародонта возникают в результате бактериальной инфекции. При отсутствии микробного фактора воспроизвести в эксперименте пародонтит невозможно. При этом основными патогенами, провоцирующими возникновение пародонтита, считаются *Actinobacillus actinomycetem comitans* и *Porphyromonas gingivalis*. Кроме того, в возникновении болезни участвуют *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus*, *Micromonas micros*, *Streptococcus intermedius*, *Eubacterium nodatum*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* и др. [1].

Однако роль спускового крючка в развитии хронического генерализованного пародонтита играют особенности иммунного ответа, нарушения в эндокринной системе и т.д. Вместе с тем взаимодействие микроорганизмов и их токсинов с клетками эпителия десны запускает цепь биохимических реакций, которые ведут к развитию очага воспаления, миграции в него лейкоцитов, нарушению проницаемости капилляров и кровоточивости десен. Усиленная продукция в очаге воспаления клетками протеолитических ферментов, в том числе и ММР, — результат ответной реакции клеток эпителия и иммунной системы на инвазию микроорганизмов, что приводит к разрушению ВКМ; в результате возникают пародонтальные карманы, патологическая подвижность и смещение зубов, резорбция межальвеолярных перегородок и остеопороз. Коллагеназы бактерий действуют иным способом: они расщепляют коллаген в различных участках, образуя множество коротких пептидных фрагментов [14].

Микроорганизмы взаимодействуют с эпителиальными клетками десен через ТЛ-рецепторы (toll-like receptors). В ответ на это клетки секретируют интерлейкин (ИЛ) 1, фактор некроза опухоли (ФНО α), ММР и антимикробные пептиды. Цитокины (ИЛ-1, -8, -12, ФНО α) стимулируют миграцию других типов иммунных клеток в очаг воспаления.

Под действием провоспалительных цитокинов, белков комплемента и продуктов патогенов в тка-

нях пародонта появляются нейтрофилы и макрофаги. Активированные макрофаги продуцируют ИЛ12 и интерферон (ИФН)- γ . При хроническом течении процесса морфологическая картина в очаге воспаления напоминает гиперчувствительность замедленного типа. Наличие ИЛ12 ускоряет хемотаксис и последующую активацию макрофагов и Т-хелперов 1-го типа. В периоды обострения хронического пародонтита в очагах воспаления преобладают В-клетки, плазматические клетки и Т-хелперы 2-го типа. Стимуляция этих клеток бактериальными продуктами (например, липополисахаридами) ведет к секреции цитокинов ИЛ1 и ФНО α , которые могут опосредованным путем индуцировать дифференцировку предшественников остеокластов и впоследствии их активацию. Дифференцировка остеобластов зависит от синтеза так называемого лиганда остеопротегерина (RANKL) этими клетками. В противоположность этому активированные Т-клетки за счет собственного синтеза RANKL могут напрямую ускорять дифференцировку остеобластов. RANKL преимущественно синтезируется в Th-1-клетках. Таким образом, в действии Т-клеток на резорбцию костной ткани при пародонтите участвует в основном Th-1 тип Т-клеток.

Остеопротегерин (OPG) является белком – представителем семейства TNF-рецепторов. Он предотвращает связывание RANKL с трансмембранным рецептором RANK (активатор рецептора NF- κ B), блокируя пролиферацию и дифференцировку остеобластов. При хроническом пародонтите соотношение RANKL/OPG повышается, что стимулирует образование остеокластов из предшественников. Известно также, что фактор роста кератиноцитов (KGF-1) запускает пролиферацию и инвазию эпителиоцитов в соединительную ткань, что способствует образованию зубодесневых карманов.

Кроме указанных эффектов, возможно и прямое повреждающее действие патогенов на ткани пародонта, хотя в настоящее время этот механизм развития пародонтита считается второстепенным. Так, *P. gingivalis* секретирует ферменты (протеазы, MMP, фибринолизин, фосфолипазу А), которые могут повреждать клетки окружающих тканей и вести к их гибели.

Из известных MMP наибольшей протеолитической активностью по отношению к коллагену I типа обладает коллагеназа нейтрофилов или MMP-8, активность которой, по данным экспериментальных и клинических исследований, тесно связана с патологическими изменениями околозубной ткани. Существенный вклад в коллагенолиз вносят также желатиназы MMP-2 и MMP-9, главным субстратом которых является коллаген IV типа. Широкая субстратная специфичность MMP, включающая в том числе воспалительные цитокины, определяет их участие не только в процессах деструкции пародонта, но и в модуляции воспалительной реакции на бактериальную инфекцию.

MMP-8 (КОЛЛАГЕНАЗА-2, КОЛЛАГЕНАЗА НЕЙТРОФИЛОВ)

MMP-8 синтезируется гранулоцитами при их дифференцировке в костном мозге и сохраняется в специфических гранулах циркулирующих нейтрофилов. Однако существуют другие источники MMP-8: эпителиальные клетки, фибробласты из десен и периодонта, моноциты/макрофаги, плазматические клетки [10, 14]. MMP-8 активно разрушает не только коллагены I, II, III, VII, VIII и X типов, но и другие молекулы клеток и ВКМ.

Имеются данные, указывающие на то, что сульфидные эпителиальные клетки и базальные клетки могут взаимодействовать с разрушающими ткани MMP [14]. Имеются доказательства того, что стимулированные цитокинами синовиальные и гингивальные фибробласты, моноциты/макрофаги, клетки эндотелия и хондроциты суставов могут секретировать мезенхимальный тип MMP-8 *de novo*, указывая на более сложный, чем считалось ранее, характер процесса повреждения тканей этим ферментом.

MMP-8 высвобождается из нейтрофилов в латентной, неактивной форме и становится активной в очаге воспаления в периодонте под действием независимых или координированных действий медиаторов воспаления, таких, как ФНО α и ИЛ1 β , микробных протеаз и радикалов кислорода из активированных нейтрофилов [13, 14]. Размер MMP-8 колеблется, по данным разных авторов, от 50 до 85 kDa, а некоторые формы – в пределах 20 kDa [14], отражая различную степень гликирования MMP-8 и то, в какой форме (латентной или активной) находится фермент после ограниченного протеолиза. Активированная MMP-8 из периферических нейтрофилов при иммуноблоттинге может быть обнаружена во фракции 65–70 kDa, а MMP-8 из десневой жидкости определяется в основном в зоне 60 kDa и в небольшом количестве – в зоне 78 kDa, соответствуя активной и латентной формам фермента. Активность MMP-8 может быть блокирована TIMP-1 и TIMP-2, а также тетрациклинами (доксидоциклином), химически модифицированным производным тетрациклинов, бифосфонатами и ЭДТА.

Показано, что MMP-8 играет важную роль в разрушении тканей при пародонтите. Фермент считают основной коллагеназой при хроническом пародонтите [14, 15]. Субстратами во внеклеточном матриксе для MMP-8 являются коллагены I–III, VII и X типов, желатин, протеогликаны, брадикинин, ангиотензин I, фибриноген, субстанция P и агрекан, а также про- и противовоспалительные цитокины/медиаторы. Активность MMP-8 наблюдали при воспалении, связанном с гингивитом. При гингивите уровень MMP-8 слегка повышается в десневой жидкости, но фермент обнаруживается в латентной, неактивной форме. При хроническом пародонтите активность MMP-8 составляет 90–95% от активности всех коллагеназ в десневой жидкости. В активную, прогрессирующую фазу пародонтита уровень

ММР-8 в десневой жидкости существенно повышен, и фермент присутствует в основном в активной форме.

У пациентов с прогрессирующей потерей соединительной ткани периодонта в десневой жидкости обнаружена более высокая активность ММР-8, чем у пациентов со стабильным состоянием и у страдающих гингивитом. После успешного лечения пародонтита активность ММР-8 в десневой жидкости существенно понижается, а имеющаяся коллагеназа присутствует в латентной форме.

Уровень активной коллагеназы в слюнной жидкости и смыве из ротовой полости также отражает тесную связь со стадиями пародонтита. Так, в слюне или смыве из ротовой полости пациентов с нелеченым хроническим пародонтитом обнаруживали высокую активность ММР-8; после лечения ее уровень снижался. ММР-8 является также главным источником коллагеназной активности в воспаленной десневой ткани у человека. Экстракты воспаленной десневой ткани у человека. Экстракты воспаленной десневой ткани, взятые у больных с пародонтитом, при сравнении с экстрактами из здоровой ткани характеризовались патологически повышенным уровнем ММР-8 в активной форме. ММР-8 считают также основной ММП зрелой зубной бляшки у человека.

Повышенный уровень ММР-8 обнаружен при других воспалительных заболеваниях: ревматоидном артрите, хроническом воспалении легких, заболеваниях глаз. Вместе с тем показано, что ММР-8 притупляет противовоспалительные и защитные функции при воспалениях легких различного генеза, возможно, через регуляцию апоптоза клеток в очаге воспаления и процессинге противовоспалительных цитокинов и хемокинов.

ЖЕЛАТИНАЗЫ ММР-2 И ММР-9

Предполагается, что ММР-2 и ММР-9 также участвуют в разрушении ткани периодонта при пародонтите, так как при этом заболевании в десневой жидкости обнаружено существенное повышение активности этих желатиназ, в результате лечения она снижалась.

ММР-2 и ММР-9 расщепляют как желатины (коллаген после денатурации кишечными коллагеназами), так и коллагены IV, V, VII, X и XI типов, эластин и компоненты базальной мембраны. В структуре обеих желатиназ имеется 3 мотива фибронектина-II в каталитическом домене, которые необходимы для эффективного расщепления IV типа коллагена, эластина и желатинов.

ММР-2 (желатиназа А), размер 72 kDa, в основном синтезируется фибробластами и другими клетками соединительной ткани. ММР-2 расщепляет прежде всего эластин. Как и ММР-2, ММР-1 может действовать на внутриклеточные белки. ММР-2 обладает более слабой коллагенолитической активностью, чем ММР-1 в растворе, но у поверхности клетки фермент активируется мембраносвязанной МТ-ММР, увели-

чивая свою коллагенолитическую активность. Повышение уровня ММР-2 обнаружено в десневой ткани пациентов с хроническим пародонтитом в зоне рядом с суллярной базальной мембраной.

ММР-9 относится также к членам семейства протеолитических ферментов, которые регулируют клеточно-матриксную композицию; для проявления их активности требуется цинк. ММР-9 разрушает денатурированный коллаген (желатин), в частности IV тип коллагена, который входит как основной в состав базальных мембран.

Еще более эффективно ММР-9 расщепляет желатин, а также коллагены IV, I, II, III, V, VI и X типов, фибронектин, фибрилин и агрекан. Такое разрушение коллагена помогает лимфоцитам и другим лейкоцитоподобным дендритным клеткам проникать в кровяное русло и лимфатические сосуды и циркулировать в них. ММР-9 также способна разрушать основной белок миелина (МВР) и 2-й тип желатинов, остающиеся эпитопы которых способны генерировать аутоиммунные процессы.

Экспрессия и секреция ММР-9 активированными лимфоцитами и моноцитами регулируется цитокинами, хемокинами, эйкозаноидами и пептидогликанами. В большинстве типов клеток генная транскрипция ММР-9 приводит к секреции зимогена (профермента), который остается неактивным до тех пор, пока не активируется после удаления пропептидного домена протеолитическими ферментами, подобно стромелизину-1, ММР-2 и другим ММРs. Обычно ММР-9 секретируется вместе с различным количеством специфического ингибитора TIMP-1, который контролирует ее протеолитическую активность. Нарушение баланса между ММРs и TIMPs может приводить к деградации тканей, что часто ассоциировано с такими воспалительными заболеваниями, как хронический пародонтит, атеросклероз, системная красная волчанка, синдром Сьегрена, системный склероз, ревматоидный артрит, множественный склероз и полимиозит.

При пародонтите главным источником ММР-9 являются нейтрофилы, в меньшей степени — моноциты/макрофаги. Липополисахариды *Fimbriae P. gingivalis* могут играть существенную роль в индукции дендритными клетками (инфильтрирующими слизистую оболочку полости рта) ММР-9. Последняя считается потенциальным медиатором локальной деструкции тканей и лейкоцитарной инфильтрации.

Считается, что ММР-9 — основная желатиназа в десневой ткани, зубных бляшках, слюнной и десневой жидкости у пациентов с хроническим пародонтитом. В десневой жидкости таких больных ее активность существенно выше, чем при локальном ювенильном пародонтите и у здоровых. В десневой жидкости, полученной методом омывания ротовой полости, собранной у больных пародонтитом, активная желатиназа (ММР-9) обнаружена в большинстве образцов (97,8%), тогда как при гингивите — только

в 11,4%. Средняя активность ММР-9 была максимальной у больных с рецидивирующим заболеванием и при возникновении абсцесса. В период образования зубодесневых карманов у больных пародонтитом средняя желатиновая активность возрастала в 2 раза, поэтому было предложено исследовать ММР-9 в качестве маркера при оценке клинической тяжести пародонтита, основываясь на изучении поперечных срезов из пародонта.

В настоящее время из ряда перспективных биомаркеров пародонтита в клиническую практику внедрен только ММР-8 – фермент, преобладающий в очагах пародонтита и в слюнной жидкости. Еще в 1999 г. с целью развития экспресс-анализа коллагеназной активности S. Mancinietal разработан новый метод (solublebiotinylated-collagenassay – SBA), основанный на хемилюминесцентном обнаружении биотинилированных продуктов расщепления коллагена. Они проверили диагностические возможности SBA в перекрестном и долгосрочном исследовании (участвовали 125 больных с пародонтитом и 32 здоровых добровольца). Анализ ММР-8 в десневой (альвеолярной) жидкости показал, что при прогрессирующем пародонтите уровень фермента возрастает в 18 раз по сравнению с показателем в контрольной группе и больных пародонтитом в стабильном состоянии. В ходе терапии уровень ММР-8 снижался более чем в 4 раза.

В десневой жидкости была обнаружена ММР-8 в концентрации >1 мг/л. Результаты, полученные при экспресс-тесте, длительность которого не превышала 5 мин, хорошо согласовывались с результатами иммунофлюоресцентного анализа ММР-8 в десневой жидкости и клиническими проявлениями пародонтита. В результате лечения пародонтита уровень ММР-8 значительно снижался.

Примерно в то же время было испытано [8] портативное диагностическое устройство для анализа ММР-8 и других маркеров в слюне – Integrated Microfluidic Platform for Oral Diagnostics (IMPOD). В исследованиях этого коллектива IMPOD позволял быстро (за 3–10 мин) измерять концентрацию ММР-8 и других биомаркеров в слюне. Средняя концентрация ММР-8 в слюне пациентов с интактным пародонтом была в 10 раз меньше, чем у больных пародонтитом. Таким образом, существующие технологии позволяют проводить экспресс-диагностику пародонтита, контролировать его клиническое течение и эффективность терапии.

СОВРЕМЕННЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ММР

С помощью иммуноферментного анализа выявлены [1] повышенные (по сравнению с 20 практически здоровыми людьми и 15 больными гингивитом) уровни ММР-8 в слюне и ММР-9 в межальвеолярной жидкости у 20 больных с начальной стадией пародонтита. При этом в сравниваемых 2 группах авторы обнаружили низкий уровень ММР-2 в межальвеоляр-

ной жидкости (в отличие от показателей у больных пародонтитом). На основании проведенного анализа предположено, что определение уровней ММР-8 в слюне, а также ММР-2 и ММР-9 в межальвеолярной жидкости может служить маркером для раннего выявления пародонтита и гингивита.

Установлена связь биомаркеров слюны (ММР-8, ИЛ1 β , OPG) с 3 основными аспектами пародонтита: воспалением, деградацией коллагена и костными изменениями [4, 9]. В исследовании случай-контроль (28 больных пародонтитом и 29 здоровых) было показано, что только при комбинации высоких показателей ММР-8 и ИЛ1 β в слюне вероятность развития заболеваний пародонта увеличивается в 45 раз. При этом повышенные уровни всех 3 изученных биомаркеров в слюне коррелируют с индивидуальными клиническими признаками пародонтита.

С помощью ПЦР в реальном времени и иммуноферментного анализа было проведено [5, 12] сравнительное исследование уровня в слюне воспалительных цитокинов, ММР-8, ММР-9 и маркеров костной резорбции (OPG): 1) у практически здоровых/у больных гингивитом; 2) у больных пародонтитом. При этом уровни исследованных биомаркеров коррелировали с наличием анаэробных периодонтальных патогенов (*Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola*), которые считаются предшественниками воспалительных заболеваний пародонта. Такой подход имеет большое практическое значение, так как с помощью указанных выше маркеров позволяет выявлять локальные (в полости рта) и системные заболевания у человека.

В исследовании [1] представлены данные сравнительного иммуноферментного исследования ММР-1, -8, и -13 в образцах ткани при периапикальных повреждениях пародонта. Повышение уровня ММРs в очагах повреждения пародонта было пропорционально прогрессированию патологического процесса и деструкции костной ткани, что подтверждено клиническими и рентгенологическими методами обследования. По мнению исследователей, полученные данные подтверждают деструктивную роль ММР-1, -8 и -13 при воспалительных процессах и напрямую связаны с дегенеративными изменениями в тканях пародонта.

Проведено [6, 11] сравнительное иммуноферментное (ELISA) и иммуноблоттинговое исследование содержания ММР-7, TIMP-1 и внеклеточного индуктора ММП (EMMPRIN) в межальвеолярной жидкости у 60 пациентов с заболеваниями пародонта (генерализованный агрессивный пародонтит – у 20, хронический пародонтит – у 20, гингивит – у 20) и 20 практически здоровых людей с интактным пародонтом. Авторы выявили достоверное по сравнению со здоровыми ($p < 0,008$) повышение указанных выше маркеров у больных всех 3 групп. При этом обнаружены достоверно более высокие показатели TIMP-1 у больных генерализованным агрессивным и хроническим пародонтитом ($p < 0,0001$)

по сравнению с пациентами с гингивитом. Кроме того, исследователи выявили растворимые формы EMMPRIN с различной молекулярной массой (30, 55, 100, 180, 200 kDa) в межальвеолярной жидкости пациентов 3 групп. Отмечено также повышение (статистически незначимое) уровня TIMP-1 и EMMPRIN у больных генерализованным агрессивным пародонтитом (по сравнению с больными гингивитом).

Данные ряда авторов [3, 5, 13] показывают, что MMP-7 ассоциирована с естественной защитой тканей пародонта, а высокие уровни TIMP-1 и EMMPRIN в межальвеолярной жидкости – с воспалительным процессом в тканях пародонта. Авторы полагают, что TIMP-1 и EMMPRIN могут участвовать в прогрессировании воспалительного процесса в тканях пародонта, при этом молекулы EMMPRIN присутствуют в начальной стадии этого процесса.

Пародонтит считают хроническим воспалительным заболеванием тканей пародонта; большинство исследователей полагают, что он инициируется группой патогенов, локализованных в тканях пародонта. После активного размножения колоний патогенов последние способны стимулировать иммунный ответ циркулирующих иммунных клеток, которые начинают активно продуцировать провоспалительные цитокины, простагландины, протеиназы, в том числе и MMPs.

В клиническом исследовании случай-контроль наряду с RANKL изучали также в нестимулированной слюне 35 взрослых больных хроническим пародонтитом с ремоделированием костной ткани и 37 практически здоровых лиц с интактным пародонтом С-телопептид коллагена I типа с пиридинолиновыми перекрестными связями (ICTP) и ФНО α . Последний был обнаружен во всех образцах слюны больных пародонтитом (4,33 пг/мл); максимальный показатель – 27,96 пг/мл, его уровень был достоверно выше, чем в контроле (2,03 пг/мл; $p < 0,02$). Авторы полагают, что показатель ФНО α в слюне может служить индикатором пародонтита и, кроме того, биомаркером в скрининге, диагностике и мониторинге больных с хроническими воспалительными заболеваниями тканей пародонта.

В последние годы интерес исследователей прикован к изучению молекул клеточной адгезии (CAMs) при хроническом пародонтите. Они представлены в виде белков на мембранах клеточной поверхности и участвуют в механизмах взаимодействия клеток друг с другом, с эндотелием и ВКМ. Растворимые формы CAMs (sCAMs) появляются при протеолитическом разрушении клеток, и эти белки попадают в десневую жидкость. Представлены данные [12] по иммуноферментному изучению sCAMs, sICAM-1, sVCAM-1 и sE-селектина в десневой жидкости у 22 практически здоровых людей с интактным пародонтом и 29 больных хроническим пародонтитом. Статистический анализ выявил достоверные различия

($p < 0,05$) в показателях sVCAM-1 у больных пародонтитом и здоровых, что позволило авторам сделать заключение о высокой чувствительности этого маркера в выявлении пародонтита. Статистически достоверно этот маркер изменялся (его уровень снижался) после проведенной терапии у пациентов с хроническим пародонтитом. Полагают [12], указанные выше потенциальные маркеры клеточной адгезии могут быть чувствительными индикаторами прогрессирования пародонтита, в оценке эффективности терапии и играть превентивную роль в патогенезе воспалительных заболеваний тканей пародонта.

В крупных стоматологических клиниках Хельсинки и Вантаа обследованы [14] клинически и лабораторными методами 214 пациентов в возрасте от 44 до 78 лет с целью выделения биомаркеров в смывах из ротовой полости для определения их порогового уровня в оценке степени тяжести воспалительной реакции в тканях при пародонтите. Авторы сравнили несколько методов определения концентрации MMP-8; наряду с этим биомаркером изучали также активность эластазы и показатели TIMP-1. Были выявлены тесная связь активности эластазы с высокими уровнями MMP-8, определенными иммунофлуориметрическим методом (IFMA) и наборами реактивов denta Analyzer в смывах из ротовой полости пациентов с воспалительными заболеваниями тканей пародонта, а также тенденция к повышению уровня IFMA-MMP-8/TIMP-1 и dentoELISA-MMP-8/TIMP-1 при утяжелении воспалительной реакции при пародонтите. Отмечено снижение уровня TIMP-1 с возрастом пациентов. Авторы полагают, что MMP-8 и TIMP-1 могут быть использованы как маркеры в оценке степени тяжести воспалительной реакции при пародонтите.

На основании исследования в сыворотке крови 55 больных хроническим пародонтитом (курящих – 16, некурящих – 39) и 56 практически здоровых людей с интактным пародонтом (курящих – 17, некурящих – 39) MMP-8, MMP-9, TIMP-1, эластазы нейтрофилов (NE), миелопероксидазы (MPO) выявлены [10] следующие особенности. При хроническом пародонтите концентрация MPO и NE в сыворотке крови была выше у курящих, чем у некурящих больных (соответственно $p < 0,002$ и $p < 0,001$). Такая же закономерность сохранялась в группе практически здоровых. В то же время уровень TIMP-1 был выше у некурящих больных хроническим пародонтитом, чем у курящих. Обнаружено более высокое соотношение MMP-9/TIMP-1 у курящих больных пародонтитом, чем у некурящих ($p < 0,01$), вместе с тем данное соотношение, а также показатели MMP-8 и MMP-8/TIMP-1 в группе больных хроническим пародонтитом не отличались от таковых у практически здоровых людей. Авторы полагают, что высокие показатели MMP-9, MPO, NE при пониженной концентрации TIMP-1 в сыворотке крови у курящих больных хроническим пародонтитом по сравнению с некурящими может,

наряду с деструкцией тканей пародонта, указывать на предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям.

Выявлены [11] достоверно более высокие показатели MMP-9, TIMP-1, MMP/TIMP-1 в слюне 69 больных хроническим пародонтитом, чем у 54 пациентов с интактным пародонтом. При этом уровень указанных биомаркеров коррелировал с данными клинического обследования пациентов. Полиморфизм гена промотора *MMP-9(-1562C/T)* в колумбийской популяции не был тесно связан с вариациями изученных биомаркеров в слюне у обследованных и не коррелировал с клиническим статусом у них пародонта. Однако авторы полагают, что уровни MMP-9 > 20 нг/мл, TIMP-1 > 64 нг/мл и соотношение MMP-9/TIMP-1 > 1 в слюне могут служить независимыми маркерами, связанными с наличием пародонтита.

Большинство исследователей считают MMP-8 ключевым медиатором воспалительных реакций при хроническом пародонтите. При этом известно, что MMP-8 может кооперированно активировать другие MMPs, в частности MMP-14, активные формы кислорода, а также протеазы патогенов. Изучение в течение длительного периода уровня MMP-8, MMP-14, TIMP-1 и миелопероксидазы (МРО) в десневой жидкости 50 больных хроническим пародонтитом в период ремиссий, обострений и после терапии позволило выявить выраженную позитивную связь между показателями MMP-8, МРО и соотношения МРО/MMP-8 с клиническим течением хронического пародонтита (периоды обострения и ремиссии), а также эффектом проводимого лечения. Взаимоотношение между активацией MMP-2 и оксидативным путем в каскаде реакций при хроническом пародонтите могут быть полезными биомаркерами для выявления рецидива болезни.

Приведенные литературные данные свидетельствуют о неоднозначности научных взглядов на роль MMP в этиологии и патогенезе воспалительных и воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта. Ряд исследователей склонны считать увеличение концентрации воспалительных цитокинов в ротовой жидкости важнейшим патогенетическим подтверждением возникновения и прогрессирования заболеваний пародонта. Другие, напротив, не придают данному явлению значительной роли. Дискутабельным остается вопрос о диагностическом значении увеличения концентрации воспалительных цитокинов в ротовой жидкости у пациентов с воспалительными и воспалительно-деструктивными заболеваниями пародонта.

Нами изучена концентрация MMP-8 и -9 в ротовой жидкости у пациентов с пародонтитом различной степени тяжести. Проведено комплексное стоматологическое обследование 145 пациентов в возрасте от 18 до 52 лет: из них 63 – с интактным пародонтом (21 мужчина, 42 женщины), 25 – с легкой степенью заболевания (7 мужчин, 18 женщин),

45 – со средней (17 мужчин, 28 женщин) и 12 – с тяжелым пародонтитом (5 мужчин, 7 женщин). Концентрацию MMP-8 и MMP-9 определяли в нестимулированной слюне с помощью реактивов для прямого иммуноферментного анализа «HumanMMP-8 (total)» и «HumanMMP-9 (total)» (*Quantikine®*, R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Согласно полученным данным, у обследованных не было статистически значимых различий в содержании MMP-8 и -9 в ротовой жидкости, однако отмечена тенденция к увеличению концентрации MMP-9 у пациентов с более тяжелым течением пародонтита, чем при интактном пародонте (группа контроля).

Выявлена положительная корреляционная зависимость между глубиной пародонтальных карманов и содержанием MMP-9 в ротовой жидкости. При дальнейшем анализе изучены особенности взаимосвязи показателей MMP-8 и MMP-9 у пациентов в каждой из обследованных групп.

В группе с интактным пародонтом не установлено статистически значимых корреляций между концентрацией MMP-9 в ротовой жидкости, показателями индексной оценки состояния тканей пародонта и данными рентгенологического исследования. Концентрация MMP-8 у пациентов с интактным пародонтом составила: нижний квартиль – 92,60; медиана – 181,03; верхний квартиль – 345,85 нг/мл, при легкой и средней степени тяжести пародонтита наблюдалось повышение концентрации MMP-8 соответственно до 94,80/257,95/291,60 и 116,85/183,15/518,90 нг/мл, при тяжелом пародонтите она понижалась до 78,40/169,75/326,00 нг/мл. Различия для MMP-8 между группами оказались статистически недостоверными ($p > 0,05$), хотя отмечена тенденция к более высоким уровням MMP-8 и MMP-9 в ротовой жидкости больных при тяжелой степени пародонтита (по сравнению с более легким его течением и интактным пародонтом).

Изучалась корреляционная зависимость между содержанием MMP-9 в ротовой жидкости и показателями индексной оценки состояния тканей пародонта (РМА, РІ) и гигиенического состояния полости рта (АРИ).

В группе пациентов с пародонтитом легкой степени тяжести выявлена статистически значимая корреляция между показателями MMP-9 в ротовой жидкости и индексом РМА ($r=0,7302$; $p=0,00005$ по Spearman). Положительная корреляция обнаружена в данной группе между глубиной пародонтального кармана ($r=0,572$ при $p=0,42$ по Spearman). Наличие корреляционной зависимости между АРИ и содержанием MMP-9 свидетельствует об активации деструктивных процессов в полости рта при ухудшении гигиенического состояния последней. Отсутствие корреляционной зависимости между содержанием MMP-9 и показателями РМА, РІ в ротовой жидкости свидетельствует о непол-

ной ее объективности индексной оценки состояния тканей пародонта и необходимости поиска более информативных критериев, характеризующих воспалительно-дистрофический процесс в пародонте.

У пациентов со средней степенью тяжести пародонтита выявлена статистически значимая корреляционная зависимость между глубиной пародонтальных карманов и концентрацией ММР-9 ($r=0,33$; $p=0,0056$ по Spearman), корреляционные показатели по Gamma и Kendall Tau достигли соответственно $r=0,253$ и $r=0,232$ при уровне значимости $p=0,0047$. Положительная статистически значимая зависимость выявлена также между показателями ММР-9 в ротовой жидкости и количеством зубов, вовлеченных в патологический процесс ($r=0,413$; $p=0,0005$ по Spearman). Корреляционный коэффициент Gamma достиг $r=0,332$ при $p=0,0002$, показатель Kendall Tau: $r=0,309$ при $p=0,0002$. У пациентов со средней степенью тяжести пародонтита выявлена корреляционная зависимость между возрастом и показателями индексной оценки состояния пародонта, а также клиническими критериями состояния тканей пародонта. Так, коэффициент корреляции Spearman между возрастом пациентов и показателем API составил $r=0,5535$ при $p=0,0041$, а между возрастом и индексом РМА – уровня $r=0,5656$ при значимости $p=0,0144$. Также положительная корреляционная зависимость выявлена между возрастом пациентов и количеством зубов, вовлеченных в патологический процесс: $r=0,2826$; уровень значимости – $p=0,03$.

Установленные корреляционные зависимости свидетельствуют о важном негативном влиянии возрастных изменений в организме человека на патогенез воспалительно-дистрофических процессов в пародонте. Данный факт обуславливает необходимость дальнейшего изучения патогенетических механизмов воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта и детализации роли цитокинов, факторов роста и молекулярно-биологических маркеров в развитии этой патологии.

У пациентов с тяжелым пародонтитом статистически значимая корреляция выявлена между концентрацией ММР-9 и глубиной пародонтальных карманов ($r=0,918$ при $p=0,00047$), коэффициенты корреляции по критериям Gamma и Kendall Tau составили соответственно $r=0,93$ и $r=0,84$ ($p=0,0017$). PI статистически значимо коррелировал с концентрацией ММР-9 в ротовой жидкости на уровне значимости $p=0,0475$ ($r=0,76$). Данная зависимость по критерию Gamma составила $r=0,73$, по критерию Kendall Tau $r=0,63$ при $p=0,047$. Особенности корреляций между изучаемыми показателями в указанной группе свидетельствуют об отсутствии зависимости между гигиеническим состоянием полости рта и индексом РМА при прогрессировании воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта. Наиболее объективно степень деструкции альвеолярной кости

можно оценить по концентрации ММР-9 в ротовой жидкости и PI.

Выявленные закономерности в изменении концентрации воспалительных цитокинов в ротовой жидкости у пациентов при различном состоянии тканей пародонта свидетельствуют о том, что на начальном этапе воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта важнейшее значение имеет гигиеническое состояние полости рта, в частности микробная обсемененность. В дальнейшем прогрессирование заболевания связано с присоединением возрастных изменений в организме человека, причем данный фактор, согласно результатам корреляционного анализа, начинает играть важную роль в патогенезе пародонтита. Отсюда можно предположить, что воспалительно-дистрофический процесс в пародонте развивается поэтапно, и на каждом этапе возможны появление новых патогенетических факторов или суммирование их негативного влияния. Отсутствие корреляционной зависимости между показателями API, РМА, PI и содержанием ММР-9 в ротовой жидкости свидетельствует о неполной объективности индексной оценки состояния тканей пародонта.

Согласно результатам корреляционного анализа, наиболее объективным клиническим критерием состояния тканей пародонта является глубина пародонтального кармана, которая достоверно коррелировала с уровнем ММР-9 в ротовой жидкости.

MT1-ММР играет критическую роль в деградации коллагена и вовлечении в развитие пародонтита. Иммуногистохимическим методом обнаружены повышенные уровни MT1-ММР и TIMP-2 в тканях десны у 12 больных пародонтитом, по сравнению с показателями у 10 здоровых с интактным пародонтом. Морфологические исследования выявили экспрессию MT1-ММР в фибробластах и макрофагах тканей десны, а TIMP-2 – в фибробластах, макрофагах и эпителиальных клетках. По мнению авторов, нарушение баланса экспрессии указанных молекул (медиаторов ремоделирования коллагена) у больных пародонтитом позволяет предполагать их вовлечение в патогенез заболевания.

В десневой жидкости 27 больных хроническим пародонтитом и 15 обследованных с интактным пародонтом изучен уровень ММР-8, TIMP-1, TIMP-2, MPO, общей ММР-9 и различных ее молекулярных форм (87, 92, 130 и 180 kDa). Достоверно более высокие уровни ММР-8, TIMP-1, TIMP-2, MPO и 87 kDa-ММР-9 выявлены у больных пародонтитом по сравнению с контролем; через 3 мес после нехирургического лечения болезни они достоверно снижались. Различий между 2 группами обследованных в показателях общего ММР-9 и его высокомолекулярных форм (180, 130, 92 kDa) не обнаружено.

Изучены эффекты экстрактов [3], полученных УЗ-методом из 3 патогенов, связанных с периапикальным пародонтитом (*P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum*), на активацию ММР-2 и инактивацию

ТИМР-1 и ТИМР-2 в культуре клеток HT1080 из связок пародонта человека. Авторы полагают, что только экстракт из *P. gingivalis* может быть тесно связан с деструкцией апикальной части пародонта путем активации про-MMP-2 (72 kDa) в MMP-2 (66 kDa) и инактивации ТИМР-1 и ТИМР-2.

В экспериментальных исследованиях *in vitro* показано, что MMP-13 может инициировать костную резорбцию и активировать про-MMP-9, при этом обе металлопротеиназы связаны с деструкцией тканей при хроническом пародонтите. Поэтому М. Hernández Ríos et al. (2009) исследовали связь активности MMP-13 и уровня ТИМР-1 в десневой жидкости больных с клиническими признаками прогрессирования хронического пародонтита. Наряду с этим авторы определяли уровни С-концевого телопептида коллагена I типа (ICTP). На основании анализа данных проспективного исследования они выявили достоверное увеличение уровня ICTP и MMP-13 у больных с прогрессированием пародонтита. Кроме того, добавление синтетического ингибитора MMP-13 CL-82198 к эксплантатам тканей десны больных хроническим пародонтитом предотвращало активацию MMP-9. Авторы предполагают участие MMP-13 в деградации тканей пародонта и активации про-MMP-9 в ходе прогрессирования хронического пародонтита.

По данным многоцентрового рандомизированного исследования, субантимикробные дозы доксициклина в комбинации с хирургическим методом ускоряют появление ремиссии у больных хроническим пародонтитом и способствуют ингибированию ранней стадии костной резорбции.

Представлены данные [12] по сравнительному изучению экспрессии генов MMP-1, 2, 9, 13, ТИМР-1, ТИМР-2 методом ПЦР в реальном времени у 10 больных гингивитом, 10 – с генерализованным хроническим пародонтитом, 8 – генерализованным агрессивным пародонтитом и у 10 обследованных с интактным пародонтом. Авторы использовали Вестерн-блот-анализ MMP-2 и MMP-9, чтобы оценить посттранскрипционные особенности регуляции MMP и уровни этих белков. Они не выявили достоверных различий между группами в частоте выявления и уровнях транскриптов MMPs и TIMPs. Отмечена тенденция к повышению активности MMP-2 и MMP-9 в образцах с воспалением. Зимография и Вестерн-блот-анализ показали, что MMP-2 практически отсутствует у больных хроническим пародонтитом. Представленные данные свидетельствуют о комплексной регуляции генной экспрессии MMPs и TIMPs в процессе развития воспаления при гингивите. Кроме того, выявлена значительная вариабельность биологических характеристик даже среди людей с одинаковым статусом пародонта.

Во всех изученных образцах [2] тканей десны, в пародонтальной связке и десневой жидкости (у больных гингивитом, пародонтитом и у здоровых людей) выявлены ТИМР-1, ТИМР-2, активные и

про-MMP-2 и 9, активные MMP-1, 8. Кроме того, обнаружено, что уровень MMP-2-комплексов и коллагенолитических фрагментов был выше в тканях пародонтальной связки и десневой жидкости больных пародонтитом, а уровни ТИМР были ниже в патологически измененных тканях пародонта. Удивительно, но некоторые MMPs были выявлены в больших количествах в тканях здоровой десны и пародонтальной связки. Авторы считают, что высокий уровень активных MMP-2-комплексов и коллагенолитических фрагментов у больных пародонтитом свидетельствует об их связи с деструктивными процессами при данном заболевании.

У больных хроническим пародонтитом обнаружена [6] высокая экспрессия MMP-13; при прогрессировании заболевания наблюдалось дальнейшее повышение уровня маркера и снижение уровня ТИМР-1. Уменьшалось также содержание ТИМР-1 в десневой жидкости у больных пародонтитом, однако после лечения концентрация маркера возрастала.

После длительного (в течение 6 мес) лечения и наблюдения за 33 больными пародонтитом, у которых определяли в слюне исходно (до лечения), через 16 и 28 нед уровень ИЛ1 β , ИЛ8, воспалительный белок макрофагов (MIP)-1 α , MMP-8, OPG и ФНО α , удалось установить, что эти биомаркеры могут быть чувствительными индикаторами ответа на лечение и потенциальными прогностическими факторами в мониторинге пародонтального статуса.

По данным [1, 11], протеолитическая деградация коллагена I типа считается одним из ключевых факторов неконтролируемого разрушения ВКМ пародонта. По мнению [2, 9], коллагенолитическая активность присуща в первую очередь MMP – представителям мультигенного семейства, состоящего из более чем 20 цинкзависимых эндопептидаз, субстратами которых, помимо большинства компонентов ВКМ, могут быть другие протеазы, хемотаксические молекулы, латентные формы факторов роста, растворимые и мембраноассоциированные белки, связывающие факторы роста, цитокины. Активность MMP в межклеточном пространстве специфически подавляется тканевыми ингибиторами (ТИМР) – структурно родственными белками, 3 из которых (ТИМР-1, -2 и -4) секретируются в растворимой форме, а один (ТИМР-3) – связан с ВКМ.

Из всех известных MMP наибольшей протеолитической активностью по отношению к коллагену I типа обладает коллагеназа нейтрофилов или MMP-8, активность которой, по данным экспериментальных и клинических исследований, тесно связана с патологическими изменениями в пародонте [4]. Существенный вклад в коллагенолиз вносят также желатиназы MMP-2 и MMP-9, главным субстратом которых является коллаген IV типа [6]. Широкая субстратная специфичность MMP, включающая и воспалительные цитокины, определяет их участие не только в процессах деструкции пародонта, но и в модуляции воспалительной реакции.

По мнению исследователей [4, 8, 13], достаточно информативным и неинвазивным способом оценки состояния и активности протеолитических процессов в пародонте является исследование ротовой жидкости. Нужно отметить, что на биохимические изменения в ротовой полости могут оказывать влияние не только собственно патологические процессы в пародонте, но и различные сопутствующие заболевания: сердечно-сосудистые [14], сахарный диабет [5], а также внешние факторы – такие, как курение [10] или наличие конструкционных материалов, используемых для реставрации зубов и зубных рядов [7].

В наших собственных исследованиях методом иммуноферментного анализа определена концентрация ММР-2, -8, -9, ИЛ1 β и 6, TIMP-1, TIMP-2 и ФНО α в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом с различными конструкционными материалами, применявшимися для реставрации зубов и зубных рядов.

Обследованы 105 пациентов в возрасте от 18 до 52 лет: 58 – с несъемными металлическими конструкциями при реставрации зубов и зубных рядов (24 мужчины, 34 женщины) и 47 – без металлических конструкций (16 мужчин, 31 женщина). Были выявлены статистически значимые различия в концентрации ММР-9 и ММР-8 в ротовой жидкости между обследованными с интактным пародонтом и при хроническом генерализованном пародонтите с металлическими конструкциями в полости рта (соответственно $p=0,0168$ и $0,0363$). При этом концентрация ММР-9 при интактном пародонте составила $537,65 \pm 144,89$ нг/мл, уровень ММР-8 – $223,23 \pm 93,3$ нг/мл, у пациентов с металлическими конструкциями и воспалительными заболеваниями пародонта – соответственно $863,24 \pm 116,8$ и $329,51 \pm 53,54$ нг/мл.

В группе пациентов без металлических конструкций статистически значимые различия обнаружены между показателями ММР-9 (при интактном пародонте $574,58 \pm 96,35$ нг/мл, у пациентов с пародонтитом – $1478,38 \pm 293,28$ нг/мл; $p=0,0069$), TIMP-2 (соответственно $21,31 \pm 7,05$ и $44,22 \pm 7,17$ нг/мл; $p=0,045$) и ММР-2 ($0,25 \pm 0,13$ и $4,43 \pm 1,37$ нг/мл; $p=0,003$). Остальные параметры были без статистически значимых различий. Выявленная статистически значимая разница между концентрацией ММР-9 и ММР-8 у обследованных с интактным пародонтом и больных хроническим генерализованным пародонтитом подтверждает важную роль ММР-9 в развитии воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта.

При непараметрическом дисперсионном анализе установлены статистически значимые различия в концентрации ММР-2 в ротовой жидкости ($\chi^2=9,98$; $p=0,0188$) между 4 группами пациентов: максимальный показатель зафиксирован у пациентов с пародонтитом без металлических конструкций ($4,43 \pm 1,37$ нг/мл), минимальный ($0,25 \pm 0,13$ нг/

мл) – у обследованных с интактным пародонтом и без металлических конструкций. В группе больных пародонтитом с металлическими конструкциями выявлена та же закономерность: при пародонтите – $1,86 \pm 0,93$ нг/мл, у пациентов с интактным пародонтом – $0,95 \pm 0,75$ нг/мл. В обеих группах наиболее высокие значения зафиксированы у пациентов с пародонтитом, однако у пациентов с наличием металлических конструкций в полости рта разница в концентрации ММР-2 при интактном пародонте и пародонтите была меньше, что, по-видимому, связано с супрессивным действием компонентов металлического сплава на продукцию ММР-2.

При корреляционном анализе полученных данных у обследованных с интактным пародонтом и без металлических конструкций в полости рта выявлена положительная корреляционная зависимость между концентрацией ММР-9 и ММР-8 в ротовой жидкости, показателями ММР-9 и TIMP-1, а также ММР-2 и TIMP-2. Отрицательные корреляции обнаружены между показателями ИЛ6 и ФНО α , а также между ИЛ1 β и PI.

У пациентов с пародонтитом и без металлических конструкций также выявлена достоверная положительная корреляция между концентрацией ММР-9 и ММР-8. Уровень ММР-2 находился в положительной корреляции с возрастом пациентов, а также с индексами PI, РМА, а концентрация ММР-8 отрицательно коррелировала с показателями PI и РМА. По сравнению с группами обследованных с интактным пародонтом наблюдалось снижение корреляционных взаимосвязей между ММР-9 и ММР-8. Наличие корреляций между ММР-2 и возрастом, PI, РМА свидетельствует о тесной взаимосвязи концентрации ММР-2 в ротовой жидкости больных пародонтитом и индексной оценкой состояния тканей пародонта, а также подтверждает опубликованные ранее данные о влиянии возрастных изменений на частоту воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта.

В группе обследованных с интактным пародонтом и наличием металлических конструкций в полости рта выявлена положительная корреляция между показателями ММР-9 и ММР-8 в ротовой жидкости. Уровень ММР-9 коррелировал также с концентрацией ИЛ6, а ММР-8 – с показателями ИЛ6 и ИЛ1 β [15].

У пациентов с пародонтитом и наличием металлических конструкций в полости рта положительные корреляционные взаимосвязи выявлены между значениями ММР-9 в ротовой жидкости и ММР-8, ИЛ6, ИЛ1 β , ФНО α , а также между ММР-8 и концентрацией ИЛ1 β и индексом API. Отрицательная корреляция определялась между значением ММР-8 в ротовой жидкости и глубиной пародонтальных карманов. Обнаружена положительная корреляционная связь между уровнями ИЛ6 и ИЛ1 β в ротовой жидкости и отрицательная – между ИЛ6 и показателем глубины пародонтальных карманов. Положи-

тельные корреляции установлены также между концентрацией ИЛ1 β и ФНО α и между ИЛ1 β и РМА. Концентрация ММР-2 в ротовой жидкости пациентов данной группы положительно коррелировала с показателем PI [15].

Полученные данные свидетельствуют об относительной схожести регуляции процессов продукции ММР, ИЛ и TIMP в ротовой жидкости у пациентов с интактным пародонтом. При хроническом генерализованном пародонтите (как у больных с металлическими конструкциями зубов и зубных рядов, так и без них) выявленные корреляционные коэффициенты свидетельствуют о возникновении каскада биохимических реакций, сопровождающихся активацией продукции цитокинов в ответ на воздействие этиологических факторов. Более выраженная реакция наблюдается в группе пациентов с пародонтитом и металлическими конструкциями: в данной группе в ответ на увеличение ММР-2, -8, -9 возрастает концентрация ИЛ1 β и ИЛ6, что подтверждается выявленными корреляционными зависимостями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование позволяет считать, что ММР-9 в ротовой жидкости может служить маркером хронического генерализованного

пародонтита, что совпадает с мнением других авторов [2]. Результаты наших собственных исследований свидетельствуют о том, что наличие в полости рта пациентов ортопедических конструкций из хромокобальтового или хромоникелевого сплава ведет к увеличению содержания ММР-2, ИЛ1 β и ИЛ6 в ротовой жидкости.

Анализ литературы и результаты собственных исследований позволяют рассматривать ММР как ключевой медиатор повреждения тканей при пародонтите, поскольку имеются доказательства необратимого разрушения соединительной ткани при этом заболевании и факты, свидетельствующие о том, что расщепление коллагена соединительной ткани и органических компонентов костной ткани осуществляется через ММР. По мнению [14], причиной повышения активности ММР в этих условиях считается дисбаланс между ММР и их локально действующими TIMPs.

Таким образом, можно заключить, что вопрос о патогенетическом влиянии ММР на воспалительные и воспалительно-деструктивные заболевания пародонта не решен. Дальнейшее изучение данной проблемы остается важным направлением как для диагностики заболеваний пародонта, так и для повышения эффективности их лечения, профилактики и прогноза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Andonovska B., Dimova C., Panov S. Matrix metalloproteinases (MMP-1, -8, -13) in chronic periapical lesions. *Vojnosanit. Pregl.* 2008; 65 (12): 882–886.
- Bildt M., Bloemen M., Kuijpers-Jagtman A., Van den Hoff J. Collagenolytic fragments and active gelatinase complexes in periodontitis. *J. Periodontol.* 2008; 79 (9): 1704–11.
- Carneiro E., Menezes R., Garlet G. et al. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2009; 107 (1): 127–32.
- Christodoulides N., Floriano P., Miller C. et al. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1098: 411–428.
- Costa P., Trevisan G., Macedo G. et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J. Periodontol.* 2010; 81 (3): 384–91.
- deQueiroz A., Taba M., O'Connell P. et al. Inflammation markers in healthy and periodontitis patients: a preliminary data screening. *Braz. Dent. J.* 2008; 19 (1): 3–8.
- de Souza A., Gerlach R., Line S. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent. Mater.* 2000; 16 (2): 103–8.
- Christodoulides N., Floriano P., Miller C. et al. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1098: 411–28.
- Gursoy U., Kononen E., Pradhan-Palkhe P. et al. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2010; 37 (6): 487–93.
- Heikkinen A., Sorsa T., Pitkaniemi J. et al. Smoking affects diagnostic salivary periodontal disease biomarker levels in adolescents. *J. Periodontol.* 2010; 81 (9): 1299–1307.
- Isaza-Guzman D., Arias-Osorio C., Martinez-Pabon M., Tobon-Arroyave S. Salivary levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1: a pilot study about the relationship with periodontal status and MMP-9(-1562C/T) gene promoter polymorphism. *Arch. Oral Biol.* 2011; 56 (4): 401–11.
- Kumar M., Vamsi G., Sriprya R., Sehgal P. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J. Periodontol.* 2006; 77 (11): 1803–8.
- Rai B., Kharb S., Jain R., Anand S.C. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *J. Oral Sci.* 2008; 50 (1): 53–6.
- Sorsa T., Tervahartiala T., Leppilähti J. et al. Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. *Pharmacol. Res.* 2011; 63 (2): 108–13.
- Кушлинский Н.Е., Соловых Е.А., Караогланова Т.Б., Баяр У., Герштейн Е.С., Трошин А.А., Костылева О.И., Гринин В.М., Максимовская Л.Н., Янушевич О.О. Содержание матриксных металлопротеиназ 8-го и 9-го типа в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом. *Бюлл. Экспер. биол. мед.* 2011; 152 (8): 201–6. (Kushlinskij N.E., Solovyh E.A., Karaoglanova T.B., Bajar U., Gershtein E.S. Content of matrix metalloproteinases 8-th and 9-th type in the oral fluid of patients with chronic generalized periodontitis. *Bjulleten 'j eksperimental'noj biologii i mediciny.* 2011; 152 (8): 201–6 (in Russian))

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ В АДИПОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Е.В. Шахристова, кандидат медицинских наук, **Е.А. Степовая**, доктор медицинских наук, профессор,
В.В. Иванов, кандидат биологических наук, доцент, **О.Л. Носарева**, кандидат медицинских наук,
А.Н. Дзюман, кандидат медицинских наук, доцент, **Н.В. Рязанцева**, доктор медицинских наук,
профессор, **В.В. Новицкий**, академик РАМН, профессор

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Российская Федерация, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

E-mail: shaxristova@yandex.ru

Введение. Согласно современным представлениям, в механизмах возникновения сахарного диабета типа 1 и 2 и развития их осложнений важную роль играет окислительный стресс, формирование которого сопровождается нарушением поглощения глюкозы жировой тканью, снижением секреции инсулина панкреатическими В-клетками, дисрегуляцией выработки адипокинов, развитием инсулинорезистентности с последующим возникновением метаболического синдрома.

Цель исследования. Изучение состояния свободнорадикального окисления белков и липидов в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани при окислительном стрессе.

Материал и методы. Из эпидидимальной жировой ткани крыс изолировали адипоциты с помощью коллагеназы. Жировые клетки инкубировали с аллоксаном в концентрации 0,5–10,0 ммоль/л. Определяли содержание в адипоцитах активных форм кислорода, гидроперекисей липидов, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой; карбонильных производных белков, битирозина и окисленного триптофана.

Результаты. В экспериментах *in vitro* в адипоцитах развивался окислительный стресс на фоне добавления аллоксана (0,5–10,0 ммоль/л) в среду инкубации клеток, который сопровождался увеличением в жировых клетках концентрации активных форм кислорода, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, гидроперекисей липидов, карбонильных производных белков, битирозина и окисленного триптофана.

Заключение. В адипоцитах повышенная генерация активных форм кислорода и увеличение интенсивности окислительной модификации макромолекул приводила к изменению их физико-химического состояния и нарушению функций, что в конечном итоге усугубляет течение сахарного диабета и способствует развитию осложнений.

Ключевые слова: окислительный стресс, карбонильные производные белков, битирозин, окисленный триптофан, перекисное окисление липидов, адипоциты, аллоксан

FREE RADICAL OXIDATION OF PROTEINS AND LIPIDS IN ADIPOCYTES UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS

E.V. Shakhristova, E.A. Stepovaya, V.V. Ivanov, O.L. Nosareva, A.N. Dzuman, N.V. Ryazantseva, V.V. Novitskiy
Siberian State Medical University, Russian Federation, 634050, Tomsk, Moscow trakt, 2

Introduction. According to the current understanding, oxidative stress plays a key role in the mechanisms of diabetes mellitus of types 1 and 2 emergence and development of its complications; formation of oxidative stress is accompanied by defective uptake of glucose by adipose tissue, reduction of insulin secretion by pancreatic B-cells, adipokines production dysregulation, progression of insulin resistance, followed by the development of metabolic syndrome.

The aim of the study. Investigate the status of oxidative modification of proteins and lipids in adipocyte epididymal adipose tissue in oxidative stress.

Methods. Adipocytes were isolated from the epididymal adipose tissue of rats using collagenase. The fat cells were incubated with alloxan in a concentration of 0,5–10,0 mmol/l. The content of active oxygen forms, lipid hydroperoxides, products which react with thiobarbituric acid, carbonyl derivatives of proteins, bityrosine and oxidized tryptophan in adipocytes was determined.

Results. During experiments *in vitro*, the oxidative stress developed in adipocytes of epididymal adipose tissue when adding alloxan (0,5–10 mM) to cell incubation medium. It was accompanied by concentration increase of oxygen active forms, products, reacting with thiobarbituric acid, hydroperoxides lipids, carbonyl derived proteins, bityrosine and oxidized tryptophan.

Conclusions. In adipocyte increased generation of reactive oxygen and an increase in the intensity of oxidative modification of macromolecules leads to changes in their physical and chemical condition and infringement of functions that ultimately exacerbates diabetes and contributes to the development of complications.

Key words: oxidative stress, carbonyl derived protein, bityrosine, oxidated tryptophan, lipid peroxidation, adipocyte, alloxan

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс лежит в основе патогенеза многих патологических процессов и состояний, в том числе сахарного диабета типа 1 (СД1). Индукция свободнорадикального окисления может приводить к изменению белково-липидных взаимодействий в биологических мембранах, повреждению нуклеиновых кислот, окислительной модификации белковых молекул и липидов в клетках-мишенях, в частности, в адипоцитах [5, 10, 11]. Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в условиях окислительного стресса приводит к увеличению продукции гидроперекисей липидов, токсичных альдегидов, способных индуцировать повреждения протеинов. Окислительная модификация вызывает изменения структурной организации белков, их агрегацию и денатурацию, приводя к нарушению или исчезновению функциональной активности протеинов (каталитической, регуляторной, транспортной, рецепторной и др.), и может индуцировать гибель клетки [5, 10].

Одним из химических агентов, применяемым в моделировании СД1, является аллоксан. В клетке аллоксан подвергается окислению с образованием диалуровой кислоты, которая вступает в редокс-цикл, в результате чего генерируется супероксидный анион-радикал. Реакция между аллоксаном и диалуровой кислотой приводит к образованию промежуточного радикала аллоксана [19, 22], способного восстанавливаться глутатионом. Супероксидный анион-радикал вызывает высвобождение Fe^{3+} из ферритина и способствует его восстановлению в Fe^{2+} [22]. К тому же сам радикал аллоксана может восстанавливать Fe^{3+} до Fe^{2+} . Супероксидный анион-радикал способен дисмутировать до пероксида водорода спонтанно или под действием супероксиддисмутазы, в результате чего взаимодействие образовавшегося пероксида водорода и Fe^{2+} приводит к продукции гидроксильного анион-радикала. Генерируемые под действием аллоксана активные формы кислорода (АФК) запускают свободнорадикальное окисление макромолекул в клетках [19, 22].

Таким образом, с учетом прооксидантных свойств аллоксана, его применения в моделировании экспериментального диабета и важной роли окислительного стресса в патогенезе СД и развитии его осложнений, мы использовали аллоксан как индуктор свободнорадикального окисления в адипоцитах. В настоящее время процессы свободнорадикального повреждения макромолекул (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот) в жировой ткани при окислительном стрессе исследованы недостаточно. В экспериментах *in vitro* подбор концентрации аллоксана, прооксидантные эффекты которой были бы сопоставимы с эффектами *in vivo* у крыс с аллоксановым диабетом, позволил бы в дальнейшем использовать ее для изучения молекулярных механизмов окислительной модификации макромолекул при СД в условиях индуцированного окислительного стресса. Цель на-

стоящего исследования — изучение в экспериментах *in vitro* влияния различных концентраций аллоксана на интенсивность окислительной модификации белков и липидов в изолированных адипоцитах эпидидимальной жировой ткани крыс в условиях окислительного стресса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на адипоцитах, изолированных из эпидидимальной жировой ткани 16 крыс-самцов Вистар массой тела 210 ± 25 г. Животные были получены из ОАО «Питомник «Рассвет» (Томск). Эксперименты проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977) и Федеральному закону «О защите животных от жестокого обращения» от 01.09.1997, а также с соблюдением Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 г. Крыс усыпляли CO_2 -асфиксией. Адипоциты из эпидидимальной жировой ткани выделяли по методу M. Rodbell [20] с использованием коллагеназы (Sigma Aldrich, США). Концентрацию адипоцитов в суспензии стандартизировали с помощью разведения буфером до $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Жизнеспособность выделенных клеток оценивали микроскопическим методом с трипановым синим (Serva, США). Доля живых клеток составляла не менее 95%.

В качестве индуктора окислительного стресса использовали аллоксан. Адипоциты в концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл инкубировали в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония) с аллоксаном в конечных концентрациях 0,5; 1,0; 5,0 и 10,0 ммоль/л [18] в течение 3 ч в Krebs-Рингер-буфере с добавлением 5 ммоль/л глюкозы и 2% бычьего сывороточного альбумина. После инкубации клетки отделяли центрифугированием в течение 1 мин при 200 g на центрифуге Biofuge Primo R (Thermo, Великобритания).

О развитии окислительного стресса в адипоцитах судили по содержанию гидроперекисей липидов, определяемых FOX-2-методом [17], и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) флюоресцентным методом [23]. Для оценки интенсивности продукции АФК в адипоцитах клетки предварительно инкубировали с флюоресцентным зондом — 2,7-дихлорфлюоресцеиндиацетатом в концентрации 5 мкмоль/л (Sigma Aldrich, США). Адипоциты отмывали 3-кратным центрифугированием (200 g, 1 мин) и через 3 ч после добавления аллоксана измеряли интенсивность флюоресценции на Rotor Gene 6000 (Германия); максимум возбуждения составлял 470 нм, максимум испускания 510 нм. Результат представляли в единицах флюоресценции на $1 \cdot 10^6$ адипоцитов. Визуализацию интенсивности флюоресценции проводили на микроскопе Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия; объектив 20; диафрагма 6,3; выдержка 1/6) с исполь-

зованием светофильтров: $\lambda=500$ нм – возбуждение; $\lambda=520$ нм – испускание.

Интенсивность окислительной модификации протеинов в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани оценивали по содержанию карбонильных производных белков методом, основанным на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали спектрофотометрически [1]. Содержание окисленного триптофана (по снижению флюоресценции его восстановленной формы) и образование битирозиновых сшивок определяли методом, описанным К. Davies [14] в модификации Э.М. Бекмана и соавт. [2].

Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась критерием Шапиро–Вилка. Выборки не подчинялись нормальному закону распределения на уровне значимости $p<0,001$, поэтому полученные результаты были представлены в таблицах в виде медианы (Me), 1-го и 3-го квартилей (Q_1-Q_3). Достоверность различий выборок

оценивали с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса для малых групп. Различия считали достоверными при уровне значимости $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах *in vitro* аллоксан в концентрациях, близких к его диабетогенным дозам (0,5–10,0 мМ), вызывал активацию свободнорадикального окисления в адипоцитах, изолированных из эпидидимальной жировой ткани крыс. Проникая в цитоплазму адипоцитов в виде ацетилового эфира, 2,7-дихлорфлюоресцеиндиацетат деэтерифицируется под действием эстераз, что исключает возможность его транспорта из клеток и приобретает способность флюоресцировать после взаимодействия с перекисными группировками (рис. 1). В адипоцитах, нагруженных 2,7-дихлорфлюоресцеиндиацетатом, регистрировалось увеличение интенсивности флюоресценции с возрастанием концентрации аллоксана в инкубационной среде, свидетельствуя об увеличении внутриклеточной продукции АФК в адипоцитах (табл. 1).

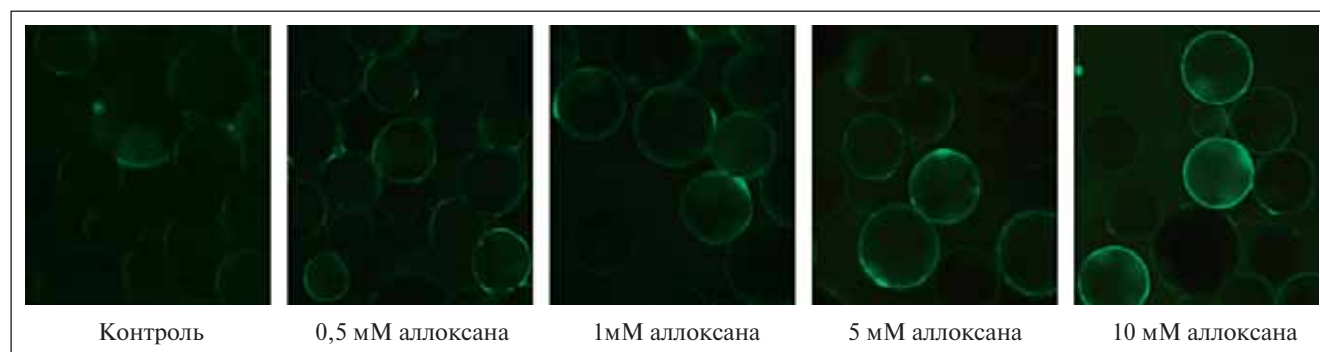


Рис. 1. Интенсивность флюоресценции АФК в адипоцитах, нагруженных 2,7-дихлорфлюоресцеиндиацетатом, при действии аллоксана

Таблица 1

КОНЦЕНТРАЦИЯ ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ, ТБК-АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ И АФК В ИЗОЛИРОВАННЫХ АДИПОЦИТАХ ЭПИДИДИМАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ АЛЛОКСАНА В РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ (МЕ (Q_1-Q_3))

Показатель	Контроль (интактные адипоциты) (n=8)	Адипоциты, инкубированные с аллоксаном (n=8)			
		0,5 мМ	1,0 мМ	5,0 мМ	10,0 мМ
Гидроперекиси липидов, нмоль/10 ⁶ клеток p	5,28 (4,85–5,80)	5,89 (5,23–6,55)	8,23 (7,82–8,53) <0,05	9,09 (8,58–9,25) <0,01	9,88 (9,76–10,11) <0,01
ТБК-активные продукты, нмоль/10 ⁶ клеток p	0,84 (0,80–0,91)	0,98 (0,76–1,02)	1,72 (1,64–1,85) <0,05	2,51 (2,43–2,80) <0,01	5,23 (5,08–5,76) <0,01
АФК, единицы флюоресценции/10 ⁶ клеток p	3,7 (3,2–4,3)	4,5 (4,1–4,8)	5,4 (4,9–5,9) <0,05	8,5 (7,6–8,9) <0,01	15,9 (12,4–19,5) <0,01

Примечание. p – уровень значимости различий, рассчитанный относительно контрольных величин (здесь и в табл. 2).

В жировых клетках содержится высокая концентрация субстратов, подверженных свободно-радикальному окислению [8, 16]. Окислительной модификации в процессе ПОЛ подвержены главным образом полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) фосфолипидов, входящих в состав клеточных мембран [3, 11]. Развитие цепных радикальных окислительных процессов в мембранах сопровождается образованием пероксидных и алкоксильных радикалов, что в дальнейшем приводит к продукции гидроперекисей липидов [8, 11]. В наших исследованиях повышенная генерация АФК в жировых клетках при добавлении аллоксана в инкубационную среду приводила к активации ПОЛ адипоцитов, о чем свидетельствовало повышение уровня его промежуточных и вторичных продуктов – гидроперекисей липидов и ТБК-активных продуктов (см. табл. 1).

Окисление липидов и образование перекисей приводят к увеличению гидрофильности молекул. В результате окисления появляются молекулы, содержащие сопряженные двойные связи (диеновые конъюгаты), а также токсичные альдегиды (рис. 2). Так, главный продукт окисления 1,6-арахидиновой кислоты, 4-гидрокси-2-ноненаль оказывает цитотоксическое и мутагенное действие и может сшивать белковые молекулы, вызывая нарушение структуры и инактивацию ферментов [4, 16]. 4-Гидрокси-2-ноненаль способен вступать в реакции конъюгации с восстановленной формой глутатиона спонтанно или под действием фермента глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18), обладающей высоким сродством к альдегиду [4, 16]. Комплекс 4-гидрокси-2-ноненаль-глутатион транспортируется из клеток при участии АТФ-зависимой протонной системы [13]. 4-Гидрокси-2-ноненаль, малоновый диальдегид и другие алкены [4, 16],

реагируя с сульфгидрильными группами белков и низкомолекулярных соединений – таких, как цистеин, глутатион, образуют стабильные тиоэфирные аддукты. Это приводит к модификации белков и появлению их карбонильных производных [7, 15] (см. рис. 2).

В адипоцитах, инкубированных с аллоксаном, нами выявлено повышение уровня окислительной модификации белков. При длине волны 274 нм регистрируются альдегидфенилгидразоны – ранние маркеры окислительной деструкции белков, при 363 нм – кетондинитрофенилгидразоны, являющиеся маркерами поздней деструкции белков. Так, на фоне развития окислительного стресса с возрастанием концентрации аллоксана (0,5–10,0 мМ) в среде инкубации изолированных адипоцитов выявлено увеличение ($p < 0,01$) карбонильных производных при длине волн 274 и 363 нм по сравнению с уровнем окислительной модификации белков в интактных клетках (табл. 2). Увеличение окислительной модификации белков, наряду с накоплением продуктов липидной пероксидации, является ранним маркером окислительного повреждения адипоцитов, при котором белки выступают в роли эффективных ловушек генерируемых активных форм кислорода [5].

Окислительная модификация белковых молекул с образованием карбонильных производных – необратимый процесс, репарации могут подвергаться лишь окисленные SH-группы протеинов [12]. Белки, подвергшиеся карбонилированию, образуют агрегаты, а также фрагментируются. Продукты свободнорадикального окисления белков потенцируют окислительные повреждения ДНК *in vitro* [5, 6, 21]. Окислительная модификация белков также приводит к снижению активности ферментов в цепи переносчиков электронов, АТФ-синтазы, нарушает из-

Таблица 2

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ
В ИЗОЛИРОВАННЫХ АДИПОЦИТАХ ЭПИДИДИМАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС
ПРИ ДЕЙСТВИИ АЛЛОКСАНА В РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ (Ме (Q₁–Q₃))**

Показатель	Контроль (интактные адипоциты) (n=8)	Адипоциты, инкубированные с аллоксаном (n=8)			
		0,5 мМ	1,0 мМ	5,0 мМ	10,0 мМ
Карбонильные производные белков, у.е./мг белка					
λ=274 нм	6,2 (5,7–6,3)	6,2 (5,2–6,8)	13,9 (12,9–17,3)	21,4 (21,2–22,5)	24,6 (22,2–27,2)
p			<0,01	<0,01	<0,01
λ=363 нм	12,1 (12,1–13,8)	16,4 (14,2–17,5)	17,1 (15,1–18,4)	25,2 (23,9–25,4)	28,0 (24,3–28,1)
p		<0,05	<0,01	<0,01	<0,01
Битирозин, у.е./мг белка	0,99 (0,92–1,06)	1,10 (1,02–1,18)	1,19 (1,11–1,27)	1,48 (1,32–1,64)	1,68 (1,56–1,80)
p			<0,01	<0,01	<0,01
Триптофан, у.е./мг белка	4,31 (4,26–4,56)	4,25 (4,12–4,41)	3,77 (3,58–4,04)	3,90 (3,30–3,91)	3,41 (3,13–3,47)
p			<0,05	<0,05	<0,01

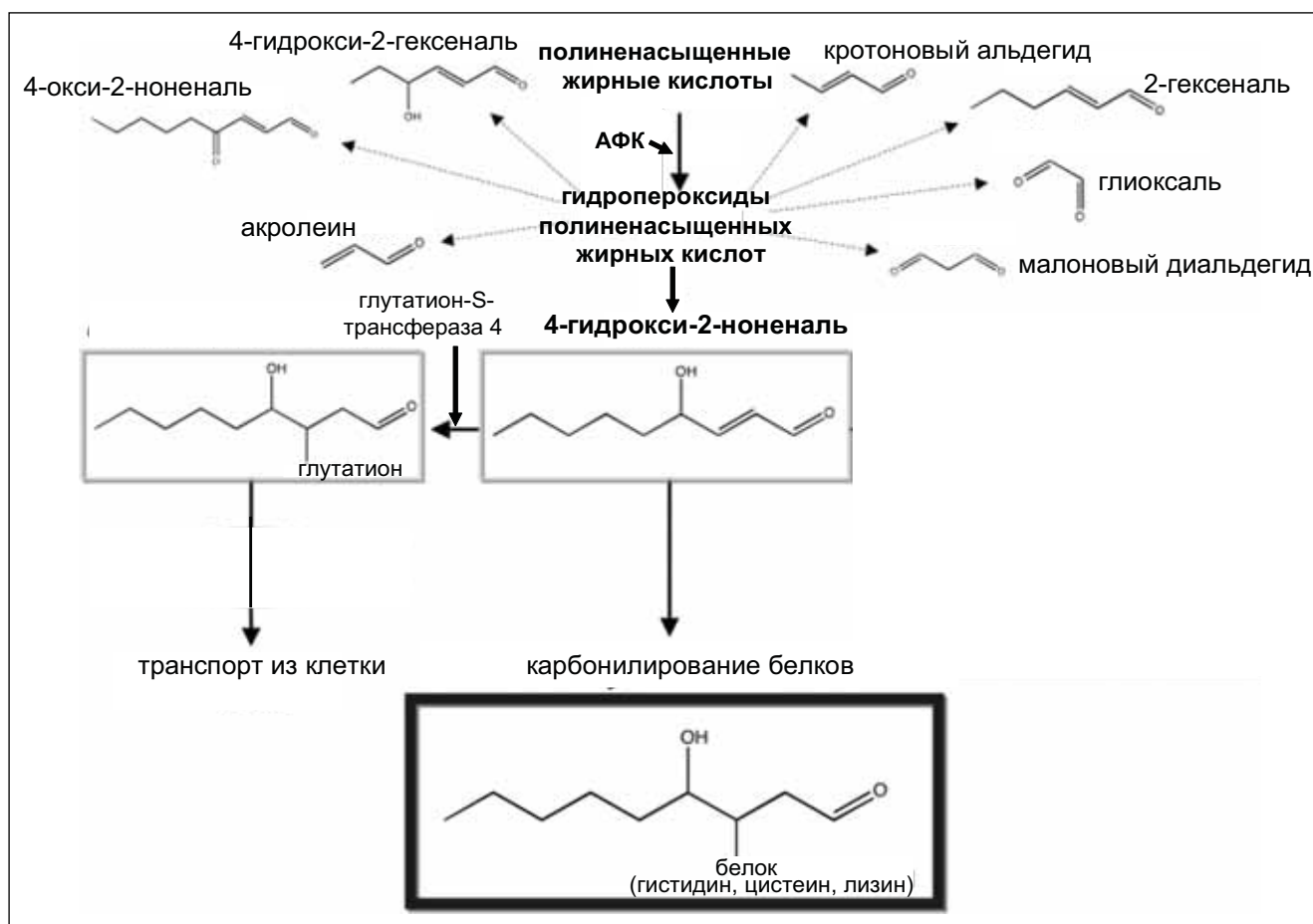


Рис. 2. Образование карбонильных производных белков под действием продуктов ПОЛ [16]

бирательность транспортных белков [3]. Изменение редокс-потенциала митохондриальной мембраны может вызывать дисфункцию каскада дыхательной цепи и, следовательно, дисбаланс энергетических процессов в клетке. Таким образом, окисленные протеины являются не только маркерами, но и активными участниками свободнорадикального повреждения клетки [9, 10, 13].

Химическая модификация полипептидной цепи проявляется в том числе и в изменении функциональных групп аминокислотных остатков белков. Все аминокислотные остатки могут подвергаться окислению АФК, однако продукты их окисления изучены далеко не полностью [5]. В противоположность карбонильным производным белков некоторые продукты окисления аминокислотных остатков, в частности, триптофана, фенилаланина и тирозина, остаются стабильными даже после кислотного гидролиза [12]. Так, в экспериментах *in vitro* нами обнаружено увеличение содержания битирозина и окисленного триптофана в адипоцитах на фоне возрастания концентрации прооксиданта в среде инкубации клеток (см. табл. 2).

Окисление триптофана сопряжено с образованием ковалентных сшивок, приводящих к агрегации белков [5]. Образующиеся при окислении ти-

розина радикалы могут взаимодействовать между собой, формируя битирозиновые межмолекулярные сшивки в белках. Битирозин стабилен в присутствии различных протеаз, устойчив при кислотном гидролизе, что создает предпосылки для его накопления в организме и участия в патологических процессах. Наличие битирозиновых производных считается надежным маркером АФК индуцированных повреждений белков [5, 10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индукция окислительного стресса в адипоцитах под действием аллоксана (0,5–10,0 мМ) приводила к увеличению генерации АФК, повышению уровня продуктов липидной перекисидации и окислительной модификации белков. Патологическое влияние свободнорадикального окисления на белки связано с образованием межмолекулярных сшивок, изменением физико-химического состояния протеинов, нарушением их функций, что в конечном итоге усугубляет течение СД и способствует развитию осложнений.

В проведенных ранее нами исследованиях [7, 8] было установлено, что значения показателей окислительной и антиоксидантной систем в экспериментах *in vivo* на крысах с индуцированным СД со-

ответствуют таковым в опытах *in vitro* при действии аллоксана на адипоциты в концентрации 5,0 мМ. Таким образом, для проведения исследований, направленных на установление молекулярных механизмов окислительной модификации макромолекул при СД, необходимо использовать концентрацию 5,0 мМ аллоксана как наиболее адекватную для воспроизведения *in vitro* окислительного стресса, сравнимого с опытами *in vivo*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» (соглашение №8302), а также в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (договор №16.120.11.614-НШ).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб., ИКФ «Фолиант», 2000; 104 с. (Arutjunjan A.V., Dubinina E.E., Zybinina N.N. Evaluation methods of free radical oxidation and antioxidant protection of the organism. SPb.: IKF «Foliant», 2000; pp. 104 (in Russian))
- Бекман Э.М., Баранова О.А., Губарева Е.В. Оценка устойчивости к окислительному стрессу плазмы крови по уровню окисляемости белков и липидов при металлокатализируемом окислении. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006; 142 (9): 268–72. (Bekman Je.M., Baranova O.A., Gubareva E.V. Estimation of the resistance to oxidative stress blood plasma level of oxidation of proteins and lipids in metallkatalizyaying oxidation. Bull. Exp. Biol. Med. 2006; 142 (9): 268–72 (in Russian))
- Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский образовательный журнал. 2000; 6 (12): 13–9. (Vladimirov Ju.A. Free radicals in biological systems. Soros educational journal. 2000; 6 (12): 13–9 (in Russian))
- Дубинина Е.Е., Дадали В.А. 4-гидрокси-транс-2-ноненаль в функциональной активности клеток. Биохимия. 2010; 75 (9): 1189–211. (Dubinina E.E., Dadali V.A. 4-gidrokxi-trans-2-nonenal infunfunctional activity of the cells. Biochemistry. 2010; 75 (9): 1189–211 (in Russian))
- Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Медицинская пресса, 2006; 400 с. (Dubinina E.E. Products of metabolism of oxygen in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical-biochemical aspects. SPb.: Medical press, 2006 (in Russian))
- Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков. Успехи современной биологии. 1993; 113: 71–81. (Dubinina E.E., Shugalej I.V. Oxidative modification of proteins. Biology Bulletin Reviews. 1993; 113: 71–81 (in Russian))
- Иванов В.В., Шахристов Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. Влияние аллоксана на систему глутатиона и окислительную модификацию белков в адипоцитах при экспериментальном диабете. Бюллетень сибирской медицины. 2011; 10 (3): 44–7. (Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Zhavoronok T.V., Novitsky V.V. Influence alloxan the glutathione system and oxidative modification of proteins in adipocytes in experimental diabetes. Bulletin of Siberian medicine. 2011; 10 (3): 44–7 (in Russian))
- Иванов В.В., Шахристов Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. Перекисное окисление липидов и система глутатиона в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом. Бюллетень СО РАМН. 2010; 30 (6): 101–4. (Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Zhavoronok T.V., Novitsky V.V. Lipid peroxidation and the glutathione system in adipose tissue of rats with alloxan diabetes. Bulletin of the Russian Academy of medical Sciences. 2010; 30 (6): 101–4 (in Russian))
- Иванов В.В., Шахристов Е.В., Степовая Е.А., Федорова Т.С., Новицкий В.В. Адипоцит. Сахарный диабет. Окислительный стресс. Томск. Печатная мануфактура. 2013; 12 с. (Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Fedorova T.S., Novitsky V.V. Adipocyte. Diabetes mellitus. Oxidative stress. Tomsk: Printing manufactory. 2013 (in Russian))
- Луцка В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма. Биохимия. 2007; 72 (8): 995–1015. (Lushhak V.I. Free radical oxidation of proteins and its connection with the functional state of the body. Biochemistry. 2007; 72 (8): 995–1015 (in Russian))
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: фирма «Слово», 2006; 556 с. (Menshchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar I.A., Krugovyh N.F., Trufakin V.A. Oxidative stress. Prooxidant and antioxidant. M.: firm «Slovo», 2006; pp. 556 (in Russian))
- Berlett B., Stadtman E. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. for Biochemistry. 1997; 272 (33): 20313–6.
- Curtis J., Grimsrud P., Wright W. Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. Diabetes. 2010; 59 (5): 1132–42.
- Davies K. Protein damage and degradation by oxygen radicals. 1. General aspects. J. Biol. Chem. 1987; 262: 9895–901.
- Doorn J., Petersen D. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. Chem. Biol. Interact. 2003; 143 (1): 93–100.
- Grimsrud P., Xie H., Griffin T. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. J. Biol. Chem. 2008; 283 (32): 21837–41.
- Hermes-Lima M., Willmore W., Storey K. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. FreeRadic. Biol. Med. 1995; 19: 271–80.
- Kandulska K., Szkudelski T., Nogowski L. Lipolysis induced by alloxan in rat adipocytes is not inhibited by insulin. Physiol. Res. 1999; 48: 113–7.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008; 51 (2): 216–26.
- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. Biol. Chem. 1964; 239: 375–80.
- Stadtman E., Levine R. Protein oxidation. Ann N. Y. Acad. Sci. 2000; 899: 191–208.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan end streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol. Res. 2001; 50: 536–46.
- Yagi Y., Matsuda M., Yagi K. Formation of lipoperoxide in isolated sciatic nerve by chinoform-ferric chelate. Experientia. 1976; 32 (7): 905–6.

