

ВЕСТНИК РГМУ

4, 2015 | VESTNIKRGMU.RU | ISSN 2070-7320



МОЛЕКУЛЯРНОЕ БАРКОДИРОВАНИЕ **ОБЗОР**

СТАТЬЯ Роль гена *IL 10* в развитии псориаза

Выявлен полиморфный локус *IL 10* — маркер пониженного риска развития псориаза

15

МЕТОД Ранняя диагностика воспаления

Детектор на основе оценки состава нитрозосоединений плазмы крови человека

58

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Научный медицинский журнал Российского национального
исследовательского медицинского университета
имени Н. И. Пирогова

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Scientific Medical Journal of Pirogov Russian National
Research Medical University

Главный редактор

Editor-in-chief

Денис Ребриков, д. б. н.

Denis Rebrikov, DSc

Заместитель главного редактора

Deputy editor-in-chief

Александр Эттингер, д. м. н.

Alexander Oettinger, DSc

Ведущий редактор

Senior editor

Ирина Бабенкова, к. м. н.

Irina Babenkova, PhD

Редакторы

Editors

Екатерина Малеванная

Ekaterina Malevannaya

Лилия Егорова

Liliya Egorova

Корректор

Proof-reader

Виталия Чагина

Vitaliya Chagina

Переводчик

Translator

Екатерина Третьякова

Ekaterina Tretiyakova

Дизайн и верстка

Design and layout

Марина Дороница

Marina Doronina

Редакционный менеджер

Editorial manager

Елена Куликова

Elena Kulikova

Журнал входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Адрес редакции: 117997, Москва,

ул. Островитянова, д. 1.

Для подачи публикаций: editor@vestnikrgmu.ru

По вопросам сотрудничества: manager@vestnikrgmu.ru

Редакционная коллегия

Editorial board

Г. П. Арутюнов, д. м. н.

G. P. Arutyunov, DSc

Ю. В. Балякин, д. м. н.

Yu. V. Balyakin, DSc

М. Р. Богомилский*, д. м. н.

M. R. Bogomilskiy, DSc

Л. В. Ганковская, д. м. н.

L. V. Gankovskaya, DSc

Ю. Э. Доброхотова, д. м. н.

Yu. E. Dobrokhotova, DSc

Л. И. Ильенко, д. м. н.

L. I. Ilyenko, DSc

О. А. Кисляк, д. м. н.

O. A. Kislyak, DSc

В. И. Лапочкин, д. м. н.

V. I. Lapochkin, DSc

А. В. Матюшкин, д. м. н.

A. V. Matyushkin, DSc

А. Г. Пашинян, д. м. н.

A. G. Pashinyan, DSc

* член-корреспондент РАН

Редакционный совет

Editorial council

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н.

E. I. Gusev, member of RAS, DSc

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н.

I. I. Zatevakhin, member of RAS, DSc

Ю. Ф. Исаков, академик РАН, д. м. н.

Yu. F. Isakov, member of RAS, DSc

Ю. М. Лопухин, академик РАН, д. м. н.

Yu. M. Lopukhin, member of RAS, DSc

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н.

G. M. Savelyeva, member of RAS, DSc

С. Б. Петерсон, д. м. н.

S. B. Peterson, DSc

Н. В. Полунина*, д. м. н.

N. V. Polunina, DSc

Б. А. Поляев, д. м. н.

B. A. Polyayev, DSc

Г. В. Порядин*, д. м. н.

G. V. Poryadin, DSc

Н. Г. Потешкина, д. м. н.

N. G. Poteshkina, DSc

С. В. Свиридов, д. м. н.

S. V. Sviridov, DSc

А. В. Скороглядов, д. м. н.

A. V. Skoroglyadov, DSc

В. А. Стаханов, д. м. н.

V. A. Stakhanov, DSc

Е. В. Старых, д. м. н.

E. V. Starykh, DSc

И. З. Шишков, д. ф. н.

I. Z. Shishkov, DSc

Ю. К. Скрипкин, академик РАН, д. м. н.

Yu. K. Skripkin, member of RAS, DSc

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н.

V. I. Starodubov, member of RAS, DSc

Г. И. Сторожаков, академик РАН, д. м. н.

G. I. Storozhakov, member of RAS, DSc

А. И. Федин, д. м. н.

A. I. Fedin, DSc



Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International

www.creativecommons.org

© РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Подписной индекс по каталогу «Роспечать»: 46826

Номер подписан в печать 26.11.2015 г.

Отпечатано в типографии «ПРЕМИУМ ПРИНТ»

www.premium-print.ru

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

| | | |
|---------------|---|-----------|
| ОБЗОР | Количественный и безошибочный анализ данных массивированного секвенирования с использованием молекулярного баркодирования Е. С. Егоров, М. А. Израельсон, С. А. Касацкая, Д. М. Чудаков, С. А. Лукьянов Qualitative error-free analysis of mass sequencing data using molecular barcoding Egorov ES, Israelson MA, Kasatskaya SA, Chudakov DM, Lukyanov SA | 4 |
| СТАТЬЯ | Изучение роли <i>Prevotella intermedia</i> в развитии хронического пародонтита методом полимеразной цепной реакции в реальном времени А. В. Шибяева, Н. К. Аймадинова, Е. В. Трубникова, Т. В. Кузнецова, О. А. Зорина, Ю. К. Кудыкина, А. Б. Шевелев A study of the role of <i>Prevotella intermedia</i> in the development of chronic periodontitis using real-time polymerase chain reaction Shibaeva AV, Aymadinova NK, Trubnikova EV, Kuznetsova TV, Zorina OA, Kudykina YK, Shevelev A | 10 |
| СТАТЬЯ | Влияние полиморфизма гена <i>IL10</i> на манифестацию и тяжесть течения псориаза Э. С. Галимова, Э. К. Хуснутдинова The impact of <i>IL10</i> gene polymorphism on manifestations and severity of psoriasis Galimova ES, Khusnutdinova EK | 15 |
| СТАТЬЯ | Изменение показателей врожденного иммунитета при очаговой склеродермии Л. В. Ганковская, О. А. Свитич, И. В. Хамаганова, Д. М. Гюльалиев A change in innate immune factors expression in localized scleroderma Gankovskaya LV, Svitich OA, Khamaganova IV, Gyulaliev DM | 20 |
| СТАТЬЯ | Особенности врожденного иммунитета у здоровых детей и у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций М. Р. Богомильский, О. А. Свитич, В. А. Ганковский, И. В. Рахманова Innate immunity features in healthy children and in children with adenoid hypertrophy Bogomilsky MR, Svitich OA, Gankovskiy VA, Rakhmanova IV | 24 |
| СТАТЬЯ | Ассоциация полиморфного локуса гена <i>IL10</i> с развитием персистирующего олигоарткулярного варианта ювенильного идиопатического артрита Л. Ш. Назарова, К. В. Данилко, В. А. Малиевский, Т. В. Викторова Association of the <i>IL10</i> gene polymorphism with the development of persistent oligoarticular juvenile idiopathic arthritis Nazarova LSh, Daniilko KV, Malievsky VA, Viktorova TV | 28 |
| СТАТЬЯ | Высокая частота носительства в российской популяции мутаций гена <i>CFTR</i>, ассоциированных с муковисцидозом, и мутаций гена <i>PAH</i>, ассоциированных с фенилкетонурией Д. Д. Абрамов, В. В. Кадочникова, Е. Г. Якимова, М. В. Белоусова, А. В. Маерле, И. В. Сергеев, А. А. Рагимов, А. Е. Донников, Д. Ю. Трофимов High carrier frequency of <i>CFTR</i> gene mutations associated with cystic fibrosis, and <i>PAH</i> gene mutations associated with phenylketonuria in Russian population Abramov DD, Kadochnikova VV, Yakimova EG, Belousova MV, Maerle AV, Sergeev IV, Ragimov AA, Donnikov AE, Trofimov DYU | 32 |
| СТАТЬЯ | Ассоциация активности изофермента <i>CYP2D6</i> с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю Д. А. Сычев, М. С. Застрожин, В. В. Смирнов, Л. М. Савченко, Е. А. Брюн, Ю. Ш. Гущина, А. С. Сорокин, А. Д. Агузаров Association between the activity of <i>CYP2D6</i> enzyme and profile of efficacy and safety of haloperidol in patients with alcohol addiction Sychev DA, Zastrozhin MS, Smirnov VV, Savchenko LM, Bryun EA, Guschina YuSh, Sorokin AS, Aguzarov AD | 36 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| СТАТЬЯ | Диапазоны нормальных значений для параметров стандартных коагулологических тестов и теста тромбодинамики при физиологической беременности на разных сроках гестации Е. С. Ворошилина, Р. А. Овсепян, Е. Э. Плотко, О. Б. Герасимова, О. Ю. Баскова, Т. С. Будыкина, Т. А. Вуймо Reference ranges for standard coagulation tests and thrombodynamics assay during normal pregnancy at various gestational ages Voroshilina ES, Ovsepyan RA, Plotko EE, Gerasimova OB, Baskova OYu, Budykina TS, Vuimo TA | 40 |
| СТАТЬЯ | Оценка и обоснование возможности объединения II-III фазы клинического исследования препарата «Гексасенс» В. И. Иванова-Радкевич, Е. А. Мачинская, Е. В. Филоненко, Е. А. Лукьянец Combining phases II and III in a clinical trial of “Hexasens”: assessment and reasoning Ivanova-Radkevich VI, Machinskaya EA, Filonenko EV, Lukianets EA | 46 |
| МЕТОД | Высококчувствительный и высокоспецифичный детектор воспаления В. Ю. Титов, М. В. Крейна, В. А. Петров, А. Н. Осипов, П. Р. Камчатнов, Р. И. Шалина High sensitivity and high specificity inflammation detector Titov VY, Kreynina MV, Petrov VA, Osipov AN, Kamchatnov PR, Shalina RI | 51 |
| МЕТОД | Получение и антипролиферативные свойства конъюгатов доксорубина с биосовместимыми суперпарамагнитными наночастицами оксида железа К. М. Старостин, А. Ю. Оленин, Т. А. Федотчева, К. Е. Широких, Г. В. Лисичкин, Н. Л. Шимановский Biocompatible doxorubicin-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and antineoplastic activity Starostin KM, Olenin AYU, Fedotcheva TA, Shirokikh KE, Lisichkin GV, Shimanovskiy NL | 58 |
| | От редакции | 65 |
| | Для заметок | 67 |

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И БЕЗОШИБОЧНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ МАССИРОВАННОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО БАРКОДИРОВАНИЯ

Е. С. Егоров^{1,2}, М. А. Израэльсон², С. А. Касацкая², Д. М. Чудаков^{1,2}✉, С. А. Лукьянов^{1,2}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

За последние несколько лет технологии высокопроизводительного секвенирования (High Throughput Sequencing, HTS) прочно вошли в обиход современной биологии и медицины. Открылись принципиально новые возможности для секвенирования геномов и глубокого анализа различных ДНК- и РНК-библиотек. В то же время новые технологии содержат и новые подводные камни — ограничения в получении достоверной количественной и качественной информации при глубоком анализе сложных библиотек. Четкое понимание этих ограничений необходимо как для корректной интерпретации получаемой информации, так и для поиска технологических решений, позволяющих минимизировать их влияние. В обзоре мы показываем, как молекулярное баркодирование позволяет нормировать образцы и устранять ошибки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования при сохранении реального разнообразия библиотек в ходе HTS-анализа сложных библиотек.

Ключевые слова: молекулярное баркодирование, высокопроизводительное секвенирование, ДНК-библиотека, РНК-библиотека, анализ библиотек

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Михайлович Чудаков
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1; chudakovdm@mail.ru
Статья поступила: 28.09.2015 **Статья принята к печати:** 22.10.2015 г

QUALITATIVE ERROR-FREE ANALYSIS OF MASS SEQUENCING DATA USING MOLECULAR BARCODING

Egorov ES^{1,2}, Israelson MA², Kasatskaya SA², Chudakov DM^{1,2}✉, Lukyanov SA^{1,2}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Over the past few years the High Throughput Sequencing technologies have become well established in modern biology and medicine. Fundamentally new opportunities for genome sequencing and in-depth analysis of various DNA and RNA libraries have been discovered. However, new technologies come with new pitfalls such as limitations in obtaining valid qualitative and quantitative data in the in-depth analysis of complex libraries. A clear understanding of these limitations is necessary for the accurate interpretation of the collected data as well as for the search for technological solutions to minimize their impact. The following review shows how molecular barcoding helps normalize samples efficiently and eliminate PCR and sequencing errors while preserving the actual diversity of libraries in the course of HTS analysis of complex libraries.

Keywords: molecular barcoding, High Throughput Sequencing, DNA library, RNA library, library analysis

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitriy Chudakov
1, Ostrovityanova st., Moscow, 117997; chudakovdm@mail.ru
Received: 28.09.2015 **Accepted:** 22.10.2015

ОШИБКИ ПЦР И СЕКВЕНИРОВАНИЯ. МЕТОДИКИ ИХ КОРРЕКЦИИ

Возможность надежно идентифицировать редкие варианты генов в сложных образцах делает высокопроизводительное секвенирование (High Throughput Sequencing, HTS) эффективным подходом в онкодиагностике [1], пренатальной диагностике [2], анализе неоднородности и изменчивости опухолей [3], в исследованиях бактериальных [4] и вирусных [5] инфекций и микробиомов [6], а также в эволюционных исследованиях [7] и исследованиях репертуаров иммунных рецепторов [8–13]. Однако одной из ключевых проблем в анализе данных HTS является накопление ошибок полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования. Некоторые направления практического применения технологии, например ранняя онкодиагностика, требуют надежной детекции редких мутаций, присутствующих в образце в концентрации менее 1 % и даже в концентрации порядка 0,1 % [13–18]. В таких случаях редкие подварианты

последовательностей генов часто невозможно отличить от подвариантов, являющихся результатом ошибок секвенирования и предшествующей ПЦР-амплификации. Самый простой способ устранения ошибок основан на том, что редко встречающиеся подварианты рассматриваются как ошибочные производные одной и той же часто встречающейся последовательности и по этому признаку исключаются из последующего анализа (frequency-based filtration) [19–21]. Фильтрация минорных подвариантов может опираться на более или менее достоверную модель накопления ошибок ПЦР, но в целом произвольно регулируется выбором соотношения часто и редко встречающихся последовательностей в массиве данных. Такой способ фильтрации хотя и устраняет большую часть накопленных ошибок, влечет за собой также потерю значимой части реального разнообразия редко представленных подвариантов нуклеотидных последовательностей в образце. В результате наиболее часто используемые методы HTS позволяют достоверно обнаружить мутации, присутствующие

в образце только в значительной концентрации порядка 5 % [22–24]. До недавнего времени не существовало метода, с помощью которого можно было бы проводить безошибочное глубокое секвенирование сложных библиотек генов при сохранении реального разнообразия гомологичных вариантов последовательностей. Прорыв в области количественного и безошибочного массивного секвенирования произошел с внедрением так называемого уникального молекулярного баркодирования [25, 26]. При этом подходе каждая исходная анализируемая молекула ДНК или кДНК маркируется уникальной нуклеотидной последовательностью, и эта информация затем используется в ходе программного анализа выходных данных массивного секвенирования (рисунок).

Опишем возможный вариант анализа молекулярно-баркодированных данных на примере разработанного нами подхода, получившего название Molecular Identifier Groups-based Error Correction (MIGEC) [10]. Он базируется на двухстадийном биоинформатическом анализе. Первая стадия относительно проста и основана на идее «безопасного секвенирования» (“Safe-Seqs”), предложенной в оригинальной работе проф. Vogelstein и соавторов [25]. Прочитанные последовательности, несущие один и тот же уникальный молекулярный идентификатор (баркод), объединяются в одну группу (кластер) — Molecular Identifier Group (MIG) (рисунок, Б). Наличие идентичного молекулярного идентификатора показывает, что данные прочитанные последовательности были наработаны с одной и той же стартовой молекулы ДНК или кДНК.

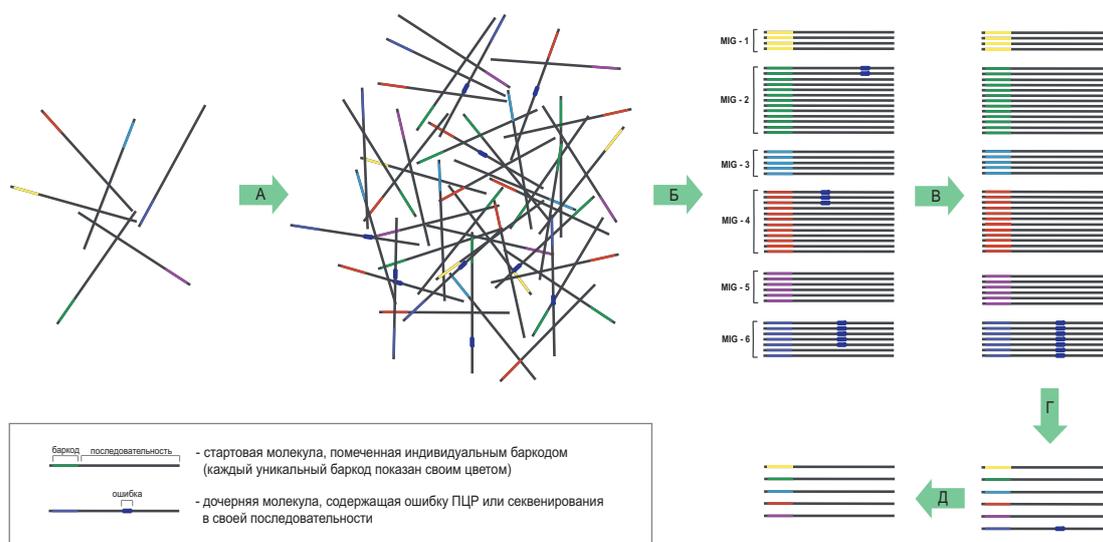
Соответственно, кластеризация данных секвенирования по уникальному идентификатору позволяет установить исходную нуклеотидную последовательность по доминирующей последовательности в каждой группе (рисунок, В).

Таким образом можно устранить многочисленные ошибки, накопленные в процессе амплификации, и исправить практически все ошибочно установленные в процессе секвенирования нуклеотиды. Однако на практике применения такого прямолинейного алгоритма оказывается недостаточно, для того чтобы добиться безошибочного глубокого анализа библиотеки интереса. Дело в том, что ошибки ПЦР, произошедшие на ранних стадиях амплификации, могут в определенной доле случаев образовывать доминирующую нуклеотидную последовательность в MIG вследствие стохастической природы ПЦР-амплификации, и результирующий ошибочный вариант последовательности интерпретируется как реально существую-

щее разнообразие (рисунок, Г). Такие события составляют значимый процент анализируемой информации при глубоком HTS-анализе библиотек и не могут быть безопасно (для реального разнообразия образца) отсечены фильтрацией редких подвариантов.

Любопытно, что такие ошибочные события, во всяком случае наиболее представленные из них, не устраняются также независимыми повторностями амплификации и секвенирования образца, так как частота определенных ошибок ПЦР в определенном контексте ДНК оказывается хорошо воспроизводима [10]. Для того чтобы идентифицировать и устранить подобные ошибочные варианты, мы ввели вторую стадию анализа данных (рисунок, Д). Она основывается на том, что высокочастотные (в каждом конкретном контексте ДНК) ошибки ПЦР носят повторяющийся характер, что позволяет отличить их от реального разнообразия. Такие ошибки «выдают» себя тем, что встречаются в качестве минорного подварианта в большом числе MIG и, соответственно, могут быть идентифицированы на основе относительной частоты встречаемости варианта последовательности в виде «мажора» или «минора» в MIG [10].

Двухстадийный алгоритм позволяет отфильтровать ошибочные варианты последовательностей с высокой точностью, сохраняя при этом естественное разнообразие библиотеки, и предоставляет возможность проводить глубокий безошибочный анализ сложных библиотек, как было показано нами на примере анализа данных секвенирования библиотек иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов [10], а также на примере мультиплексного генетического анализа для онкодиагностики (наши неопубликованные данные). На примере анализа гомологичных контрольных последовательностей с различной представленностью мы показали, что анализ MIGEC устраняет практически всё искусственное разнообразие, которое содержится в данных секвенирования. Соотношение сигнал-шум, посчитанное как соотношение числа прочтений наиболее крупной контрольной последовательности к самому представленному ошибочному подварианту с одной и двумя нуклеотидными заменами, возросло с 1 000:1 и 20 000:1 для стандартно процессированных данных до 12 000:1 и 60 000:1 соответственно при обработке MIGEC. В то же время контрольные низкочастотные подварианты последовательности с заменами одного и двух нуклеотидов были сохранены.



Коррекция ошибок и нормировка данных с использованием молекулярного баркодирования. (А) В ходе приготовления библиотек происходит многократное и неравномерное увеличение копий стартовых молекул кДНК или ДНК. Некоторые из дочерних молекул неизбежно содержат ошибки. (Б) Первая стадия анализа: прочитанные молекулы, имеющие один и тот же баркод, объединяются в одну группу (MIG). (В) По доминирующей последовательности внутри каждой группы происходит установление исходной последовательности. (Г) Кластеризация MIG — переход на счет стартовых молекул. (Д) Вторая стадия анализа (используется для коррекции ошибок при глубоком секвенировании): высокочастотные ошибки детектируются и удаляются из дальнейшего анализа.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ HTS

Независимо от выбранной технологии создания библиотек — на основе геномной ДНК либо на основе кДНК — невозможно обеспечить равную эффективность реакций на всех этапах пробоподготовки и секвенирования. Любая из стадий подготовки библиотеки генов к HTS-анализу (забор образца клеток, выделение ДНК или РНК, ПЦР-амплификация), как и само секвенирование, может приводить и непременно приводит к потерям и искажению информации о реальном количестве молекул и соотношении их подвариантов в исходном образце. Использование молекулярного баркодирования при анализе данных высокопроизводительного секвенирования позволяет контролировать число реально анализируемых стартовых молекул, успешно прошедших все стадии амплификации и секвенирования. В дальнейшем сравнительном анализе образцов также становится возможным оперировать не числом прочтений секвенирования, а количеством стартовых молекул. Таким образом, этот подход принципиально важен для понимания качества проведенного анализа и нормированного сравнения многих библиотек, в том числе полученных в разное время и разными лабораториями.

Так, в эксперименте, где с исходного образца, содержащего 1 000 гомологичных молекул, получают 10^6 прочтений секвенирования, число уникальных вариантов последовательности может варьироваться от 1 до 1 000 в зависимости от разнообразия этого образца. Однако детекция, например, 30 уникальных вариантов последовательностей среди полученного миллиона прочтений не дает однозначной информации о реальном составе образца. Действительно, эти 30 вариантов могут составлять разнообразие всей 1 000 исходных молекул или только лишь 30 молекул, успешно вошедших в амплификацию. В то же время обнаружение, например, 100 уникальных вариантов молекулярных баркодов позволяет с уверенностью говорить, что были проанализированы последовательности именно 100 стартовых молекул. Очевидно, что разрешающая способность такого эксперимента не может быть повышена за счет увеличения покрытия секвенирования, так как с увеличением числа прочтений число реально анализируемых молекул все равно останется равным 100. С помощью молекулярного баркодирования можно не только корректировать ошибки секвенирования и ПЦР, но и контролировать реальную узость «горлышка бутылки» для конкретного эксперимента, а также эффективно нормировать образцы для сравнительного анализа [9].

Становится возможным проводить точное сравнение двух и более библиотек генов, даже если они были получены с разного количества клеток и секвенированы с разной глубиной покрытия. Для этого, например, можно в ходе анализа использовать из каждого образца равное число случайно выбранных последовательностей, помеченных разными уникальными молекулярными баркодами. Поскольку каждая прочтенная последовательность с уникальным баркодом соответствует отдельной молекуле ДНК либо кДНК, такая нормализация данных секвенирования позволяет кардинально снизить уровень искажения количественной информации, накопленной в ходе амплификации и секвенирования кДНК-библиотеки. В результате снижается разброс данных для независимо полученных реплик и повышается относительное детектируемое разнообразие, так как каждое новое прочтение соответствует новой молекуле ДНК или кДНК. Применение молекулярного баркодирования также позволяет снизить количественные искажения относительной представленности вариантов последовательностей внутри каждой конкретной библиотеки [12], так как в ходе анализа элиминируются искажения, связанные с неравной эффективностью работы праймеров при мультиплексной ПЦР, стохастической природой ПЦР, предпочтений ПЦР и секвенирования относительно различных матриц [9, 25–27].

ПОДВОДНЫЕ КАМНИ МОЛЕКУЛЯРНОГО БАРКОДИРОВАНИЯ

Несмотря на все преимущества применения молекулярного баркодирования, эта технология имеет ограничения, которые необходимо учитывать при проведении качественного глубокого анализа данных HTS. В частности, ПЦР-ошибки внутри самой последовательности уникального идентификатора могут вносить существенную погрешность в определение количества стартовых молекул кДНК или ДНК. По нашему опыту молекулярный баркод длиной в 12 случайных нуклеотидов после амплификации и секвенирования 10^4 раз обычно производит до 10–20 искусственных подвариантов баркода, и в совокупности они могут быть представлены 100–200 прочтениями секвенирования. В итоге после группировки прочтений по уникальным идентификаторам мы получаем от 11 до 21 стартовой молекулы кДНК, в то время как на самом деле она была только одна. Ещё большее число искусственных подвариантов молекулярных баркодов было обнаружено в модельной системе с последовательностями уникальных идентификаторов в 16 нуклеотидов [28]. Однако существует простой подход, позволяющий достаточно эффективно отфильтровывать такие искусственные подварианты молекулярных баркодов. Как правило, при биоинформатическом анализе заметный процент данных составляют баркоды, прочитанные в ходе секвенирования один или два раза и по последовательности отличающиеся от более представленных «родительских» вариантов всего на 1 нуклеотид. Такая ситуация типична и воспроизводилась в серии проанализированных нами данных для различных экспериментов, в которых стартовый образец прошел 27–35 раундов амплификации. Подавляющее большинство вариантов баркодов с низким покрытием секвенирования представляет собой искусственное разнообразие, возникающее из-за ошибок ПЦР на поздних раундах амплификации. Устранять такое искусственное разнообразие библиотек можно с помощью фильтрации баркодов по количеству полученных прочтений. То есть в дальнейшем анализе используются последовательности уникальных молекулярных баркодов, секвенированных не менее определенного числа раз. Величина оптимального порога, выраженного в минимальном количестве прочтений на каждый уникальный баркод, может варьироваться в зависимости от размера стартовой библиотеки и достигнутого покрытия секвенирования. Также возможно проводить frequency-based фильтрацию по принципу наличия более представленных «родительских» вариантов молекулярных баркодов.

Другим важным моментом является естественное повторение случайно синтезированных уникальных идентификаторов («коллизий») [12, 28–29]. Так, при использовании в качестве молекулярных баркодов последовательностей длиной в 12 случайных нуклеотидов их теоретическое разнообразие составляет порядка $1,7 \times 10^7$ уникальных вариантов. Стоит отметить, что реальное наблюдаемое разнообразие всегда несколько меньше теоретического: по нашим оценкам, порядка $1,4 \times 10^7$ для последовательности из 12 случайных нуклеотидов. Такое снижение происходит вследствие неравномерного синтеза праймеров и, предположительно, наличия некоторых нуклеотидных предпочтений в ходе амплификации. Вероятность того, что в образце со случайно синтезированными, например, 10 000 молекулярными баркодами, найдутся два идентичных или различающихся лишь на 1 нуклеотид варианта достаточно мала. Однако очевидно, что при глубоком секвенировании, когда стартовое число молекул достигает нескольких миллионов, коллизии 12-ти-нуклеотидных баркодов случаются гораздо чаще. В таком случае бывает сложно отличить естественные коллизии от искусственного разнообразия молекулярных баркодов, вызванного накоплением в них ошибок ПЦР и секвенирования. Например, для 1 миллиона анализируемых молекул можно

ожидать более 30 000 пар случайно синтезированных 12-ти-нуклеотидных вариантов молекулярных баркодов с идентичной последовательностью. Таким образом, при анализе данных глубокого секвенирования с использованием молекулярного баркодирования необходимо учитывать и теоретическое, и реальное разнообразие используемых уникальных идентификаторов. Предпочтительно использовать большее разнообразие вариантов (то есть большую длину случайно синтезируемой последовательности в составе используемого адаптера) при глубоком анализе больших библиотек.

МАССИРОВАННОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ИССЛЕДОВАНИЯХ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

В иммунологии молекулярное баркодирование открывает новые возможности для анализа сложных репертуаров переменных фрагментов антител и Т-клеточных рецепторов, разнообразие которых в организме каждого человека может составлять сотни миллионов вариантов.

Разнообразие Т-клеточных рецепторов и антител внутри одного образца также может быть чрезвычайно велико, а высокоомологичные варианты могут присутствовать в различных пропорциях и быть практически неотличимыми от накопленных ошибок при HTS-анализе. Молекулярное баркодирование делает возможным точный анализ и сопоставление информации о репертуарах антител и Т-клеточных рецепторов для различных субпопуляций лимфоцитов, органов и тканей здоровых и больных индивидуумов и позволяет надежно отслеживать изменения в разнообразии иммунных репертуаров и судьбу клональных популяций лимфоцитов с течением времени или после проведенной терапии. С использованием метода молекулярного баркодирования нами был проведен нормированный сравнительный анализ разнообразия репертуаров бета-цепей Т-клеточных рецепторов периферической крови здоровых людей различного возраста [9].

Было показано, что наблюдаемое разнообразие Т-клеточных рецепторов практически линейно убывает в течение жизни. Одновременно с возрастом происходит активное заполнение гомеостатического пространства высокопредставленными клонами Т-клеток при значительном падении процентного содержания единично представленных клонотипов. Учитывая относительно стабильное общее количество Т-лимфоцитов (оно лишь незначительно снижается с возрастом) разрастание субпопуляций эффекторных Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов памяти неизбежно приводит к снижению относительного количества наивных Т-лимфоцитов. Это приводит к снижению наблюдаемого и экстраполируемого разнообразия вариантов Т-клеточных рецепторов и вероятности инициации эффективного иммунного ответа против новых патогенов и онкологических заболеваний. Молекулярное баркодирование также повышает надежность анализа репертуаров рецепторов иммунных клеток для малых чисел исследуемых лимфоцитов. Это касается ситуаций, когда работа проводится с малыми популяциями сортированных или культивируемых лимфоцитов либо с образцами ткани, содержащими небольшое количество лимфоцитов.

При глубоком секвенировании библиотек с малым числом стартовых молекул искусственное разнообразие накопленных ошибок амплификации начинает существенно превалировать над реальным, а численные значения представленности вариантов последовательностей искажаются вследствие стохастической природы ПЦР. Использование молекулярного баркодирования эффективно устраняет как ложные подварианты последовательностей, так и накопленные количественные искажения, при этом полностью сохраняя нативную информацию о разнообразии репертуаров иммунных клеток в образце [12].

Исследование индивидуальных репертуаров антител и Т-клеточных рецепторов методом HTS в последнее время все чаще применяется в медицине: при количественной оценке минимальной остаточной болезни при терапии лимфопролиферативных заболеваний [30–34]; при отслеживании результатов аутологичной трансплантации гемопоэтических клеток крови [35–37]; при количественном определении наличия и клональности проникающих в солидную опухоль лимфоцитов (Tumor infiltrating lymphocytes, TILs) [38]; при отслеживании изменений периферического Т-клеточного репертуара, вызванных иммунотерапией рака [39]; при поиске противораковых Т-клеточных рецепторов среди проникающих в солидную опухоль лимфоцитов [40–42] и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология молекулярного баркодирования представляет собой мощный инструмент для нормированного безошибочного HTS-анализа.

При достаточном уровне покрытия секвенирования использование уникальных молекулярных идентификаторов позволяет применять методы эффективной коррекции ошибок ПЦР и секвенирования, сохраняя при этом естественное разнообразие исследуемого образца. Последнее исключительно важно для анализа библиотек, включающих высокоомологичные варианты последовательностей. Применение молекулярного баркодирования также делает возможным точный контроль глубины анализа данных высокопроизводительного секвенирования — в единицах анализируемых молекул исходного образца, а также проведение корректного сравнения данных по секвенированию сложных библиотек генов в условиях различного количества клеток/молекул на старте, различного качества ДНК, РНК или кДНК и различной глубины секвенирования.

В биологии молекулярное баркодирование активно используется для решения разнообразных задач, таких как анализ геномов, транскриптомов [25, 26, 43] и микробиомов [6], исследование точности работы полимераз [25], оценка уровня ошибок в ходе транскрипции [44], синтез праймеров [25] или собственно секвенирование [29], а также анализ разнообразия репертуаров рецепторов иммунных клеток [8–11].

В медицине распространение молекулярного баркодирования в HTS-анализе позволит достичь принципиально нового уровня надежности и чувствительности, что откроет новые возможности для ранней онкодиагностики и пренатальной диагностики по ДНК плазмы крови, для анализа гетерогенности и изменчивости опухолей, инфекционных агентов и микробиомов, достоверного анализа репертуаров рецепторов иммунных клеток, который все чаще находит применение в медицинской практике.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант №14-35-00105.

Литература

- Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, et al. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology*. 2008; 135: 489–98.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 16266–71.
- Burrell RA, Swanton C. The evolution of the unstable cancer genome. *Curr Opin Genet Dev* 2014; 24: 6–7.
- Colman RE, Schupp JM, Hicks ND, Smith DE, Buchhagen JL, Valafar F, et al. Detection of Low-Level Mixed-Population Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Using High Fidelity Amplicon Sequencing. *PLoS One*. 2015; 10: e0126626.
- Van Laethem K, Theys K, Vandamme AM. HIV-1 genotypic drug resistance testing: digging deep, reaching wide? *Curr Opin Virol*. 2015; 14: 16–23.
- Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 2013; 341: 1237439.
- Barrick JE, Lenski RE. Genome dynamics during experimental evolution. *Nat Rev Genet*. 2013; 14: 827–39.
- Vollmers C, Sit RV, Weinstein JA, Dekker CL, Quake SR. Genetic measurement of memory B-cell recall using antibody repertoire sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 13463–8.
- Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014; 192: 2689–98.
- Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods*. 2014; 11: 653–5.
- He L, Sok D, Azadnia P, Hsueh J, Landais E, Simek M, et al. Toward a more accurate view of human B-cell repertoire by next-generation sequencing, unbiased repertoire capture and single-molecule barcoding. *Sci Rep*. 2014; 4: 6778.
- Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB, et al. Quantitative Profiling of Immune Repertoires for Minor Lymphocyte Counts Using Unique Molecular Identifiers. *J Immunol*. 2015; 194: 6155–63.
- Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015; 26: 1715–22.
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 16368–73.
- Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1775: 181–232.
- Chen Z, Feng J, Buzin CH, Liu Q, Weiss L, Kernstine K, et al. Analysis of cancer mutation signatures in blood by a novel ultra-sensitive assay: monitoring of therapy or recurrence in non-metastatic breast cancer. *PLoS One*. 2009; 4: e7220.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014; 6 (224): 224ra224.
- Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014; 20: 548–54.
- Nguyen P, Ma J, Pei D, Obert C, Cheng C, Geiger TL. Identification of errors introduced during high throughput sequencing of the T cell receptor repertoire. *BMC Genomics*. 2011; 12: 106.
- Bolotin DA, Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Shagin D, Ustyugova SV, et al. Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 3073–83.
- Brodin J, Mild M, Hedskog C, Sherwood E, Leitner T, Andersson B, et al. PCR-induced transitions are the major source of error in cleaned ultra-deep pyrosequencing data. *PLoS One*. 2013; 8: e70388.
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. 2012; 22: 568–76.
- Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*. 2013; 31: 213–19.
- Harismendy O, Schwab RB, Bao L, Olson J, Rozenzhak S, Kotsopoulos SK, et al. Detection of low prevalence somatic mutations in solid tumors with ultra-deep targeted sequencing. *Genome Biol*. 2011; 12: R124.
- Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 9530–35.
- Kivioja T, Vaharautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2012; 9: 72–4.
- Ross MG, Russ C, Costello M, Hollinger A, Lennon NJ, Hegarty R, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol*. 2013; 14: R51.
- Casbon JA, Osborne RJ, Brenner S, Lichtenstein CP. A method for counting PCR template molecules with application to next-generation sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39: e81.
- Deakin CT, Deakin JJ, Ginn SL, Young P, Humphreys D, Suter CM, et al. Impact of next-generation sequencing error on analysis of barcoded plasmid libraries of known complexity and sequence. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42: e129.
- Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VE, Stow P, Coustan-Smith E, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120: 5173–80.
- Wu D, Sherwood A, Fromm JR, Winter SS, Dunsmore KP, Loh ML, et al. High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2012; 4: 134ra163.
- Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, Gonzalez M, Barrio S, Ayala R, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123: 3073–79.
- Ladetto M, Bruggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014; 28: 1299–1307.
- Logan AC, Vashi N, Faham M, Carlton V, Kong K, Buno I, et al. Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene High-Throughput Sequencing Quantifies Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia and Predicts Post-Transplantation Relapse and Survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20 (9): 1307–13.
- Mamedov IZ, Britanova OV, Bolotin DA, Chkalina AV, Staroverov DB, Zvyagin IV, et al. Quantitative tracking of T cell clones after haematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol Med*. 2011; 3 (4): 201–7.
- Britanova OV, Bochkova AG, Staroverov DB, Fedorenko DA, Bolotin DA, Mamedov IZ, et al. First autologous hematopoietic SCT for ankylosing spondylitis: a case report and clues to understanding the therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47: 1479–81.
- Muraro PA, Robins H, Malhotra S, Howell M, Phippard D, Desmarais C, et al. T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2014; 124: 1168–72.
- Emerson RO, Sherwood AM, Rieder MJ, Guenthoer J, Williamson DW, Carlson CS, et al. High-throughput sequencing of T-cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumour-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Pathol*. 2013; 231: 433–40.
- Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, et al. Improved Survival with T Cell Clonotype Stability After Anti-CTLA-4 Treatment in Cancer Patients. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 238ra270.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002; 298: 850–4.
- Linnemann C, Mezzadra R, Schumacher TN. TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev*. 2014; 257: 72–82.
- Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*. 2014; 124: 2246–59.
- Grun D, Kester L, van Oudenaarden A. Validation of noise models for single-cell transcriptomics. *Nat Methods*. 2014; 11: 637–40.
- Gout JF, Thomas WK, Smith Z, Okamoto K, Lynch M. Large-scale detection of in vivo transcription errors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 18584–9.

References

- Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, et al. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology*. 2008; 135: 489–98.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 16266–71.
- Burrell RA, Swanton C. The evolution of the unstable cancer genome. *Curr Opin Genet Dev* 2014; 24: 61–7.
- Colman RE, Schupp JM, Hicks ND, Smith DE, Buchhagen JL, Valafar F, et al. Detection of Low-Level Mixed-Population Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Using High Fidelity Amplicon Sequencing. *PLoS One*. 2015; 10: e0126626.
- Van Laethem K, Theys K, Vandamme AM. HIV-1 genotypic drug resistance testing: digging deep, reaching wide? *Curr Opin Virol*. 2015; 14: 16–23.
- Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 2013; 341: 1237439.
- Barrick JE, Lenski RE. Genome dynamics during experimental evolution. *Nat Rev Genet*. 2013; 14: 827–39.
- Vollmers C, Sit RV, Weinstein JA, Dekker CL, Quake SR. Genetic measurement of memory B-cell recall using antibody repertoire sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 13463–8.
- Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014; 192: 2689–98.
- Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods*. 2014; 11: 653–5.
- He L, Sok D, Azadnia P, Hsueh J, Landais E, Simek M, et al. Toward a more accurate view of human B-cell repertoire by next-generation sequencing, unbiased repertoire capture and single-molecule barcoding. *Sci Rep*. 2014; 4: 6778.
- Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB, et al. Quantitative Profiling of Immune Repertoires for Minor Lymphocyte Counts Using Unique Molecular Identifiers. *J Immunol*. 2015; 194: 6155–63.
- Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015; 26: 1715–22.
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 16368–73.
- Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1775: 181–232.
- Chen Z, Feng J, Buzin CH, Liu Q, Weiss L, Kernstine K, et al. Analysis of cancer mutation signatures in blood by a novel ultra-sensitive assay: monitoring of therapy or recurrence in non-metastatic breast cancer. *PLoS One*. 2009; 4: e7220.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014; 6 (224): 224ra224.
- Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014; 20: 548–54.
- Nguyen P, Ma J, Pei D, Obert C, Cheng C, Geiger TL. Identification of errors introduced during high throughput sequencing of the T cell receptor repertoire. *BMC Genomics*. 2011; 12: 106.
- Bolotin DA, Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Shagin D, Ustyugova SV, et al. Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 3073–83.
- Brodin J, Mild M, Hedskog C, Sherwood E, Leitner T, Andersson B, et al. PCR-induced transitions are the major source of error in cleaned ultra-deep pyrosequencing data. *PLoS One*. 2013; 8: e70388.
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. 2012; 22: 568–76.
- Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*. 2013; 31: 213–19.
- Harismendy O, Schwab RB, Bao L, Olson J, Rozenzhak S, Kotsopoulou SK, et al. Detection of low prevalence somatic mutations in solid tumors with ultra-deep targeted sequencing. *Genome Biol*. 2011; 12: R124.
- Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 9530–35.
- Kivioja T, Vaharautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2012; 9: 72–4.
- Ross MG, Russ C, Costello M, Hollinger A, Lennon NJ, Hegarty R, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol*. 2013; 14: R51.
- Casbon JA, Osborne RJ, Brenner S, Lichtenstein CP. A method for counting PCR template molecules with application to next-generation sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39: e81.
- Deakin CT, Deakin JJ, Ginn SL, Young P, Humphreys D, Suter CM, et al. Impact of next-generation sequencing error on analysis of barcoded plasmid libraries of known complexity and sequence. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42: e129.
- Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VE, Stow P, Coustan-Smith E, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120: 5173–80.
- Wu D, Sherwood A, Fromm JR, Winter SS, Dunsmore KP, Loh ML, et al. High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2012; 4: 134ra163.
- Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, Gonzalez M, Barrio S, Ayala R, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123: 3073–79.
- Ladetto M, Bruggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014; 28: 1299–1307.
- Logan AC, Vashi N, Faham M, Carlton V, Kong K, Buno I, et al. Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene High-Throughput Sequencing Quantifies Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia and Predicts Post-Transplantation Relapse and Survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20 (9): 1307–13.
- Mamedov IZ, Britanova OV, Bolotin DA, Chkalina AV, Staroverov DB, Zvyagin IV, et al. Quantitative tracking of T cell clones after haematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol Med*. 2011; 3 (4): 201–7.
- Britanova OV, Bochkova AG, Staroverov DB, Fedorenko DA, Bolotin DA, Mamedov IZ, et al. First autologous hematopoietic SCT for ankylosing spondylitis: a case report and clues to understanding the therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47: 1479–81.
- Muraro PA, Robins H, Malhotra S, Howell M, Phippard D, Desmarais C, et al. T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2014; 124: 1168–72.
- Emerson RO, Sherwood AM, Rieder MJ, Guenther J, Williamson DW, Carlson CS, et al. High-throughput sequencing of T-cell receptors reveals a homogeneous repertoire of tumour-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Pathol*. 2013; 231: 433–40.
- Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, et al. Improved Survival with T Cell Clonotype Stability After Anti-CTLA-4 Treatment in Cancer Patients. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 238ra270.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002; 298: 850–4.
- Linnemann C, Mezzadra R, Schumacher TN. TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunol Rev*. 2014; 257: 72–82.
- Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*. 2014; 124: 2246–59.
- Grun D, Kester L, van Oudenaarden A. Validation of noise models for single-cell transcriptomics. *Nat Methods*. 2014; 11: 637–40.
- Gout JF, Thomas WK, Smith Z, Okamoto K, Lynch M. Large-scale detection of in vivo transcription errors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 18584–9.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ *PREVOTELLA INTERMEDIA* В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

А. В. Шибяева^{1,2}, Н. К. Аймадинова³, Е. В. Трубникова⁴, Т. В. Кузнецова², О. А. Зорина^{3,5}, Ю. К. Кудыкина⁶, А. Б. Шевелев^{2,6} ✉

¹ Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва

² Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

⁴ Курский государственный университет, Курск

⁵ Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Москва

⁶ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова РАН, Москва

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием набора «Дентофлор» установлено, что пародонтопатоген *Prevotella intermedia* встречается у 55 % пациентов с хроническим пародонтитом. Это существенно ниже аналогичного показателя для *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* и *Treponema denticola*. При этом гиперколонизация *P. intermedia* обнаружена только у 7,7 % пациентов контрольной группы. Это говорит о том, что гиперколонизация *P. intermedia* является значимым прогностическим признаком тяжести поражения пародонта. Патологический рост обсемененности *P. intermedia* редко протекает в форме моноинфекции: для этого вида больше, чем для других патогенов «красного комплекса», характерно сочетание с *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, приводящее к наиболее тяжелым формам хронического пародонтита. Для *P. intermedia*, в отличие от других патогенов «красного комплекса», не выявлено различий у мужчин и женщин по встречаемости и степени поражения пародонта при равной обсемененности.

Ключевые слова: микробиом, хронический пародонтит, полимеразная цепная реакция, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Борисович Шевелев
142782, Москва, пос. Института полиомиелита, 27 км Киевского шоссе; shevel_a@hotmail.com

Статья поступила: 13.09.2015 **Статья принята к печати:** 02.10.2015

A STUDY OF THE ROLE OF *PREVOTELLA INTERMEDIA* IN THE DEVELOPMENT OF CHRONIC PERIODONTITIS USING REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Shibaeva AV^{1,2}, Aymadinova NK³, Trubnikova EV⁴, Kuznetsova TV², Zorina OA^{3,5}, Kudykina YK⁶, Shevelev AB^{2,6} ✉

¹ N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

³ The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow

⁴ Kursk State University, Kursk

⁵ Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow

⁶ Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

In a real-time polymerase chain reaction-based assay with a Dentoflor kit *Prevotella intermedia*, a periodontal pathogen, was found to be present in 55 % of patients with chronic periodontitis. This percentage is significantly lower than the corresponding statistic for *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola*. In addition, hypercolonization of periodontium by *P. intermedia* was detected in 7.7 % of patients in the control group. This suggests that *P. intermedia* hypercolonization is an important prognostic factor indicating the severity of periodontal disease. The abnormal increase in *P. intermedia* is rarely a result of a monoinfection. Compared to other “red complex” pathogens, this species is more likely to co-occur with *P. gingivalis*, *T. forsythensis* and *T. denticola*, which leads to the most severe forms of chronic periodontitis. Unlike other “red complex” pathogens, *P. intermedia* showed no significant difference in occurrence and the degree of periodontal damage in male and female individuals with equal colonization levels.

Keywords: microbiome, chronic periodontitis, polymerase chain reaction, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksey Shevelev
27 km Kievskoe highway, Institute of Poliomyelitis village, Moscow, 142782; shevel_a@hotmail.com

Received: 13.09.2015 **Accepted:** 02.10.2015

В качестве основных причин развития пародонтита традиционно рассматриваются генетическая предрасположенность, влияние факторов среды (таких как уровень гигиены полости рта, диета, курение, наличие ортодонтических конструкций и др.), а также бактериальная инфекция. И если в патогенезе агрессивных форм пародонтита, как принято считать, ведущую роль играет генетическая составляющая [1], то основной причиной возникновения хронического пародонтита, по мнению большинства авторов, является именно инфицирование поверхности пародонта патогенными бактериями [2, 3]. В полости рта выявлено около 700 видов микроорганизмов, однако в качестве основных пародонтопатогенов называют, как правило, виды *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* [4–9].

В исследовании L. Ximenez-Fyvie и соавт. [10] виды *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola* предложено выделить в «красный комплекс» микроорганизмов, обладающих устойчивостью *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, в глубоких пародонтальных карманах отмечена повышенная обсемененность *Fusobacterium nucleatum*, представителями рода *Prevotella*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros* и *Campylobacter rectus*, вероятно, участвующими в развитии бактериальной инфекции.

Виды рода *Prevotella* рассматриваются в качестве опасных пародонтопатогенов и в исследовании N. Suzuki и соавт. [9] наряду с *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* и *Treponema*. В ряде исследований [11, 12] приводятся факты выявления на пародонте здоровых людей опасных пародонтопатогенов, хотя степень обсемененности ими у здоровых лиц в среднем оказывалась существенно ниже, чем у пациентов с пародонтитом.

В связи с этим существует необходимость анализировать не столько качественные, сколько количественные соотношения бактерий в консорциумах пародонта. В исследовании K. Torrungruang и соавт. [13] впервые представлены статистически достоверные количественные данные о наличии пародонтопатогенов на пародонте здоровых лиц и пациентов с хроническим пародонтитом, полученные с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

При этом в отношении *P. intermedia* делается вывод о склонности этого патогена к коинфекции с *T. denticola*. В то же время сам вид *P. intermedia* представляется авторам менее значимым с точки зрения риска развития хронического пародонтита, чем *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola*.

С учетом вышесказанного целью настоящего исследования было уточнение роли *P. intermedia* в качестве этиологического фактора хронического пародонтита на основании данных измерения количественной представленности этого микроорганизма у пациентов с хроническим пародонтитом и лиц контрольной группы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Клинический материал был собран на базе Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Министерства здравоохранения РФ.

Все пациенты дали информированное согласие, в котором были подробно описаны условия участия в исследовании. Обследованы 153 пациента в возрасте от 16 до 70 лет без тяжелой соматической патологии. Основную группу составили 78 человек — пациенты с гингивитом ($n = 2$), хроническим пародонтитом легкой степени ($n = 12$), средней ($n = 37$) и тяжелой ($n = 27$), средний возраст — $42,6 \pm 11,3$ года. В контрольную группу вошли 75 человек (лица без признаков пародонтита), средний возраст — $27,7 \pm 10,8$ года.

В представленной выборке женщины составили 92 человека (41 пациентка с хроническим пародонтитом и 51 — контрольной группы), мужчины — 61 (основная группа — 34 пациента, контрольная — 27). Главным критерием для постановки диагноза «хронический генерализованный пародонтит» считали разрушение зубодесневого прикрепления. Степень тяжести устанавливали на основании оценки глубины пародонтальных карманов и выраженности деструкции костной ткани.

Содержимое пародонтальных карманов получали с помощью стерильных бумажных эндодонтических штифтов (размером № 25), которые помещали в пробирку с реактивом «Проба-Рapid» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) объемом 0,5 мл. Клинический материал от каждого пациента собирали дважды.

Суммарную бактериальную ДНК пародонтального смыва пациентов выделяли с помощью набора реагентов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкцией. Препарат ДНК, соответствующий 1/10 объема одного смыва (50 мкл), растворяли в 50 мкл элюирующего раствора. В качестве матрицы для проведения одной ПЦР использовали 5 мкл полученного препарата.

В целях нормирования сигнала (учета разброса в количестве взятого биоматериала и эффективности экстракции ДНК) для каждого образца определяли величину «относительного Ct». Для этого из величины «абсолютного Ct» для специфического набора праймеров и зонда, усредненной по двум образцам одной серии, вычитали усредненную величину Ct общей бактериальной массы для тех же двух образцов серии. Статистической обработке подвергали данные, выраженные в форме «относительного Ct».

Для анализа данных применяли параметр «пороговой обсемененности» пародонта патогенами *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, что позволяло отличить патологическую обсемененность ($\Delta Ct < 15$), способную служить причиной возникновения пародонтита, от нормальной ($\Delta Ct > 15$), встречающейся у лиц без выраженного поражения пародонта или склонности к нему. Данный подход к анализу результатов был рассмотрен в заявке на патент РФ № 2015120411 (Шибеева, Кудыкина, Трубникова и др. Способ оценки обсемененности пародонта патогенными бактериями с применением полимеразной цепной реакции в реальном времени).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 8.0 для Windows по стандартным методикам вариационной статистики для непараметрических данных, сравнение полученных величин осуществляли путем анализа параметров Манна–Уитни.

При анализе взаимосвязей внутри пары количественных или порядковых качественных признаков использовали корреляционный анализ по методу Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты сравнения полученных данных, нормированных на содержание общей 16S рДНК в образце, в виде параметра Ct были проанализированы с помощью критерия Манна–Уитни (в составе программы Statistica). Данный подход позволил выявить вклад каждого из патогенов в развитие патологии пародонта, а также исследовать склонность пародонтопатогенов к коинфекции. Была проверена гипотеза о наличии статистически значимых различий между основной и контрольной группами по представленности в консорциуме пародонта каждого из исследуемых видов патогенов. Анализ осуществляли во всей выборке (без разделения по полу), а также отдельно в выборке мужчин и в выборке женщин (табл. 1).

Сравнительный анализ обеих групп показал наличие силь-

Таблица 1. Сравнительный анализ основной и контрольной групп по встречаемости пародонтопатогенов с применением критерия Манна–Уитни

| Микроорганизм | Суммарное значение ΔCt | | U | Z | p | Количество человек | |
|---------------------------------|------------------------|-----------------|------|-------|--------|--------------------|-----------------|
| | контрольная группа | основная группа | | | | контрольная группа | основная группа |
| Вся выборка | | | | | | | |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 6030 | 5751 | 2901 | 0,09 | >0,05 | 78 | 75 |
| <i>P. gingivalis</i> | 7667 | 4115 | 1265 | 6,2 | <0,001 | 78 | 75 |
| <i>P. intermedia</i> | 7345 | 4437 | 1587 | 5,6 | <0,001 | 78 | 75 |
| <i>T. forsythensis</i> | 8251 | 3531 | 681 | 8,3 | <0,001 | 78 | 75 |
| <i>T. denticola</i> | 7868 | 3914 | 1064 | 7,2 | <0,001 | 78 | 75 |
| Мужчины | | | | | | | |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 880 | 1011 | 416 | 0,64 | >0,05 | 27 | 34 |
| <i>P. gingivalis</i> | 1075 | 816 | 221 | 3,5 | <0,001 | 27 | 34 |
| <i>P. intermedia</i> | 1063 | 828 | 233 | 3,6 | <0,001 | 27 | 34 |
| <i>T. forsythensis</i> | 1206 | 685 | 90 | 5,4 | <0,001 | 27 | 34 |
| <i>T. denticola</i> | 1142 | 750 | 155 | 4,7 | <0,001 | 27 | 34 |
| Женщины | | | | | | | |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 2373 | 1905 | 1044 | 0,012 | >0,05 | 51 | 41 |
| <i>P. gingivalis</i> | 3041 | 1238 | 377 | 5,3 | <0,001 | 51 | 41 |
| <i>P. intermedia</i> | 2817 | 1462 | 601 | 4,2 | <0,001 | 51 | 41 |
| <i>T. forsythensis</i> | 3141 | 1138 | 277 | 6,1 | <0,001 | 51 | 41 |
| <i>T. denticola</i> | 3017 | 1261 | 400 | 5,4 | <0,001 | 51 | 41 |

Сравнительный анализ обеих групп показал наличие сильной связи между обсемененностью пародонта патогенами *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola* и патологическим состоянием пародонта: значение параметра Z составляло 6,2; 5,6; 8,3; 7,2 соответственно. Только для такого опасного пародонтопатогена, как *A. actinomycetemcomitans*, не было выявлено разницы в значениях ΔCt в контрольной и основной группах. При сравнительном анализе полученных данных отдельно у мужчин и женщин отличий от результатов для всей выборки выявлено не было, однако ввиду дробления выборки на меньшие по размеру группы произошло снижение значений Z и p. Полученные результаты свидетельствуют, что *P. intermedia* нельзя назвать наиболее распространенным пародонтопатогеном. В контрольной группе патологическая обсемененность этим микроорганизмом зафиксирована только в 7,7 % случаев, а в основной группе пациентов — в 55 %. Для сравнения: пародонтопатогены «красного комплекса» обнаружены в существенно большем количестве случаев:

- *P. gingivalis*: норма — 33 %, патология — 76 %;
- *T. forsythensis*: норма — 40 %, патология — 95 %;
- *T. denticola*: норма — 19 %, патология — 76 %.

С учетом этого наблюдения вся исследуемая выборка вне зависимости от диагноза была разделена по признаку патологической обсемененности *P. intermedia*, т. е. в основную группу были отнесены пациенты со значением ΔCt <15 (патологический уровень обсемененности), в контрольную — с ΔCt >15 (допустимый уровень обсемененности). С помощью критерия Манна–Уитни была проверена гипотеза о наличии статистически значимых различий между группами по представленности каждого из исследуемых патогенов (табл. 2). Согласно полученным результатам патологическая обсемененность

пародонта *P. intermedia* имеет сильную связь с наличием в первую очередь *T. forsythensis* (Z = 6,5, p <0,001). Значимые корреляции отмечены также для *T. denticola* (Z = 6,0, p <0,001) и *P. gingivalis* (Z = 5,1, p <0,001). Патологическая обсемененность *P. intermedia*, как показало проведенное исследование, не коррелирует с *A. actinomycetemcomitans*.

Для установления парных корреляций между гиперколониализацией пародонта *P. intermedia* и другими патогенами определяли коэффициент корреляции Спирмена. Исследование проводили для всей выборки (табл. 3), а также отдельно для контрольной группы (табл. 4) и группы пациентов с хроническим пародонтитом (табл. 5). Полученные результаты полностью подтвердили существенную роль *P. intermedia* в составе комплекса с *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola* в развитии пародонтита. Анализ всей выборки показал, что самая сильная связь наблюдается в отношении колонизации пародонта парой *T. forsythensis* / *T. denticola*.

Несколько меньшая, но высокая взаимосвязь выявлена в парах *P. gingivalis* / *T. forsythensis*, *P. intermedia* / *T. forsythensis*, *P. intermedia* / *T. denticola* и *P. gingivalis* / *T. denticola*. Связь средней силы получена для пары *P. gingivalis* / *P. intermedia*. Сходные корреляции наблюдались и при анализе пациентов основной группы с той лишь разницей, что значение коэффициента корреляции для пары *P. gingivalis* / *T. forsythensis* несколько больше, а для пары *P. gingivalis* / *P. intermedia* — меньше. При использовании корреляционного теста *A. actinomycetemcomitans* не проявил склонности к коинфекции с пародонтопатогенами «красного комплекса». Напротив, при анализе данных контрольной группы прослеживалась слабая тенденция к конкуренции между ним и другими патогенами: *P. gingivalis* и *T. denticola*.

Таблица 2. Сравнительный анализ групп пациентов с патологической обсемененностью пародонта *P. intermedia* (ΔCt <15) и без нее (ΔCt >15) по встречаемости других пародонтопатогенов с применением критерия Манна–Уитни

| Микроорганизм | Суммарное значение ΔCt | | U | Z | p | Количество человек | |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|------|------|--------|------------------------------|------------------------------|
| | ΔCt <i>P. intermedia</i> <15 | ΔCt <i>P. intermedia</i> >15 | | | | ΔCt <i>P. intermedia</i> <15 | ΔCt <i>P. intermedia</i> >15 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 3913 | 7868 | 2408 | 0,56 | >0,05 | 49 | 104 |
| <i>P. gingivalis</i> | 2486 | 9295 | 1261 | -5,1 | <0,001 | 49 | 104 |
| <i>T. forsythensis</i> | 2133 | 9648 | 908 | -6,5 | <0,001 | 49 | 104 |
| <i>T. denticola</i> | 2335 | 9447 | 1110 | -6,0 | <0,001 | 49 | 104 |

Таблица 3. Взаимосвязь между гиперколонизацией пародонта *P. intermedia* и другими патогенами при анализе общей выборки пациентов

| Микроорганизм | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | <i>P. gingivalis</i> | <i>P. intermedia</i> | <i>T. forsythensis</i> | <i>T. denticola</i> | Значение p |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|---------------------|------------|
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 | |
| <i>P. gingivalis</i> | 0,14 | | <0,001 | <0,001 | <0,001 | |
| <i>P. intermedia</i> | -0,061 | 0,36 | | <0,001 | <0,001 | |
| <i>T. forsythensis</i> | -0,054 | 0,51 | 0,48 | | <0,001 | |
| <i>T. denticola</i> | -0,0077 | 0,46 | 0,46 | 0,6 | | |
| Коэффициент Спирмена | | | | | | |

Таблица 4. Взаимосвязь между гиперколонизацией пародонта *P. intermedia* и другими патогенами при анализе контрольной группы

| Микроорганизм | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | <i>P. gingivalis</i> | <i>P. intermedia</i> | <i>T. forsythensis</i> | <i>T. denticola</i> | Значение p |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|---------------------|------------|
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | | <0,01 | >0,05 | >0,1 | <0,01 | |
| <i>P. gingivalis</i> | 0,36 | | >0,05 | >0,05 | >0,05 | |
| <i>P. intermedia</i> | -0,065 | -0,03 | | >0,05 | >0,05 | |
| <i>T. forsythensis</i> | 0,037 | 0,017 | 0,16 | | <0,05 | |
| <i>T. denticola</i> | 0,3 | 0,12 | 0,054 | 0,24 | | |
| Коэффициент Спирмена | | | | | | |

Таблица 5. Взаимосвязь между гиперколонизацией пародонта *P. intermedia* и другими патогенами при анализе группы пациентов с хроническим пародонтитом

| Микроорганизм | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | <i>P. gingivalis</i> | <i>P. intermedia</i> | <i>T. forsythensis</i> | <i>T. denticola</i> | Значение p |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|---------------------|------------|
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | | >0,1 | >0,1 | <0,05 | <0,05 | |
| <i>P. gingivalis</i> | 0,0059 | | <0,01 | <0,001 | <0,001 | |
| <i>P. intermedia</i> | -0,11 | 0,3 | | <0,05 | <0,001 | |
| <i>T. forsythensis</i> | -0,19 | 0,48 | 0,26 | | <0,001 | |
| <i>T. denticola</i> | -0,22 | 0,31 | 0,33 | 0,39 | | |
| Коэффициент Спирмена | | | | | | |

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение критерия Манна–Уитни позволило подтвердить существенное влияние пародонтопатогенов «красного комплекса» — *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola* — на развитие хронического пародонтита. Однако достоверность различий между основной и контрольной группами, полученных для *P. intermedia*, оказалась ниже, чем для остальных пародонтопатогенов. Это, вероятно, связано с относительной редкостью *P. intermedia* у пациентов (7,7 % — в случае нормы, 55 % — в случае патологии). Более того, не было зафиксировано ни одного случая заболевания пародонтитом, при котором наблюдалась бы патологическая обсемененность *P. intermedia* без одновременной патологической колонизации пародонта каким-либо патогеном «красного комплекса».

Таким образом, применительно к *P. intermedia* невозможно говорить о ее поведении при моноинфекции, в отличие, например, от *P. gingivalis*. Подтверждение этого факта было получено при разделении выборки по признаку наличия/отсутствия патологической обсемененности пародонта *P. intermedia*.

При этом была выявлена выраженная тенденция к формированию комплекса этого патогена с *T. forsythensis*, а также с *T. denticola* и *P. gingivalis*. Эти результаты полностью

подтвердились и при исследовании корреляций по методу Спирмена: патологическая обсемененность *P. intermedia* показывает связь высокой силы с наличием на пародонте комплекса *T. forsythensis* / *T. denticola*, в то время как корреляция с гиперколонизацией пародонта *P. gingivalis* заметно слабее.

ВЫВОДЫ

Можно утверждать, что *P. intermedia* является достаточно опасным пародонтопатогеном. Обнаружение этого микроорганизма на пародонте с высокой долей вероятности позволяет прогнозировать тяжелое течение хронического пародонтита. Это заключение дает основание рассматривать уровень колонизации пародонта *P. intermedia* как важный диагностический критерий. При этом *P. intermedia* не выступает в роли инициатора патологических процессов, но вносит значительный вклад в развитие сочетанной инфекции пародонта, участвуя в коинфекции с комплексом *T. forsythensis* / *T. denticola*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (гос. задание № 19.1724.2014/К в сфере научной деятельности).

Литература

1. Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. J Periodontol. 1994; 65: 479–488.
2. Page RC. Critical issues in periodontal research. J Dent Res. 1995; 74: 1118–1128.
3. Tanner ACR, Kent R Jr., Dyke Van T, Sonis ST, Murray LA. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. J Periodontol. 2005; 76 (4): 573–581.
4. Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. J Periodontol. 2008; 79 (9): 1620–9.
5. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2005; 32 (8): 860–6.
6. Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braido GV, et al. Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.

2013; 32 (12): 1501–9.

7. Hyvarinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun.* 2009; 15 (4): 195–204.
8. Heasman PA, Hughes FJ. Drugs, medications, and periodontal disease. *Br Dent J.* 2014; 217 (8): 411–9.
9. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int J Dent.* 2013; 2013: 587279–85.
10. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 648–657.
11. Gmur R, Guggenheim B. Interdental supragingival plaque a natural

habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res.* 1994; 73 (8): 1421–8.

12. Lai H, Horita A, Chou CK, Guy AW. A review of microwave irradiation and actions of psychoactive drugs. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 1987; 6 (1): 31–6.
13. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* co-infection areas associated with severe periodontitis in a thai population. *PLoS One.* 2015; 10 (8): 0136646.

References

1. Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol.* 1994; 65: 479–488.
2. Page RC. Critical issues in periodontal research. *J Dent Res.* 1995; 74: 1118–1128.
3. Tanner ACR, Kent R Jr., Dyke Van T, Sonis ST, Murray LA. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J Periodontol.* 2005; 76 (4): 573–581.
4. Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2008; 79 (9): 1620–9.
5. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (8): 860–6.
6. Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braidó GV, et al. Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32 (12): 1501–9.
7. Hyvarinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun.* 2009; 15 (4): 195–204.
8. Heasman PA, Hughes FJ. Drugs, medications, and periodontal disease. *Br Dent J.* 2014; 217 (8): 411–9.
9. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int J Dent.* 2013; 2013: 587279–85.
10. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 648–657.
11. Gmur R, Guggenheim B. Interdental supragingival plaque a natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res.* 1994; 73 (8): 1421–8.
12. Lai H, Horita A, Chou CK, Guy AW. A review of microwave irradiation and actions of psychoactive drugs. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 1987; 6 (1): 31–6.
13. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* co-infection areas associated with severe periodontitis in a thai population. *PLoS One.* 2015; 10 (8): 0136646.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *IL10* НА МАНИФЕСТАЦИЮ И ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ ПСОРИАЗА

Э. С. Галимова^{1,2}, Э. К. Хуснутдинова¹ ✉

¹ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

² Университет Тарту, Тарту, Эстония

Цель исследования — анализ ассоциаций полиморфного варианта rs1554286 (+1547 C/T) гена *IL10* с риском развития псориаза. Использованы образцы ДНК 273 больных псориазом и 298 здоровых доноров. Генотипирование полиморфного локуса rs1554286 гена *IL10* проведено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием CFX 96™ Real-Time Cyclers (BioRad, США). В общей выборке больных псориазом обнаружена ассоциация аллеля T (OR = 0,72; 95 % CI 0,54–0,96) rs1554286 гена *IL10* с пониженным риском развития заболевания. Установлено также, что аллель T rs1554286 гена *IL10* (OR = 0,54; 95 % CI 0,30–0,97) маркирует пониженный риск развития заболевания у больных с тяжелым течением псориаза. Кроме того, носительство аллеля T и гетерозиготного генотипа C/T rs1554286 гена *IL10* понижает риск развития заболевания у больных псориазом I типа (OR = 0,69; 95 % CI 0,51–0,95; OR = 0,63; 95 % CI 0,43–0,93 соответственно). В результате проведенного исследования идентифицирован полиморфный локус rs1554286 гена *IL10* как маркер пониженного риска развития псориаза у русских Волго-Уральского региона.

Ключевые слова: псориаз, *IL10*, аллельный полиморфизм, генетическая предрасположенность, гены цитокинов

✉ Для корреспонденции: Эльвира Сафуановна Галимова
450054, Россия, Уфа, проспект Октября, д. 71; elya-4@yandex.ru
Статья поступила: 13.09.2015 Статья принята к печати: 22.10.2015

THE IMPACT OF *IL10* GENE POLYMORPHISM ON MANIFESTATIONS AND SEVERITY OF PSORIASIS

Galimova ES^{1,2} ✉, Khusnutdinova EK¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetis, Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa

² Univerity of Tartu, Tartu, Estonia

The objective of this study is to analyze the associations of rs1554286 (+1547 C/T) polymorphism in *IL10* gene and the risk of psoriasis development. DNA samples were collected from 273 patients with psoriasis and 298 healthy controls. Genotyping of rs1554286 polymorphic locus in *IL10* gene was performed by real-time polymerase chain reaction using the CFX 96™ Real-Time Cyclers (BioRad, USA). In the total sample of patients with psoriasis the association of rs1554286 T allele (OR = 0.72; 95 % CI 0.54–0.96) of *IL10* gene and a lower risk of disease development was found. It was established that rs1554286 T allele of *IL10* gene (OR = 0.54; 95% CI 0.30–0.97) marks the lower risk of the disease development in patients with severe psoriasis. Besides the carriage of T allele and the heterozygous C/T rs1554286 genotype of *IL10* gene reduces the risk of disease development in patients with type I psoriasis (OR = 0.69; 95 % CI 0.51–0.95; OR = 0.63; 95 % CI 0.43–0.93 respectively). The study identified the rs1554286 polymorphic locus in *IL10* gene as a marker of a lower risk of psoriasis development in the Russian population of Volgo-Ural region.

Keywords: psoriasis, *IL10*, allelic polymorphism, genetic predisposition, cytokine genes

✉ Correspondence should be addressed: Elvira Galimova
71, Lenina av., Ufa, Russia, 450054; elya-4@yandex.ru
Received: 13.09.2015 Accepted: 22.10.2015

Псориаз является хроническим дерматозом мультифакторной природы с доминирующим значением в его развитии генетических факторов [1]. Распространенность псориаза достаточно велика — в среднем 3 % всех заболеваний кожи и подкожной клетчатки, поэтому в настоящее время уделяется особое внимание наблюдению и лечению больных с данной патологией. Важную роль в патогенезе заболевания играют иммунные нарушения. Иммунная система кожи включает клеточные элементы, локализующиеся в эпидермисе и дерме, а также выделяемые ими гуморальные факторы (цитокины, ростовые факторы, гормоны). Большинство современных концепций патогенеза псориаза сфокусированы на повышении секреции провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками. Многие процессы, необходимые для поддержания целостности кожи, такие как антимикробная

и противовирусная защита, заживление ран и противоопухолевый эффект, регулируются цитокинами [2]. В здоровой коже и слизистых оболочках наблюдается сбалансированное содержание про- и противовоспалительных цитокинов, что обеспечивает адекватный иммунный ответ на антигенную стимуляцию. Многочисленные исследования демонстрируют, что члены семейства интерлейкин-10 IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) цитокинов являются важными регуляторами некоторых из этих процессов [2]. Взаимодействие различных типов иммунокомпетентных клеток, опосредованное цитокиновым каскадом Th-1, Th-17 и Th-22 типов, приводит к формированию характерного псориазического фенотипа.

В ряде исследований показана роль генетических полиморфизмов и мутаций цитокинов и цитокиновых рецепторов, а также компонентов их сигнальных путей в патогенезе

псориаза [3–7]. При анализе полиморфных вариантов гена *IL10* (–1082 A/G, –819 C/T, –592 C/A) установлена ассоциация гаплотипа ACC с повышенной секрецией IL–10, тогда как гаплотипа ATA — с пониженной [3]. K. Kingo и соавт. идентифицировали, что аллель G rs2981572 гена *IL20* ($p < 0,05$) является маркером повышенного риска развития псориаза в эстонской популяции [4]. Кроме того, наблюдается повышенная частота гаплотипа HT3 GAA (OR = 2,34, 95 % CI 1,34–4,07, $p < 0,01$) у больных бляшечным псориазом по сравнению с контрольной группой. S. Koks и соавт. обнаружили, что пациенты с бляшечным псориазом имели более высокую частоту гаплотипа HT3 CACCGGAA генов *IL19* и *IL20* по сравнению с контрольной группой. Таким образом, данный гаплотип маркирует повышенный риск развития заболевания в эстонской популяции (OR = 2,5, 95 % CI 1,37–4,70, $p < 0,01$) [5], тогда как гаплотип САААС генов *IL20* и *IL24* показал протективный эффект (OR = 0,15, $p < 0,05$) [6]. Также гаплотип HT3 CACCGGAA был ассоциирован с ранним (OR = 2,2, 95 % CI 1,31–4,21, $p < 0,02$) и поздним (OR = 2,4, 95 % CI 1,12–5,40, $p < 0,02$) началом заболевания, семейной (OR = 2,4, 95 % CI 1,19–4,90, $p < 0,02$) и спорадической (OR = 2,8, 95 % CI 1,47–5,60, $p < 0,01$) формами псориаза [5]. Э. Галимова и соавт. установили, что аллель С и гаплотип СС rs30461 гена *IL29* маркирует пониженный риск развития псориаза у русских [7].

При молекулярно-генетических исследованиях любого многофакторного признака принципиально важным является учет этнической принадлежности обследованных лиц. Генетическая структура этноса включает сумму частот самых разных генов, а частота того или иного генотипа является результатом отбора по какому-либо признаку, зависящему от социально-демографических, климатических и прочих факторов. Изменения в генах, кодирующих интерлейкины, имеют большое значение для активации иммунокомпетентных клеток и, следовательно, развития патологических изменений в эпидермисе. Идентификация специфических генов, вовлеченных в патогенез псориаза, будет способствовать формированию фундаментальных представлений о генетических, иммунных и патогенетических аспектах псориаза. Как следствие, понимание генетических механизмов развития заболевания имеет существенное значение для определения подходов к профилактике псориаза в семьях высокого риска и для разработки оптимальных и эффективных методов терапии. Целью настоящего исследования стало изучение ассоциаций полиморфного варианта rs1554286 (+1547 C/T) гена *IL10* с риском развития псориаза у русских Волго-Уральского региона.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Использованы образцы ДНК 273 больных псориазом, состоящих на учете и находящихся на стационарном лечении в Республиканском кожно-венерологическом диспансере г. Уфы Республики Башкортостан (табл. 1). Выборку больных составили неродственные между собой пациенты в возрасте от 7 до 93 лет русской этнической принадлежности. Клиническое обследование включало сбор жалоб и анамнеза, физикальные, лабораторные и инструментальные методы. В диагностике псориазического артрита использовали критерии CASPAR (Классификация критериев псориазического артрита — Classification criteria for Psoriatic Arthritis), рентгенографическое исследование суставов и позвоночника, а также анализ крови для выявления ревматоидного фактора и исключения ревматоидного артрита. Контрольная группа была сформирована из 298 здоровых неродственных лиц, соответствующих группе больных по возрасту, полу и этнической принадлежности. Взятие крови проводили на станциях переливания крови у здоровых доноров, отрицавших наличие псориаза и других аутоиммунных заболеваний у себя и родственников.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [8]. Генотипирование выборки больных псориазом и здоровых доноров по полиморфному локусу rs1554286 гена *IL10* осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием CFX 96™ Real-Time Cycler (BioRad, США). ПЦР синтез ДНК провели в 10 мкл общего объема смеси, содержащей 2 мкл универсального буфера (670 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,1 % Tween-20, 2 mM dNTPs, 10 mM праймеров, 5 mM зондов), 0,2 мкл Taq-полимеразы и 30 нг геномной ДНК. Использовали следующие праймеры: FJ, 5'–TGTCGCCAGAATGCAAGAA–3'; RJ, 5'–CCCAGGTCCAGATGAAG–3'; FAM–tgctccccgcgtggc–BHQ–1; VIC–tgctccccgcgtggc–BHQ–2. После ПЦР-РВ полиморфного локуса rs1554286 (+1547 C/T) гена *IL10* провели анализ кривых флуоресценции по отдельным лункам в окне «Расчет» раздела «Анализ данных» и анализ распределения генотипов в окне «Аллельная дискриминация» согласно протоколу программы BioRad CFX Manager v 1.6 для BioRad CFX. О наличии того или иного аллеля полиморфного локуса судили по росту флуоресценции соответствующих красителей FAM и VIC. Соответствие наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди–Вайнберга оценивали с помощью точного критерия Фишера [9] в программе FINNETI. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ PLINK, FINNETI и MS Excel 2013 (Microsoft). При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и здоровых лиц применяли критерий χ^2 , точный критерий Фишера и критерий χ^2 с поправкой Йетса для таблиц сопряженности 2x2. Силу ассоциаций генотипических характеристик с риском развития псориаза оценивали по значениям показателя отношения шансов (odds ratio, OR).

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики больных псориазом

| Характеристики | Количество больных (n = 273) |
|-----------------------------|------------------------------|
| Распределение по полу: | |
| мужчины | 171 |
| женщины | 102 |
| Возраст начала заболевания: | |
| <40 лет (псориаз I типа) | 226 |
| >40 лет (псориаз II типа) | 47 |
| Псориаз в семейном анамнезе | 58 |
| Форма заболевания | |
| легкая | 214 |
| тяжелая | 59 |

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования был проведен анализ ассоциаций полиморфного варианта rs1554286 (+1547 C/T) гена *IL10* семейства цитокинов интерлейкина-10 с риском развития псориаза у русских Волго-Уральского региона. Сравнение распределения частот аллелей и генотипов однонуклеотидного полиморфизма (SNP, single nucleotide polymorphism) rs1554286 гена *IL10* между группой больных псориазом и контрольной группой в целом, а также с учетом степени тяжести псориаза (легкая и тяжелая) и времени манифестации болезни (I тип — до 40 лет, II тип — после 40 лет) показало статистически значимые различия ($p < 0,05$) (табл. 2). В группе больных псориазом обнаружена ассоциация аллеля Т (OR = 0,72, 95 % CI 0,54–0,96) rs1554286 гена *IL10* с пониженным риском развития заболевания. Установлено также, что аллель Т rs1554286 гена *IL10* (OR = 0,54; 95 % CI 0,30–0,97) маркирует пониженный риск

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs1554286 гена *IL10* у больных псориазом и здоровых доноров в целом и с учетом тяжести течения заболевания

| Аллели и генотипы полиморфного локуса rs1554286 гена <i>IL10</i> | Частота у больных псориазом, p (%) | Частота у здоровых доноров, p (%) | X ² (p-value) | OR (95 % CI) |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------|
| В целом | | | | |
| CC | 66,79 (177) | 57,43 (170) | | 1 |
| CT | 29,81 (79) | 37,16 (110) | 4,16 (<0,05) | 0,69 (0,48–0,98) |
| TT | 3,39 (9) | 5,40 (16) | 2,10 (>0,05) | 0,54 (0,23–1,25) |
| T | 18,30 (97) | 23,98 (142) | 4,79 (<0,05) | 0,72 (0,54–0,96) |
| Легкая форма | | | | |
| CC | 65,88 (141) | 57,43 (170) | | 1 |
| CT | 29,90 (64) | 37,16 (110) | 3,35 (>0,05) | 0,70 (0,47–1,02) |
| TT | 4,20 (9) | 5,40 (16) | 0,82 (>0,1) | 0,67 (0,29–1,58) |
| T | 19,15 (82) | 23,98 (142) | 2,80 (>0,05) | 0,77 (0,56–1,04) |
| Тяжелая форма | | | | |
| CC | 70,58 (36) | 57,43 (170) | | 1 |
| CT | 29,41 (15) | 37,16 (110) | – | 0,06 (0,03–0,12) |
| TT | 0 (0) | 5,40 (16) | 3,34 (>0,05) | 0,14 (0,008–2,41) |
| T | 14,70 (15) | 23,98 (142) | 4,34 (<0,05) | 0,54 (0,30–0,97) |
| Тип I (<40 лет) | | | | |
| CC | 67,90 (146) | 57,43 (170) | | 1 |
| CT | 27,90 (60) | 37,16 (110) | 5,39 (<0,05) | 0,63 (0,43–0,93) |
| TT | 4,18 (9) | 5,40 (16) | 0,97 (>0,1) | 0,65 (0,28–1,52) |
| T | 18,13 (78) | 23,98 (142) | 5,16 (<0,05) | 0,69 (0,51–0,95) |
| Тип II (>40 лет) | | | | |
| CC | 59,52 (25) | 57,43 (170) | | 1 |
| CT | 40,47 (17) | 37,16 (110) | 0,02 (>0,1) | 1,05 (0,54–2,03) |
| TT | 0 (0) | 5,40 (16) | 2,33 (>0,1) | 0,20 (0,01–3,48) |
| T | 20,23 (17) | 23,98 (142) | 0,59 (>0,1) | 0,80 (0,45–1,40) |

Примечание: p — частота генотипа или аллеля; X² (p-value) — оценка достоверности различий по распределению частот генотипов между двумя группами; OR — отношение шансов; 95 % CI — доверительный интервал (выделены статистически значимые различия).

развития заболевания у больных с тяжелым течением псориаза. Кроме того, носительство аллеля T и гетерозиготного генотипа C/T rs1554286 гена *IL10* понижает риск развития заболевания у больных псориазом I типа (OR = 0,69; 95 % CI 0,51–0,95; OR = 0,63; 95 % CI 0,43–0,93 соответственно). Таким образом, в результате проведенного исследования идентифицирован полиморфный локус rs1554286 гена *IL10* как маркер пониженного риска развития псориаза у русских Волго-Уральского региона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящим исследованием установлено, что полиморфный локус rs1554286 гена *IL10* показал протективный эффект при тяжелом течении и ранней манифестации псориаза у русских Волго-Уральского региона. Изученный полиморфный вариант rs1554286 гена *IL10* представляет собой изменение на границе экзона и интрона, которое, возможно, приводит к изменению процесса сплайсинга. Данный вид мутаций часто нарушает процессинг первичного РНК-транскрипта, в результате чего происходят либо неправильное вырезание соответствующей интронной области и трансляция бессмысленного удлиненного белка, не защищенного от протеолитического действия внутриклеточных ферментов, либо вырезание экзона и образование делетированного белка.

IL-10 состоит из 160 а. о. Ген *IL10* картирован на хромосоме 1 (участок 1q31–32), содержит 5 экзонов. Нет литературных данных об ассоциациях полиморфного локуса rs1554286 гена *IL10* с псориазом в других популяциях мира, таким образом, это первые данные, демонстрирующие роль этого полиморфизма в патогенезе псориаза. Исследование и понимание роли *IL10* в

патогенезе псориаза имеет практическое значение для новой иммунотерапии данного заболевания. *IL-10* подавляет функциональную активность макрофагов, ингибирует продукцию моноцитами и макрофагами провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая TNF- α , *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12*. *IL10* повышает синтез *IL-1Ra*, который, ингибируя антигенспецифическую активацию, пролиферацию и продукцию цитокинов Т-лимфоцитами, снижает антигенпрезентирующую способность моноцитов, связанную с регулирующими молекулами HLA II класса и экспрессией молекулы B7 на их поверхности. Вместе с тем *IL-10* определяет переход Th0 в Th2, тем самым стимулируя пролиферацию В-лимфоцитов и секрецию иммуноглобулинов. Предполагается, что *IL-10* проявляет свою антипсориазическую активность путем воздействия на различные клеточные популяции, включая Т-клетки и антигенпрезентирующие клетки (APCs).

Учитывая биологическую роль этого цитокина, можно предположить его возможное влияние на предрасположенность к аутоиммунным и воспалительным заболеваниям. Многочисленные исследования демонстрируют роль полиморфного локуса rs1554286 гена *IL10* в патогенезе иммуновоспалительных, инфекционных и онкологических заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Бехчета, гемофильная инфекция, доброкачественная гиперплазия предстательной железы [10–18]. В корейской популяции была изучена роль цитокинов *IL10*, *IL10RA* и *IL10RB* в патогенезе доброкачественной гиперплазии предстательной железы [10]. Показана статистически значимая (p < 0,05) ассоциация полиморфного варианта rs1554286 гена *IL10* с объемом предстательной железы: аллель C, кодоминантная и доминантная модели наследования rs1554286 гена *IL10* ассоциировали с показателями объема простаты. При изучении роли поли-

морфных вариантов генов *Mal/TIRAP* и *IL10* в патогенезе заболеваний, вызванных гемофильной палочкой серотипа b, у ранее вакцинированных детей была обнаружена ассоциация rs1554286 *IL10* с эпиглоттитом T (OR = 5,8; 95 % CI 2,4–14,2), тогда как среди больных менингитом и другими инфекциями, вызванными гемофильной палочкой, эта ассоциация не наблюдалась [11]. Индийские ученые S. Aggarwal и соавт. исследовали ассоциацию 51 SNPs противовоспалительных цитокинов и их рецепторов с предрасположенностью к проказе в популяции Северной Индии с последующей репликацией ассоциированных SNPs в географически близкой популяции Восточной Индии. Статистически значимая ($p < 0,05$) ассоциация с проказой была выявлена для 8 полиморфных локусов (rs1800871, rs1800872 и rs1554286 *IL10*; rs3171425 и rs7281762 *IL10RB*; rs2228048, rs744751 *TGFBR2* и rs1800797 *IL6*). В дальнейшем эта ассоциация была реплицирована и подтверждена для 4 полиморфных вариантов (rs1554286 *IL10*, rs7281762 *IL10RB*, rs2228048 *TGFBR2* и rs1800797 *IL6*). Таким образом, было показано, что полиморфный вариант rs1554286 гена *IL10* маркирует повышенный риск развития проказы в обеих изученных популяциях Северной и Восточной Индии (OR = 1,66 и 1,55; 95 % CI 1,30–2,14 и 1,24–1,95 соответственно) [12].

Японские ученые N. Mizuki и соавт. при проведении полногеномного исследования ассоциаций (Genome-Wide Association Studies — GWAS) идентифицировали гены предрасположенности к болезни Бехчета *IL23R*, *IL12RB2* и *IL10*. Ими была обнаружена ассоциация полиморфного варианта rs1554286 гена *IL10* с этим заболеванием в японской популяции ($p < 0,001$) [13].

Установлено, что полиморфизмы *IL10-592* и *IL10-1082* ассоциированы с системным ювенильным идиопатическим артритом [14]. Группой английских ученых было проведено исследование полиморфизмов промоторной области гена *IL10* у 500 пациентов с раком молочной железы и 500 здоровых женщин из Германии. Показано, что гомозиготы по гаплотипу ATA G(-1082)/A/C(-819)T/C(-592)A встречаются почти в 2 раза чаще, чем в контрольной группе (7,3 и 4,2 % соответствен-

но) [15]. При сравнении частот аллелей полиморфизма *IL10 C-592A* у 264 пациентов с раком толстой кишки и 408 здоровых жителей северо-восточной Шотландии было показано, что у носителей аллеля A в 2 раза снижен риск заболевания при постоянном приеме аспирина, чего не наблюдается у обладателей двух аллелей C [16]. Исследователи G. Xie и соавт. изучили концентрацию белка IL-10 в сыворотке крови больных с ишемическим инсультом (ИИ) и роль полиморфного варианта rs1554286 *IL10* в патогенезе ИИ в китайской популяции ($p < 0,05$) [17]. Было показано, что повышенный уровень белка IL-10 в сыворотке крови был статистически значимо ассоциирован с риском развития ИИ (OR = 0,50; 95 % CI 0,31–0,81). При рецессивной модели наследования (TT versus CC+CT) отмечен повышенный риск развития ИИ (OR = 1,54; $p = 0,034$). По результатам исследования A. Malarstig и соавт. больным с острым коронарным синдромом (ОКС) в Швеции установлено, что концентрация белка IL-10 в плазме крови была значительно выше в группе больных ОКС, чем у здоровых лиц [18]. При сравнении частот аллелей полиморфного локуса 1170 C>T гена *IL10* между больными (ОКС) и контрольной группой не были выявлены статистически значимые различия.

ВЫВОДЫ

Полиморфный вариант rs1554286 гена *IL10* играет в целом протективную роль в патогенезе псориаза. Учитывая значимость IL-10 в функционировании иммунной системы, можно предположить, что дальнейшие молекулярно-генетические и функциональные исследования полиморфных вариантов гена *IL10* позволят раскрыть роль этого гена в развитии псориаза.

Исследование выполнено при поддержке грантов Российскойского фонда фундаментальных исследований № 13-04-01489 А и № 14-04-97026.

Литература

- Krueger G, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64: 30–6.
- Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol.* 2007; 178: 2229–40.
- Kingo K, Koks S, Silm H, Vasar E. IL-10 promoter polymorphisms influence disease severity and course in psoriasis. *Genes Immun.* 2003; 4 (6): 455–7.
- Kingo K, Koks S, Nikopiensu T, Silm H, Vasar E. Polymorphisms in the interleukin-10 gene: relationships to plaque-type psoriasis. *Genes Immun.* 2004; 5 (2): 117–21.
- Koks S, Kingo K, Ratsep R, Karelson M, Silm H, Vasar E. Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. *Genes Immun.* 2004; 5: 662–7.
- Koks S, Kingo K, Vabrit K, Ratsep R, Karelson M, Silm H, et al. Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes Immun.* 2005; 6 (5): 407–15.
- Galimova E, Akhmetova V, Latipov B, Kingo K, Ratsep R, Traks T, et al. Analysis of genetic variants of class II cytokine and their receptor genes in psoriasis patients of two ethnic groups from the Volga-Ural region of Russia. *J Dermatol Sci.* 2012; 68 (1): 9–18.
- Mathew CC. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA. *Methods Mol Biol.* 1984; 2: 31–4.
- Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics.* 1992; 48: 361–72.
- Yoo KH, Kim SK, Chung JH, Chang SG. Association of IL10, IL10RA, and IL10RB polymorphisms with benign prostate hyperplasia in Korean population. *J Korean Med Sci.* 2011; 26 (5): 659–64.
- Ladhani SN, Davila S, Hibberd ML, Heath PT, Ramsay ME, Slack MP, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in *Mal/TIRAP* and interleukin-10 genes and susceptibility to invasive haemophilus influenzae serotype b infection in immunized children. *Clin Infect Dis.* 2010; 51 (7): 761–7.
- Aggarwal S, Ali S, Chopra R, Srivastava A, Kalaiarasan P, Malhotra D, et al. Genetic variations and interactions in anti-inflammatory cytokine pathway genes in the outcome of leprosy: a study conducted on a MassARRAY platform. *J Infect Dis.* 2011; 204 (8): 126–73.
- Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, et al. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behcet's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010; 42(8): 703–6.
- Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 (5): r148.
- Langsenlehner U, Krippel P, Renner W, Yazdani-Biuki B, Eder T, Koppel H, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 90 (2): 113–5.
- Macarthur M, Sharp L, Hold GL, Little J, El-Omar EM. The role of cytokine gene polymorphisms in colorectal cancer and their interaction with aspirin use in the northeast of Scotland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14 (7): 1613–8.
- Xie G, Myint PK, Zaman MJ, Li Y, Zhao L, Shi P, et al. Relationship of serum interleukin-10 and its genetic variations with ischemic stroke in a Chinese general population. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e74126.
- Malarstig A, Eriksson P, Hamsten A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart.* 2008; 94 (6): 724–9.

References

1. Krueger G, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64: 30–6.
2. Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol*. 2007; 178: 2229–40.
3. Kingo K, Koks S, Silm H, Vasar E. IL-10 promoter polymorphisms influence disease severity and course in psoriasis. *Genes Immun*. 2003; 4 (6): 455–7.
4. Kingo K, Koks S, Nikopensius T, Silm H, Vasar E. Polymorphisms in the interleukin-20 gene: relationships to plaque-type psoriasis. *Genes Immun*. 2004; 5 (2): 117–21.
5. Koks S, Kingo K, Ratsep R, Karelson M, Silm H, Vasar E. Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. *Genes Immun*. 2004; 5: 662–7.
6. Koks S, Kingo K, Vabrit K, Ratsep R, Karelson M, Silm H, et al. Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes Immun*. 2005; 6 (5): 407–15.
7. Galimova E, Akhmetova V, Latipov B, Kingo K, Ratsep R, Traks T, et al. Analysis of genetic variants of class II cytokine and their receptor genes in psoriasis patients of two ethnic groups from the Volga-Ural region of Russia. *J Dermatol Sci*. 2012; 68 (1): 9–18.
8. Mathew CC. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA. *Methods Mol Biol*. 1984; 2: 31–4.
9. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*. 1992; 48: 361–72.
10. Yoo KH, Kim SK, Chung JH, Chang SG. Association of IL10, IL10RA, and IL10RB polymorphisms with benign prostate hyperplasia in Korean population. *J Korean Med Sci*. 2011; 26 (5): 659–64.
11. Ladhani SN, Davila S, Hibberd ML, Heath PT, Ramsay ME, Slack MP, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in Mal/TIRAP and interleukin-10 genes and susceptibility to invasive haemophilus influenzae serotype b infection in immunized children. *Clin Infect Dis*. 2010; 51 (7): 761–7.
12. Aggarwal S, Ali S, Chopra R, Srivastava A, Kalaiarasan P, Malhotra D, et al. Genetic variations and interactions in anti-inflammatory cytokine pathway genes in the outcome of leprosy: a study conducted on a MassARRAY platform. *J Infect Dis*. 2011; 204 (8): 1264–73.
13. Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, et al. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behcet's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010; 42(8):703–6.
14. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8 (5): r148.
15. Langsenlehner U, Krippel P, Renner W, Yazdani-Biuki B, Eder T, Koppel H, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 90 (2): 113–5.
16. Macarthur M, Sharp L, Hold GL, Little J, El-Omar EM. The role of cytokine gene polymorphisms in colorectal cancer and their interaction with aspirin use in the northeast of Scotland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14 (7): 1613–8.
17. Xie G, Myint PK, Zaman MJ, Li Y, Zhao L, Shi P, et al. Relationship of serum interleukin-10 and its genetic variations with ischemic stroke in a Chinese general population. *PloS One*. 2013; 8 (9): e74126.
18. Malarstig A, Eriksson P, Hamsten A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart*. 2008; 94 (6): 724–9.

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ОЧАГОВОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Л. В. Ганковская^{1✉}, О. А. Свитич², И. В. Хамаганова¹, Д. М. Гюльалиев¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва

Роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе ограниченной склеродермии практически не изучена. Однако все чаще признается ведущая роль молекул врожденного иммунитета (Toll-подобных рецепторов и цитокинов) в формировании склероза при ограниченной склеродермии. Целью работы было исследование экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF-α* в очаге патологического процесса и в непораженном участке кожи больных ограниченной склеродермией. Используемый метод — ПЦР в реальном времени. В исследование были включены 63 пациента с ограниченной склеродермией: с бляшечной формой склеродермии — 49 больных, с идиопатической атрофодермией Пазини–Пьерини — 8, у 6 человек отмечено сочетание бляшечной склеродермии со склероатрофическим лихеном. Контрольную группу составили 8 здоровых доноров. В результате в патологическом очаге выявлен дисбаланс показателей врожденного иммунитета, проявляющийся в снижении экспрессии гена *TLR2*, увеличении экспрессии генов *HBD-1* и *TNF-α* по сравнению с кожей здоровых доноров. Выявленные изменения в показателях врожденного иммунитета могут свидетельствовать о нарушении процессов распознавания патогенов и эндогенных лигандов, активации локального воспаления за счет повышения экспрессии гена *TNF-α*, а также усиления фибробластических процессов, опосредуемых высоким уровнем противомикробного пептида HBD-1.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, склеродермия, дефенсины, Toll-подобные рецепторы, фактор некроза опухоли

✉ Для корреспонденции: Людмила Викторовна Ганковская
117997, Москва, ул. Островитянова, 1; lvgan@yandex.ru
Статья получена: 11.09.2015 Статья принята в печать: 12.11.2015

A CHANGE IN INNATE IMMUNE FACTORS EXPRESSION IN LOCALIZED SCLERODERMA

Gankovskaya LV^{1✉}, Svitich OA², Khamaganova IV¹, Gyluliev DM¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow

The role of innate immune mechanisms in the pathogenesis of localized scleroderma is still not understood. However molecules of innate immunity such as toll-like receptors and cytokines are increasingly seen as a driver for sclerosis development in patients with localized scleroderma. The objective of this study was to investigate the expression of *TLR2*, *HBD-1* and *TNF-α* genes both in the lesions and unaffected skin areas in patients with localized scleroderma. This study was real time PCR based. It enrolled 63 patients with localized scleroderma including 49 individuals with plaque morphea, 8 individuals with idiopathic atrophoderma of Pasini and Pierini, and 6 individuals with co-occurring plaque morphea and lichen sclerosus. The control group consisted of 8 healthy donors. The study showed the imbalance of innate immune factors in the lesion areas with the reduction in *TLR2* gene expression and increase in *HBD-1* and *TNF-α* genes expression compared to healthy donors skin. These changes in the innate immune factors can indicate defects in the processes of pathogene and endogenous ligand recognition, local inflammation development as a result of increased *TNF-α* expression, and fibroblast activity mediated by a high level of HBD-1 antimicrobial peptide.

Keywords: innate immunity, scleroderma, defensins, Toll-like receptors, tumor necrosis factor

✉ Correspondence should be addressed: Lyudmila Gankovskaya
1, Ostrovityanova st., Moscow, 117997; lvgan@yandex.ru
Received: 11.09.2015 Accepted: 12.11.2015

Очаговая склеродермия (ОСД) — хроническое заболевание соединительной ткани, главным образом поражающее кожу и подлежащие ткани, характеризующееся появлением локальных очагов склероза на фоне воспалительных процессов (эритемы, отека) и дальнейшим прогрессированием в атрофию и гипо/гиперпигментацию кожи [1]. Очаговую склеродермию относят к числу дерматозов, в этиологии и патогенезе которых до настоящего времени остается много сложных и нерешенных аспектов [2]. Этиология склеродермии представляется как сочетание генетической предрасположенности и воздействия на организм неблагоприятных факторов как внешнего, так и внутреннего генеза. Эти факторы вызывают аутогенную активацию иммунной системы и нарушение гемодинамики [3, 4].

В настоящее время известны три наиболее распространенные теории патогенеза ограниченной склеродермии: иммунные нарушения, сосудистая патология и обменные нарушения в соединительной ткани. По всей видимости, патогенные факторы являются провоцирующими, или пусковыми, способны вызвать изменения антигенных свойств собственных тканей и стимулировать синтез аутоантител, которые впоследствии повреждают сосуды [5].

Одним из главных и характерных для локализованной склеродермии признаков считается повышенная продукция и депонирование в коже и подлежащих тканях коллагена и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Полагают, что активация фибробластов обусловлена цитокинами, высво-

бождаемыми лимфоцитами, макрофагами и эндотелиальными клетками. Профиброзным действием обладают трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор роста соединительной ткани (CTGF), ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6 [6].

Привлечению в патологический очаг лимфоцитов и клеток миелоидного происхождения с последующей продукцией цитокинов способствуют так называемые распознающие рецепторы врожденного иммунитета — Toll-подобные рецепторы (TLR) [7]. Существует мнение, что периодически возникающие химические, инфекционные, механические или аутоиммунные повреждения у генетически предрасположенных лиц вызывают активацию фибробластов. Распознающие рецепторы врожденного иммунитета все чаще признают ключевым фактором в развитии фиброза при системной склеродермии. Однако сведений об уровне экспрессии Toll-подобных рецепторов в патологически измененных участках кожи при ограниченной склеродермии найти не удалось.

Активация TLR приводит не только к экспрессии цитокинов, но и индуцирует выработку противомикробных пептидов — β -дефенсинов. Помимо противомикробной активности, дефенсины также принимают участие в процессах, связанных с повреждением, рубцеванием и восстановлением тканей. Человеческие β -дефенсины (hBD) продуцируются многими типами эпителиальных клеток. В частности, hBD-1 экспрессируются в эпителии кожи, почках, эпителии дыхательного и женского репродуктивного тракта [8]. Человеческие дефенсины hBD-2, hBD-3 экспрессируются в воспаленной коже и впервые были обнаружены при псориазе [9].

Роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе ограниченной склеродермии практически не изучена. Нам не удалось найти литературных источников с данными об изменении показателей врожденного иммунитета в очаге при ОСД. Однако не исключено, что исследование показателей врожденного иммунитета позволит разработать новые подходы в диагностике, прогнозе и лечении ОСД.

Для исследования были выбраны следующие маркеры: TLR2, противомикробный пептид HBD-1 и TNF- α . Выбор этих молекул обусловлен их важной функцией в механизмах врожденного иммунитета кожи. TLR2, как известно, является рецептором, распознающим широкий спектр патогенов и эндогенных лигандов. Взаимодействие TLR2 с лигандами индуцирует экспрессию генов противомикробных пептидов и провоспалительных цитокинов, в том числе и TNF- α . HBD-1 дефенсин осуществляет защиту от различных вирусов, бактерий и грибов. Наряду с противомикробной активностью HBD-1 влияет на процессы рубцевания тканей, регулируя функцию фибробластов. Известна ведущая роль TNF- α в индукции воспаления и в процессах репарации тканей [8].

Цель работы — исследование экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF- α* в очаге патологического процесса и в непораженном участке кожи больных ограниченной склеродермией.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением были 63 пациента, 10 мужчин и 53 женщины, в возрасте от 16 до 74 лет. Диагностированы следующие клинические формы: у 49 пациентов — бляшечная склеродермия, у 8 — идиопатическая атрофодермия Пазини–Пьерини, у 6 отмечено сочетание бляшечной склеродермии со склероатрофическим лихеном. Давность заболевания составляла от 1 мес до 6 лет. В контрольную группу вошли 8 здоровых доноров. Всем пациентам проведено общеклиническое обследование, включая консультацию терапевта, эндокринолога, хирурга и при необходимости других специалистов, проанализированы также результаты исследований крови,

Из образцов-соскобов с поверхности кожи в районе очага склеродермии и в районе нормальной ткани была выделена РНК с использованием набора реагентов RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) строго по протоколу. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов с помощью реакции обратной транскрипции была получена кДНК. На следующем этапе исследования с полученной в результате реакции обратной транскрипции кДНК проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия)

Реакцию проводили с использованием «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» («Синтол», Россия). Последовательность праймеров для определения уровня экспрессии данных генов подбирали с помощью программы Vector NTI Suite 8.0 (последовательности мРНК были получены в базе данных GenBank). Системы для определения экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF- α* были отработаны ранее [10]. Уровень экспрессии исследуемых генов определяли относительно экспрессии гена β -актина [11].

Данные по экспрессии исследуемых генов представлены в виде количества копий исследуемого гена относительно 10^3 копий гена актина. Результаты на диаграммах и в таблице представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (25–75-й процентиля). Статистическую обработку проводили с использованием программы Statsoft Statistica v. 6.0. Достоверность получаемых различий между группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$ [12].

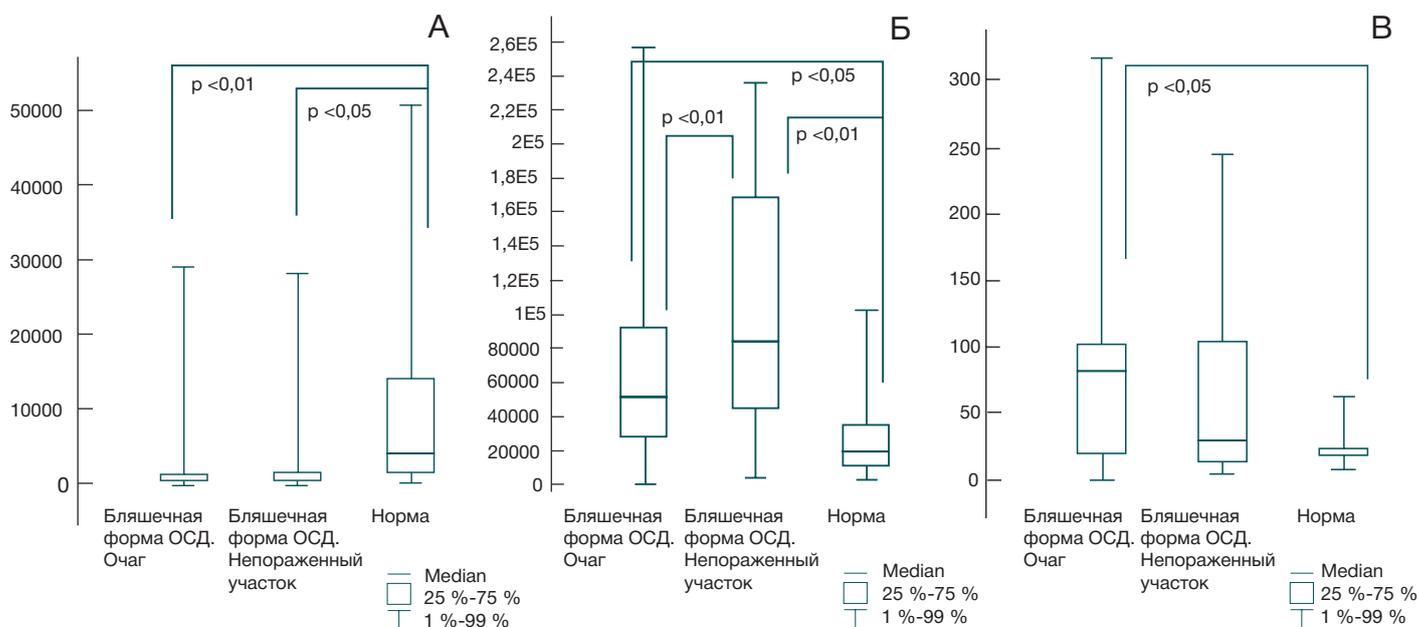
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе проведено комплексное исследование экспрессии генов важных молекул врожденного иммунитета: TLR2, противомикробного пептида HBD-1 и провоспалительного цитокина TNF- α в очаге патологического процесса, в непораженной коже больных с различными формами ОСД и в коже здоровых доноров.

В результате исследований было выявлено достоверное снижение экспрессии гена *TLR2* в очаге патологического процесса при бляшечной форме ОСД по сравнению с кожей здоровых доноров ($p < 0,01$). Характерной особенностью является снижение уровня экспрессии гена *TLR2* и в участках непораженной кожи больных бляшечной формой ОСД (рисунок А).

При этом наблюдается увеличение экспрессии гена *HBD-1* в 2,5 раза в очаге повреждения по сравнению с кожей здоровых доноров (таблица; рисунок, А). Следует заметить, что в неизмененных участках кожи больных с очаговой формой ОСД ген противомикробного пептида HBD-1 экспрессируется в большей степени, чем в патологическом очаге ($p < 0,01$). У больных с бляшечной формой ОСД выявлено увеличение экспрессии гена *TNF- α* только в патологически измененных очагах кожи (рисунок, В). В участках здоровой кожи экспрессия гена *TNF- α* не отличалась от показателей здоровых доноров. При сочетании бляшечной склеродермии со склероатрофическим лихеном изменения экспрессии генов исследуемых молекул носят схожий характер с группой больных бляшечной формой ОСД (таблица).

При идиопатической атрофодермии Пазини–Пьерини зафиксированы следующие изменения показателей врожденного иммунитета. Экспрессия гена распознающего рецептора TLR2 в патологическом очаге и непораженных участках кожи больных статистически достоверно не отличается от показателей здоровых доноров (таблица). При этом обнаружено выраженное увеличение экспрессии гена *TNF- α* в изолированных очагах, превышающее показатели кожи здоровых доноров в 5,65 раза ($p < 0,01$).



Экспрессия генов *TLR2* (А), *HBD-1* (Б), *TNF-α* (В) в кератиноцитах при бляшечной форме склеродермии и в норме. По оси абсцисс — исследуемые группы, по оси ординат — количество копий изучаемых генов относительно 10³ копий гена актина.

Экспрессия генов *TLR2*, *HBD-1*, *TNF-α* в кератиноцитах при различных формах склеродермии

| Гены врожденного иммунитета | Формы склеродермии | Кератиноциты | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | патологический очаг | непораженный участок | здоровая кожа (норма) |
| <i>TLR2</i> | бляшечная форма ОСД | 710** (543–1278) | 774* (572–1704) | 4366 (1655–14290) |
| | атрофодермия Пазини–Пьерини | 1433 (863–11133) | 2452 (1328–5711) | 4366 (1655–14290) |
| | склероатрофический лихен | 972 (584–1509) | 852* (514–18165) | 4366 (1655–14290) |
| <i>HBD-1</i> | бляшечная форма ОСД | 51007* (28782–92277) | 84568** (44982–1687400) | 20059 |
| | атрофодермия Пазини–Пьерини | 39318 (35535–53224) | 51553 (20314–1093800) | 20059 |
| | склероатрофический лихен | 52163 (48645–73807) | 54163* (38711–73029) | 20059 |
| <i>TNF-α</i> | бляшечная форма ОСД | 83* (20–103) | 30 (14–104) | 20 (19–23) |
| | атрофодермия Пазини–Пьерини | 116** (59–447) | 53 (13–91) | 20 (19–23) |
| | склероатрофический лихен | 46* (34–142) | 24 (15–77) | 20 (19–23) |

Примечание: результат представлен в виде медианы (25-75-й процентиля). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ при сравнении с соответствующим показателем нормы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При бляшечной форме ОСД в очаге патологических изменений выявлен дисбаланс показателей врожденного иммунитета на уровне экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF-α*, проявляющийся в снижении *TLR2*, увеличении экспрессии генов *HBD-1* и *TNF-α* в сравнении с кожей здоровых доноров. Можно предположить, что снижение экспрессии гена *TLR2* является следствием патологического процесса, происходящего в коже больных с ОСД, и свидетельствует о выраженном нарушении процессов распознавания патогенов и эндогенных лигандов.

На сегодняшний день уже известно, что в основе развития очаговой склеродермии лежит нарушение функции фибробластов. Последние синтезируют большое количество незре-

лого коллагена. Исследованиями последних десятилетий доказано, что в процессах образования фиброза в дерме активную роль играют цитокины: провоспалительные, трансформирующие, тромбоцитарные и фибробластные факторы роста.

Известно, что провоспалительные цитокины, и в частности *TNF-α*, не только принимают участие в развитии воспаления, но и обладают фиброзогенным действием.

Присутствие *TNF-α* в сыворотке больных ОСД положительно коррелирует с серологическим наличием антител к гистонам, к одноцепочечной ДНК (ssDNA), и *TNF-α* по праву рассматривают в роли маркера, свидетельствующего о тяжести течения ОСД [13]. Однако увеличение экспрессии гена *TNF-α* напрямую не опосредовано *TLR2*-зависимыми механизмами, так как при ОСД наблюдается значительное снижение экс-

прессии гена *TLR2* в коже (рисунок). Как известно, противомикробный пептид HBD-1, наряду с иммунорегуляторной активностью и противомикробным действием, участвует в процессах репарации [14]. Можно предположить, что гиперэкспрессия гена *HBD-1* в коже больных с ОСД изменяет синтез коллагена и способствует формированию фиброза. Увеличение экспрессии гена *HBD-1* можно рассматривать как один из возможных маркеров развития ОСД. При таких формах ОСД, как идиопатическая атрофодермия Пазини-Пьерини, ограниченная форма в сочетании со склероатрофическим лихеном выявлено достоверное увеличение экспрессии этого гена именно в непораженных участках кожи (таблица). В очаге патологического процесса экспрессия гена *HBD-1* увеличена, но недостоверно, что может быть обусловлено небольшой выборкой пациентов исследуемых групп. Полученные результаты позволяют проанализировать роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе очаговой склеродермии, а также в

комплексе с клиническими показателями могут быть использованы для прогноза течения ОСД и оценки эффективности проводимой терапии.

ВЫВОДЫ

В патологически измененных очагах кожи при ограниченной склеродермии выявлены нарушения врожденных механизмов защиты на уровне экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF-α*, следствием чего может быть нарушение процессов распознавания патогенов и эндогенных лигандов, индукция локального воспаления и возможная стимуляция формирования фиброза. Полученные результаты об увеличении экспрессии гена противомикробного пептида HBD-1 в непораженных участках кожи больных с ограниченной формой ограниченной склеродермии можно рассматривать как один из возможных маркеров развития этого дерматоза.

Литература

- Хамаганова И. В., Дворников А. С. Эндокринные нарушения при ограниченной склеродермии. Тер. архив. 2005; 10: 39–44.
- Болотная Л. А., Шахова Ф. Б., Сербина И. М. Новое в патогенезе и терапии ограниченной склеродермии. Вестн. дерматол. и венерол. 2004; 2: 31–4.
- Довжанский С. И. Клинико-иммунологические параллели при ограниченной и системной склеродермии. Рос. журн. кожн. и венерич. бол. 2002; 4: 26–9.
- Скрипкин Ю. К., Мордовцев В. Н., редакторы. Кожные и венерические болезни. Руководство для врачей: в 2 т. М.: Медицина; 1999. 2: 457–500.
- Скрипкин Ю. К., Бутов Ю. С., Иванов О. Л., редакторы. Дерматовенерология. Национальное руководство М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. С. 749.
- Yamamoto T, Nakane T, Osaki T. The mechanism of mononuclear cell infiltration in oral lichen planus: the role of cytokines released from keratinocytes. J Clin Immunol. 2000 Jul; 20 (4): 294–305.
- Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 749 с.
- Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. 640 с.
- Bhattacharyya S, Varga J. Emerging roles of innate immune signaling and toll-like receptors in fibrosis and systemic sclerosis. Curr Rheumatol Rep. 2015 Jan; 17 (1): 474.
- Ганковская О. А., Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В. и др. Роль Toll-подобных рецепторов и дефенсинов в противомикробной защите урогенитального тракта женщин. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 2008; 1: 46–50.
- Сомова О. Ю., Ганковская О. А., Лавров В. Ф. и др. Динамика экспрессии молекул TLR9-опосредованного сигнального пути эпителиальными клетками цервикального канала под действием вируса простого герпеса 2 типа in vitro. Рос. иммунол. журн. 2011; Т. 5 (14) 2: 129–34.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999. 459 с.
- Hasegawa M, Sato S, Nagaoka T, Fujimoto M, Takehara K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. Dermatology. 2003; 207 (2): 141–7.
- Gomes Pde S, Fernandes MH. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. J Oral Pathol Med. 2010 Jan; 39 (1): 1–9.

References

- Khamaganova IV, Dvornikov AS. Endocrine disturbances in circumscribed scleroderma. Ter Arkh. 2005; 77 (10): 39–44. Russian.
- Bolotnaya LA, Shakhova FB, Serbina IM. Novoe v patogeneze i terapii ogranichennoy sklerodermii. Vestn Dermatol Venerol. 2004; 2: 31–4. Russian.
- Dovzhanskiy SI. Kliniko-immunologicheskie paralleli pri ogranichennoy i sistemnoy sklerodermii. Ross Zh Kozhn Venerich Bol. 2002; 4: 26–9. Russian.
- Skripkin YuK, Mordovtsev VN, editors. Kozhnye i venericheskie bolezni. Rukovodstvo dlya vrachey: in 2 vol. M.: Meditsina; 1999. 2: 457–500. Russian.
- Skripkin YuK, Butov YuS, Ivanov OL, editors. Dermatovenerologiya. Natsional'noe rukovodstvo. Moscow: Geotar-Media; 2013. P. 749. Russian.
- Yamamoto T, Nakane T, Osaki T. The mechanism of mononuclear cell infiltration in oral lichen planus: the role of cytokines released from keratinocytes. J Clin Immunol. 2000 Jul; 20 (4): 294–305.
- Yarilin A. A. Immunology. Moscow: Geotar-Media, 2010. 749 c. Russian.
- Koval'chuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RYa. Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obshhey immunologii. Moscow: Geotar-Media; 2011. 640 p. Russian.
- Bhattacharyya S, Varga J. Emerging roles of innate immune signaling and toll-like receptors in fibrosis and systemic sclerosis. Curr Rheumatol Rep. 2015 Jan; 17 (1): 474.
- Gankovskaya OA, Koval'chuk LV, Gankovskaya LV. et al. Role of Toll-like receptors and defensins in antimicrobial protection of urogenital tract in females. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2008 Jan-Feb; 1: 46–50. Russian.
- Somova OYu, Gankovskaya OA, Lavrov VF, et al. Dinamika ekspressii molekul TLR9-oposredovannogo signal'nogo puti epiteliial'nymi kletkami tservikal'nogo kanala pod deystviem virusa prostogo gerpesa 2 tipa in vitro. Ross Immunol Zh. 2011; Vol. 5 (14) 2: 129–34. Russian.
- Glantz S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow: Praktika; 1999. 459 p. Russian.
- Hasegawa M, Sato S, Nagaoka T, Fujimoto M, Takehara K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. Dermatology. 2003; 207 (2): 141–7.
- Gomes Pde S, Fernandes MH. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. J Oral Pathol Med. 2010 Jan; 39 (1): 1–9.

ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И У ДЕТЕЙ С ГИПЕРТРОФИЕЙ АДЕНОИДНЫХ ВЕГЕТАЦИЙ

М. Р. Богомилский¹, О. А. Свитич^{1✉}, В. А. Ганковский², И. В. Рахманова¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Научный центр здоровья детей, Москва

Были изучены уровни экспрессии генов Toll-подобных рецепторов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и генов противомикробных пептидов *HBD1*, *HBD2* и *HNP1*, участвующих в реализации врожденного иммунитета, у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций II и III степени и здоровых детей. Пациентов разделили на 3 группы: тех, кому была показана консервативная терапия (группа I, 39 участников), тех, кому была произведена аденотомия (группа II, 38 участников), и контрольную группу (33 участника). В качестве клинического материала использовали соскоб эпителиальных клеток слизистой полости носа (группа I и контроль) и соскоб со слизистой глоточной миндалины (группа II). Достоверных различий в экспрессии генов по типу биологического материала не наблюдали. Уровни экспрессии изучаемых генов в группе I не отличались достоверно от показателей контрольной группы. В группе II было отмечено достоверное увеличение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* (в 15,4 и 10,3 раза соответственно при $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, при этом уровень экспрессии гена *TLR9* ниже в 5 раз, гена *HBD1* — в 33,4 раза, *HBD2* — в 21 раз, *HNP1* — в 3,4 раза. Такие дефекты защитных механизмов могут вести к осложнениям заболевания и могут являться дополнительным показанием к хирургической операции.

Ключевые слова: гипертрофия аденоидных вегетаций, эндоскопическая аденотомия, врожденный иммунитет, Toll-подобные рецепторы, противомикробные пептиды, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *HBD1*, *HBD2*, *HNP1*

✉ Для корреспонденции: Оксана Анатольевна Свитич
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1; svitichoa@yandex.ru
Статья получена: 14.09.2015 Статья принята в печать: 22.10.2015

INNATE IMMUNITY FEATURES IN HEALTHY CHILDREN AND IN CHILDREN WITH ADENOID HYPERTROPHY

Bogomilsky MR¹, Svitich OA^{1✉}, Gankovskiy VA², Rakhmanova IV¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Scientific Center of Children's Health, Moscow

In this study we examined expression levels of *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* genes and *HBD1*, *HBD2* and *HNP1* antimicrobial peptides genes, which are part of the innate immunity, in children with grade II and grade III adenoid hypertrophy and healthy children. The patients were divided into three groups: those with indications for conservative treatment (group I, 39 participants), those with prior adenoidectomy (group II, 38 participants) and healthy controls (33 participants). Clinical material was presented by epithelial cells scraped from nasal mucosa (group I and control group) and pharyngeal tonsils scrapes (group II). No significant difference in gene expression based on the type of biological material was observed. The expression levels of the genes inspected in group I did not differ significantly from those in the control group. Group II displayed a significantly increased expression of *TLR2* and *TLR4* genes (15.4 and 10.3 times respectively with $p < 0.05$) in comparison with the control group, with *TLR9* gene expression level being 5 times lower, *HBD1* gene expression — 33.4 times lower, *HBD2* gene expression — 21 times lower, *HNP1* gene expression — 3.4 times lower. Such defects in defense mechanisms can lead to disease complications and be an additional indication for surgery.

Keywords: adenoid hypertrophy, endoscopic adenoidectomy, innate immunity, Toll-like receptors, antimicrobial peptides, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *HBD1*, *HBD2*, *HNP1*

✉ Correspondence should be addressed: Oksana Svitich
1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997; svitichoa@yandex.ru
Received: 14.09.2015 Accepted: 22.10.2015

Заболевания лимфоглоточного кольца Вальдейра–Пирогова являются актуальной проблемой в детской оториноларингологии, [1, 2]. Отмечается тенденция к увеличению частоты встречаемости гипертрофии глоточной миндалины у детей, что в свою очередь ведет к увеличению количества оперативных вмешательств [3]. На вопрос, является ли приоритетным хирургический или консервативный метод лечения, по-прежнему нет однозначного ответа [4].

Гипертрофия аденоидных вегетаций (гипертрофия АВ) сопровождается частыми ОРВИ, нарушением носового дыхания, различными формами средних отитов. В лимфоидной ткани носоглотки формируется мукозальный иммунитет ЛОР-орга-

нов, и разработка и внедрение в клиническую практику молекулярно-генетических методов исследования врожденного иммунитета позволит сформулировать и научно обосновать новые подходы к иммунотропной терапии с учетом индивидуальных особенностей иммунной системы пациента.

В последние годы достигнуты успехи в изучении роли распознающих рецепторов врожденного иммунитета — Toll-подобных рецепторов (TLR) и их роли в патогенезе различных заболеваний человека [5, 6]. Распознавание патогенов и эндогенных лигандов TLR запускает активацию генов цитокинов, противомикробных пептидов (ПМП) и других молекул [5, 7]. Дефекты в системе TLR могут привести к развитию тяжелых

инфекций, аутоиммунных заболеваний, аллергопатологий. Целью нашего исследования являлся анализ уровней экспрессии генов распознающих рецепторов (*TLR2*, *TLR4*, *TLR9*) и противомикробных пептидов (альфа-дефенсин — *HBD1* и бета-дефенсин — *HBD2* и *HNP1*) у здоровых детей и у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Критериями для включения в исследование являлось наличие у детей в возрасте от 2 до 7 лет гипертрофии АВ II и III степени, отсутствие на момент исследования вирусной инфекции, острых воспалительных заболеваний и обострения хронических заболеваний, аллергопатологий, а также отсутствие аденоидита в течение месяца до начала исследования. Нами были обследованы 110 детей, находившихся на лечении в клинико-диагностическом центре и ЛОР-отделении Морозовской детской городской клинической больницы (г. Москва).

Пациенты с гипертрофией АВ были разделены на две группы в зависимости от клинических проявлений. В одну группу включили 39 пациентов, у которых преимущественно отмечалось затруднение носового дыхания, гнусавость, храп в ночное время, частые ОРВИ (группа I). Эти пациенты нуждались только в консервативной терапии. В другую группу включили 38 пациентов, у которых наблюдались частые острые средние отиты, экссудативные средние отиты, снижение слуха (группа II). У 95 % детей этой группы при эндоскопическом исследовании носоглотки определялся блок глоточных устьев слуховых труб. Этим детям произвели эндоскопическая аденотомию под интубационным наркозом. В контрольную группу включили 33 здоровых ребенка в возрасте от 2 до 7 лет I группы здоровья. Пациенты болели острыми вирусными заболеваниями не чаще чем 1–2 раза в год [8].

Всем пациентам было проведено эндоскопическое исследование полости носа и носоглотки жесткими и гибкими оптическими системами, которое позволяет оценить форму носоглотки и расположенной в ней лимфоидной ткани, пролабирование в задние отделы полости носа, предлежание к хоанам, ее расположение в носоглотке по отношению к глоточным устьям слуховых труб. Также была произведена тимпанометрия. Все пациенты были обследованы ЛОР-аллергологом для исключения аллергопатологии.

Поскольку эпителий является полноправным участником системы врожденного иммунитета [9], в качестве клинического материала в работе использовали соскоб эпителиальных клеток слизистой полости носа, полученный с помощью «цитощеточки», тип D (для группы I и контрольной группы), а также соскоб со слизистой глоточной миндалины, полученный во время проведения эндоскопической аденотомии (для группы II). Получение и обработку клинического материала проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Забор, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики» Центрального НИИ эпидемиологии [10].

Для определения уровней экспрессии генов *TLR* и генов противомикробных пептидов выделяли РНК из биологического материала при помощи комплекта реагентов «РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия). Выделенную РНК использовали

как матрицу для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции с использованием набора «Реверта» («ИнтерЛабСервис», Россия). На последнем этапе ставили полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ). Последовательность праймеров для генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *HBD1*, *HBD2*, *HNP1* подбирали с помощью программы Vector NTI 8.0, анализируя последовательности, полученные из электронной базы данных GenBank. Реакцию проводили в амплификаторе АНК-32 («Синтол», Россия). Все реакции проводили в строгом соответствии с протоколами фирм-производителей. Последовательность операций представлена на рисунке 1.

Статистический анализ проводили с использованием общепринятых статистических методов [11]. Полученные данные обрабатывали на персональном компьютере с помощью программ BioStat и Microsoft Excel. Для сравнения двух групп использовали критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ показателей врожденного иммунитета у пациентов с гипертрофией АВ II и III степени, которым было показано консервативное лечение (группа I), не выявил достоверных различий в уровнях экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *HBD1*, *HBD2*, *HNP1* в сравнении с показателями контрольной группы. У детей группы II наблюдалось достоверное увеличение экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, отвечающих за распознавание бактериальных патогенов: экспрессия гена *TLR2* была увеличена в 15,4 раза ($p < 0,05$), *TLR4* — в 10,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2, А; таблица). Уровень экспрессии гена *TLR9* в этой группе был ниже в 5 раз, гена *HBD1* — в 33,4 раза, *HBD2* — в 21 раз, *HNP1* — в 3,4 раза по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 2, Б; таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

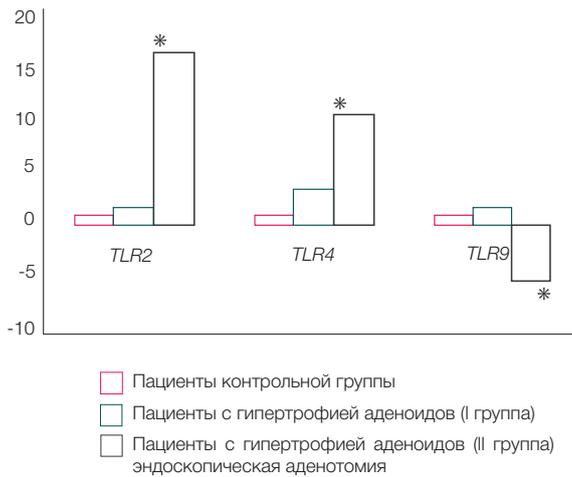
Полученные для группы I данные представляются важными, так как в комплексе с другими методами обследования позволяют обосновать консервативное лечение гипертрофии аденоидных вегетаций. Отсутствие изменений в показателях врожденного иммунитета слизистой оболочки полости носа может явиться важным критерием для сохранения глоточной миндалины. Однако, сохраняя свою функцию, гиперплазированная лимфоидная ткань носоглотки в ряде случаев может быть причиной развития патологических изменений, носящих как местный характер (ринит, острый синусит, средний отит и др.), так и общий (нарушение обмена веществ, замедленный рост ребенка, гипоксия и др.) [1]. В этом случае следует применять хирургический метод лечения — аденотомию с помощью эндоскопической техники.

Выявлен дефект в механизмах защиты слизистой оболочки полости носа у детей группы II. Резкое увеличение уровня экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* сочетается сниженной экспрессией генов эффекторных молекул противомикробных пептидов. Дисбаланс в распознающих и эффекторных моле-



Рис. 1. Последовательность операций по определению экспрессии генов Toll-подобных рецепторов и противомикробных пептидов

А - Экспрессия генов TLRs



Б - Экспрессия генов ПМП

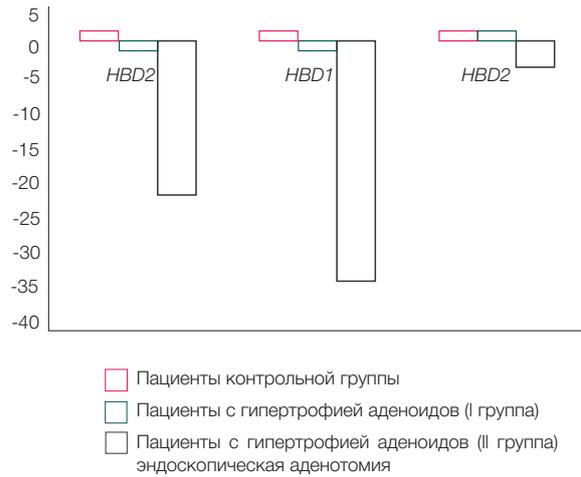


Рис. 2. Экспрессия генов молекул врожденного иммунитета в клетках слизистой оболочки полости носа у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций. (А) Экспрессия генов TLRs. (Б) Экспрессия генов противомикробных пептидов. По оси ординат представлены показатели экспрессии генов в относительных единицах, определяемых как отношение абсолютного значения количества копий исследуемого гена в группах I и II к таковому у здоровых детей, принятым за единицу. *р <0,05

кулах врожденного иммунитета может быть одной из причин развития аденоидита, гипертрофии лимфоидной ткани носоглотки, которая в свою очередь может приводить к блоку глоточных устьев слуховых труб и средним отитам. Сниженная экспрессия гена *TLR9* в группе II может свидетельствовать о дефекте противовирусной защиты слизистой оболочки, поскольку лигандами для рецептора *TLR9* является ДНК вирусов. Выявленные изменения в показателях врожденного иммунитета слизистой оболочки полости носа могут служить дополнительными причинами проведения поднаркозной эндоскопической аденотомии.

Необходимо отметить, что уровень экспрессии изучаемых генов не различался по типу образца клинического материала (рис. 3). Наши результаты согласуются с данными Lesmeister M., который выявил уровни экспрессии генов всех десяти Toll-подобных рецепторов в эпителии слизистой небных и глоточной миндалин [12]. В работе В. П. Быковой и соавт. с помощью иммуногистохимического метода продемонстрирована экспрессия генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* в эпителиальных структурах небных и глоточной миндалин, удаленных по поводу гипертрофии, хронического тонзиллита и хронического аденоидита [13]. По мнению этих авторов, TLR отводится ведущая роль в иммунологической защите слизистых ЛОР-органов.

На основании наших результатов можно представить схематически роль факторов врожденного иммунитета в па-

тогенезе воспалительных заболеваний ЛОР-органов (рис. 4). Инфекционные агенты через активацию TLRs в клетках слизистой полости носа и лимфоидного кольца приводят к продукции эпителиальными клетками важных эффекторных молекул — дефенсинов [14]. Дефенсины, оказывая прямое противомикробное действие, защищают слизистые от патогенов [15]. Гиперэкспрессия генов TLR небезопасна для организма [16].

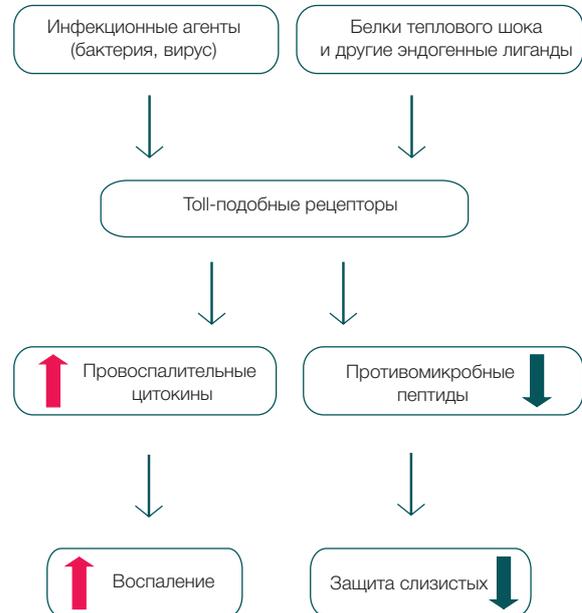


Рис. 4. Роль факторов врожденного иммунитета в патогенезе заболеваний ЛОР-органов

ВЫВОДЫ

Значительное увеличение уровней экспрессии генов TLR с одновременным снижением экспрессии генов противомикробных пептидов приводит к снижению защиты слизистых оболочек и может быть одной из причин развития аденоидитов и средних отитов. Это может быть дополнительным обоснованием хирургического метода лечения.

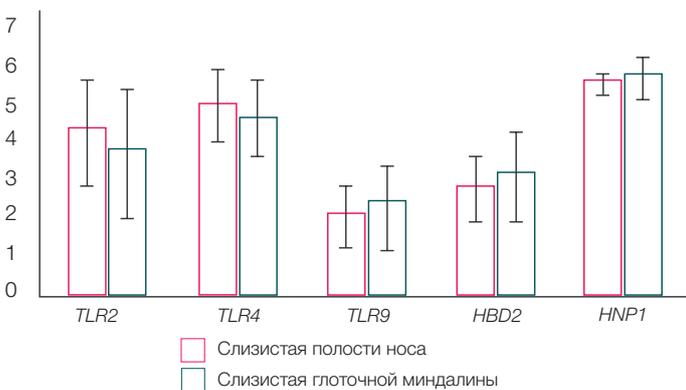


Рис. 3. Экспрессия генов молекул врожденного иммунитета в клетках слизистой оболочки полости носа и слизистой глоточной миндалины у детей группы I. По оси ординат представлены показатели экспрессии генов в Ig копий кДНК по отношению к Ig 1 млн количества копий актина.

Литература

1. Богомилский М. Р., Чистякова В. Р. Детская оториноларингология: учебник для вузов. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. 576 с.
2. Крюков А. И., Архангельская И. И., Кунельская В. Я., Ивойлов А. Ю., Мачулин А. И. Лечебно-диагностические критерии выбора метода лечения аденоидных вегетаций как очага хронической инфекции в детском возрасте. Вестник оториноларингологии. 2008; 3: 29–31.
3. Гаращенко Т. И., Зеленкова И. В., Алферова М. В. Иммуномодуляторы топического применения в профилактике и лечении хронического аденоидита у детей. Вестник оториноларингологии. 2011; 2: 62–5.
4. Быкова В. П., Бруевич О. А. и др. Аденоиды как индуктивный орган мукозального иммунитета верхних дыхательных путей. Российская ринология. 2005; 2: 175–6.
5. Janeway C, Travers J, Walport V, Shlomchik MJ. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th ed. New-York: Garland Science; 2005.
6. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. 640 с.
7. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 752 с.
8. Шабалов Н. П. Детские болезни: учебник в 2 т. 5-е издание. Т. 1. СПб.: Питер; 2002. 832 с.
9. Ooi EH, Wormald PJ, Tan LW. Innate immunity in the paranasal sinuses. American J. of Rinology. 2008; 1: 13–9.
10. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики. М., 2012. 32 с.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999. 459 с.
12. Brook I. Effects of antimicrobial therapy on the microbial flora of the adenoids. J Antimicrob Chemother. 2003; 51 (6): 1331–7.
13. Гусева Е. Д., Файзуллина Р. М. Особенности мукозального иммунитета у детей с аллергическим ринитом. Вестник оториноларингологии. 2012; 6: 33–5.
14. Ковальчук Л. В., Свитич О. А., Ганковская Л. В. и др. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2012; 2: 147–53.
15. Свитич О. А., Ганковская Л. В., Рахманова И. В. и др. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена DEFB 1, с гипертрофией аденоидных вегетаций. Вестник РГМУ. 2012; 3: 59–62.
16. Бахарева И. В., Ганковская Л. В., Ковальчук Л. В. и др. Прогностическое значение экспрессии генов молекул врожденного иммунитета (TLR2, TLR4 и HBD1) при невынашивании беременности. Лечащий врач. 2012; 9: 84–91.

References

1. Bogomilskiy MR, Chistyakova VR. Detskaya otorinolaringologiya: uchebnik dlya vuzov. 2nd ed. M.: GEOTAR-Media; 2007. 576 p. Russian.
2. Kryukov AI, Arkhangelskaya II, Kunel'skaya VYa, Ivoylov AYU, Machulin AI. Lechebno-diagnosticheskie kriterii vybora metoda lecheniya adenoidnykh vegetatsiy kak ochaga khronicheskoy infektsii v detskom vozraste. Vestnik otorinolaringologii. 2008; 3: 29–31. Russian.
3. Garaschenko TI, Zelenkova IV, Alferova MV. Immunomodulatory topicheskogo primeneniya v profilaktike i lechenii khronicheskogo adenoidita u detei. Vestnik otorinolaringologii. 2011; 2: 62-5. Russian.
4. Bykova VP, Bruevich OA., i soavt. Adenoidy kak induktivniy organ mukozal'nogo immuniteta verkhnikh dykhatel'nykh putey. Rossiyskaya rinologiya. 2005; 2: 175–6. Russian.
5. Janeway C, Travers J, Walport V, Shlomchik MJ. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th ed. New-York: Garland Science; 2005.
6. Kovalchuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RYa. Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obschey immunologii. M.: GEOTAR-Media; 2011. 640 p. Russian.
7. Yarilin AA. Immunologiya. M.: GEOTAR-Media; 2010. 752 p. Russian.
8. Shabalov NP. Detskie bolezni: uchebnik v 2 t. 5th ed. T. 1. SPb.: Piter; 2002. 832 p. Russian.
9. Ooi EH, Wormald PJ, Tan LW. Innate immunity in the paranasal sinuses. American J. of Rinology. 2008; 1: 13–9.
10. Tsentral'niy nauchno-issledovatel'skiy institut epidemiologii. Vzyatie, transportirovka, khranenie klinicheskogo materiala dlya PtsR-diagnostiki. M., 2012. 32 p. Russian.
11. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. M.: Praktika; 1999. 459 z. Russian.
12. Brook I. Effects of antimicrobial therapy on the microbial flora of the adenoids. J Antimicrob Chemother. 2003; 51 (6): 1331–7.
13. Guseva ED, Fayzullina RM. Osobennosti mukozal'nogo immuniteta u detey s al-lergicheskim rinitom. Vestnik otorinolaringologii. 2012; 6: 33–5. Russian.
14. Kovalchuk LV, Svitich OA, Gankovskaya LV, i soavt. Rol' Toll-podobnykh retseptorov v patogeneze infektsionnykh zabolevaniy cheloveka. Kurskiy nauchno-prakticheskii vestnik "Chelovek i ego zdorov'e". 2012; 2: 147–53. Russian.
15. Svitich OA, Gankovskaya LV, Rakhmanova IV, i soavt. Assotsiatsiya polimorfnykh markerov, lokalizovannykh v 5'-netarnsliuemyy oblasti gena DEFB 1, s gipertrofiei adenoidnykh vegetatsii. Vestnik RGMU. 2012; 3: 59–62. Russian.
16. Bakhareva IV, Gankovskaya LV, Kovalchuk LV, i soavt. Prognosticheskoe znachenie ekspressii genov molekul vrozhdenного immuniteta (TLR2, TLR4 i HBD1) pri nevyynashivaniy beremennosti. Lechaschiy vrach. 2012; 9: 84–91. Russian.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА ГЕНА *IL10* С РАЗВИТИЕМ ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО ОЛИГОАРТИКУЛЯРНОГО ВАРИАНТА ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

Л. Ш. Назарова¹✉, К. В. Данилко¹, В. А. Малиевский¹, Т. В. Викторова^{1,2}

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Целью исследования был поиск ассоциаций полиморфного локуса $-592C>A$ (rs1800872) гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ювенильного идиопатического артрита (ЮИА) у детей из Республики Башкортостан. Проведено генотипирование 107 детей с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА и 206 добровольцев контрольной группы методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и ПЦР в реальном времени. Установлено, что у пациентов с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА частота генотипа *CC* полиморфного локуса $-592C >A$ гена *IL10* значимо выше, чем в контрольной группе ($p = 0,033$). При стратификации по полу показано, что генотип *CC* и аллель *C* встречались значимо чаще, чем у здоровых добровольцев, только у девочек ($p = 0,042$ и $p = 0,025$ соответственно), но не у мальчиков с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА. Результаты исследования свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфного локуса $-592C>A$ гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА у детей из Республики Башкортостан.

Ключевые слова: персистирующий олигоартикулярный вариант ювенильного идиопатического артрита, ассоциация, ген *IL10*, полиморфный локус, rs1800872

✉ Для корреспонденции: Лилия Шамильевна Назарова
450005, Уфа, ул. З. Валиди, 47, корп. 2; lilinaz19@mail.ru
Статья поступила: 09.10.2015 Статья принята к печати: 12.11.2015

ASSOCIATION OF THE *IL10* GENE POLYMORPHISM WITH THE DEVELOPMENT OF PERSISTENT OLIGOARTICULAR JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS

Nazarova LSh¹✉, Danilko KV^{1,2}, Malievsky VA³, Viktorova TV^{1,4}

¹ Bashkortostan State Medical University, Ufa

² Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa

The aim of the study was to determine whether the *IL10* $-592C>A$ (rs1800872) polymorphism is associated with the development of persistent oligoarticular juvenile idiopathic arthritis (JIA) in children from Bashkortostan, Russia. Genotyping of 107 patients with persistent oligoarticular JIA and 206 healthy controls was performed by PCR-RFLP and real-time PCR methods. The *IL10* $-592CC$ genotype frequency was significantly higher in patients with persistent oligoarticular JIA than in controls ($p = 0,033$). After dividing the whole groups into subgroups based on gender there was found that the *IL10* $-592CC$ genotype and the *IL10* $-592C$ allele frequencies were significantly higher only in girls with persistent oligoarticular JIA in comparison to controls ($p = 0,042$ и $p = 0,025$, correspondingly). In this study we revealed the association of the *IL10* $-592C>A$ polymorphism with the development of persistent oligoarticular JIA in children from Bashkortostan, Russia.

Keywords: persistent oligoarticular juvenile idiopathic arthritis, association, *IL10* gene, polymorphism, rs1800872

✉ Correspondence should be addressed: Liliya Nazarova
Build. 2, 47, Z. Validi st., Ufa, Russia, 450005; lilinaz19@mail.ru
Received: 09.10.2015 Accepted: 12.11.2015

Согласно классификации Международной лиги ревматологических ассоциаций (ILAR) ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) — это артрит неустановленной этиологии, возникающий у детей до 16 лет и длящийся более 6 недель. Одним из наиболее распространенных вариантов ЮИА является олигоартикулярный, который характеризуется вовлечением в патологический процесс не более 4 суставов на протяжении первых 6 месяцев болезни и подразделяется на два подтипа в зависимости от последующего течения. Если у пациента число пораженных суставов не превышает 4 в течение всего периода заболевания, то такой олигоартикулярный вариант ЮИА обозначают как персистирующий, в противном случае — как распространившийся [1, 2]. Этиология олигоартикуляр-

ного варианта ЮИА до настоящего времени не установлена. Предполагается, что патологический процесс запускается воздействием на незрелую иммунную систему ребенка какого-то повсеместно распространенного агента окружающей среды, который, однако, пока точно не определен [2]. Вопрос о причинах, лежащих в основе повышенной предрасположенности к возникновению олигоартикулярного варианта ЮИА, также остается открытым. При этом данные отдельных исследований свидетельствуют о возможной роли ряда внешних (таких как отсутствие грудного вскармливания и неблагоприятные психосоциальные условия) и внутренних факторов, в частности молекулярно-генетических [2]. Несмотря на то что данное заболевание редко носит семейный характер, было показано,

что если у обоих близнецов развивается артрит, то 75 % таких пар конкордантны по типу его дебюта, и чаще всего это олигоартрит [3]. В ряде работ сообщается о наличии ассоциаций определенных аллелей генов главного комплекса гистосовместимости (HLA) I и II классов, а также некоторых полиморфных локусов генов семейства интерлейкинов (IL), таких как *TNFA*, *IL1A*, *IL1RN*, *IL2RA* и др., с повышенным риском развития олигоартрикулярного варианта ЮИА и/или особенностями его течения [4].

Согласно современным представлениям олигоартрикулярный и полиартрикулярный варианты ЮИА относятся к антиген-зависимым лимфоцитарно-опосредованным аутоиммунным заболеваниям, в патогенезе которых важную роль играют нарушения процессов приобретенного иммунитета [2, 5]. Предполагается, что образование аутоантигенов из тканей сустава ведет к активации аутореактивных Th- и Th17-клеток с последующим усилением образования провоспалительных цитокинов (таких как интерферон-гамма и IL17). В ответ на указанный процесс в норме происходит стимуляция продукции регуляторными Т-клетками IL10 — одного из основных противовоспалительных цитокинов, подавляющего высвобождение и функционирование провоспалительных медиаторов [5, 6]. При этом недостаточное его образование может способствовать формированию хронического артрита [5]. Так, было показано, что уровень секреции IL10 в культуре клеток цельной крови после стимуляции фитогемагглютинином и липополисахаридом у пациентов с системным вариантом ЮИА значимо ниже, чем в контрольной группе [7]. Кроме того, в ряде исследований на животных был установлен протективный эффект IL10 в отношении таких заболеваний, как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника и др. [6]. Известно также, что изменение продукции IL10 в 75 % случаев опосредовано генетическими факторами [8].

Ген *IL10* расположен на длинном плече хромосомы 1 (q31–q32). Наиболее изученными полиморфными локусами, лежащими в регуляторной области данного гена, являются соответствующие замены в следующих положениях: –1082G>A, –819C>T и –592C>A, при этом два последних абсолютно сцеплены между собой [9]. В ряде исследований показаны ассоциации данных полиморфных локусов и/или их гаплотипов с измененной продукцией IL10 *in vitro*, а также с рядом аутоиммунных заболеваний [9, 10]. Цель нашего исследования заключалась в поиске возможных ассоциаций генотипов и аллелей полиморфного локуса –592C>A (rs1800872) гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартрикулярного варианта ЮИА у детей из Республики Башкортостан.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Протокол работ был одобрен Этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета. В основную группу вошли 107 детей с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА после подписания ими или их родителями добровольного информированного согласия. Все пациенты прошли обследование и лечение в кардиоревматологическом отделении Республиканской детской клинической больницы (г. Уфа) в 2011–2014 гг. В качестве контрольной группы были подобраны 206 добровольцев без аутоиммунных заболеваний в анамнезе. Все участники исследования проживали на территории Республики Башкортостан.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [11]. Изучение полиморфного локуса –592C>A гена *IL10* проводили методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа полиморфизма длин рестрикционных

фрагментов (эндонуклеаза рестрикции RsaI, «СибЭнзим», Россия), верифицировали методом ПЦР в реальном времени с помощью праймеров и зондов фирмы «ДНК-Синтез» (Россия) на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США) [12]. Частоты генотипов и аллелей определяли с использованием программы Microsoft Excel. Для сравнения частот генотипов и аллелей в исследуемых группах рассчитывали точный двусторонний критерий Фишера — р(F) в программе WinPeri v.11.44. Для оценки риска развития заболевания использовали показатель отношения шансов (OR) и 95 % доверительный интервал (95 % CI) Baptista-Pike (программы Microsoft Excel, R v.3.2.0 с пакетом ORCI). Для проверки возможных моделей наследования и соответствия выборки ожидаемому по Харди–Вайнбергу применяли логистический регрессионный анализ (программа SNPStats [13]). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст больных с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА составил $7,8 \pm 0,41$ года, распределение по полу — 29,9 % мальчиков и 70,1 % девочек. В контрольной группе средний возраст — $18,23 \pm 0,07$ года, 39,8 % юношей и 60,2 % девушек. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса –592C>A гена *IL10* у больных с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА и в контрольной группе соответствовало ожидаемому по Харди–Вайнбергу ($p = 0,13$ и $p = 0,54$ соответственно).

При проведении сравнительного анализа полученных данных было установлено, что у пациентов с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА значимо чаще, чем в контрольной группе, встречался генотип CC ($p(F) = 0,033$; $OR = 1,675$, 95 % CI 1,053–2,688) (таблица).

Частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса –592C>A гена *IL10* в группах пациентов с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА и здоровых лиц из Республики Башкортостан

| Генотипы и аллели | Основная группа | | Контрольная группа | | p | OR (95 % CI) |
|---------------------------------|-----------------|------|--------------------|------|--------|---------------------|
| | Абс. ч. | % | Абс. ч. | % | | |
| CC | 62 | 57,9 | 93 | 45,2 | 0,033* | 1,675 (1,053–2,688) |
| CA | 35 | 32,7 | 88 | 42,7 | 0,089 | 0,652 (0,400–1,058) |
| AA | 10 | 9,4 | 25 | 12,1 | 0,571 | 0,747 (0,360–1,615) |
| C | 159 | 74,3 | 274 | 66,5 | 0,055 | 1,457 (1,000–2,106) |
| A | 55 | 25,7 | 138 | 33,5 | 0,055 | 0,687 (0,475–1,000) |
| Доминантная модель наследования | | | | | | |
| CC | 62 | 57,9 | 93 | 45,1 | 0,031* | 1 |
| CA+AA | 45 | 42,1 | 113 | 54,9 | | 0,60 (0,37–0,96) |

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку IL10 является одним из основных противовоспалительных цитокинов, изменению продукции которого придается большое значение в патогенезе ЮИА и других аутоиммунных заболеваний, а вариации в его секреции обусловлены в первую очередь генетическими факторами, нами был осуществлен поиск возможных ассоциаций полиморфного локуса —592C>A гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА. Отметим, что исследование данного полиморфного локуса у пациентов с ЮИА было предпринято в России впервые. В результате проведенного исследования выявлена ассоциация генотипа CC полиморфного локуса —592C>A гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА ($p(F) = 0,033$; $OR = 1,675$, $95\% CI 1,053–2,688$). Однако при разделении пациентов по полу значимые различия между основной и контрольной группами были установлены только для девочек, при этом маркером повышенного риска развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА у девочек оказался не только генотип CC, но и аллель C ($OR = 1,840$, $95\% CI 1,049–3,307$ и $OR = 1,712$, $95\% CI 1,098–2,706$ соответственно).

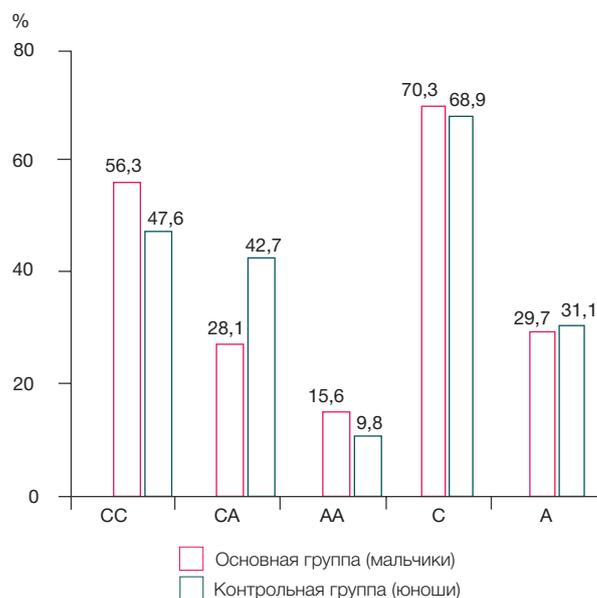
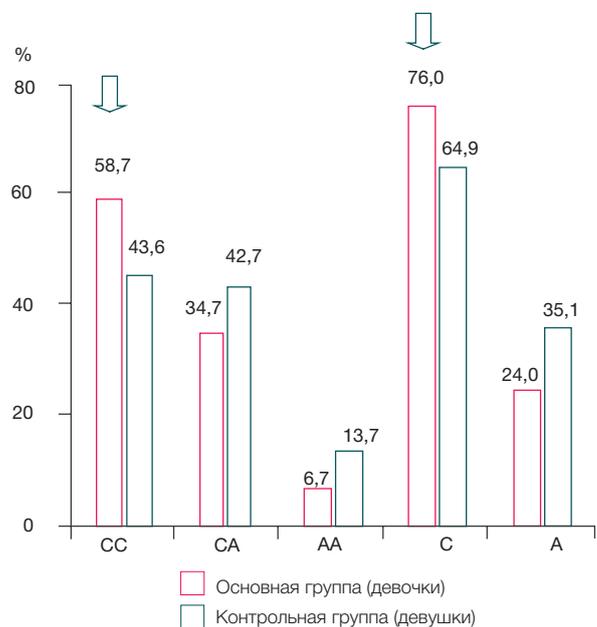
Метод логистической регрессии в обоих случаях указал на статистически достоверные различия между группами при использовании доминантной модели наследования (генотипы SA+AA против CC), где аллель A ассоциирован с пониженным риском развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА ($OR = 0,60$ и $OR = 0,54$ для общей группы больных и только для девочек соответственно).

Имеющиеся на сегодняшний день литературные данные о функциональном значении и наличии ассоциаций полиморфного локуса —592C>A гена *IL10* с развитием ЮИА и его вариантов неоднозначны и в основном приводятся для гаплотипов GCC, ACC и ATA полиморфных локусов —1082G>A, —819C>T и —592C>A промоторной области гена *IL10*. В частности, в работе ученых из Великобритании E. Crawley и соавт. было показано, что генотип ATA/ATA ассоциирован с более низкой по сравнению с остальными генотипами продукцией IL10 в культуре клеток цельной крови здоровых индивидов (англосаксонского происхождения) при стимуляции бактериальным липополисахаридом [14]. Кроме того, в моделях с применением временной трансфекции гаплотип ATA оказался связан с более слабой по сравнению с гаплотипом GCC транскрипционной активностью гена *IL10* [14]. Это отчасти может быть обусловлено присутствием аллеля A в позиции —1082, для которого ранее была установлена взаимосвязь со сниженной секрецией соответствующего белка в культуре лимфоцитов периферической крови здоровых индивидов при добавлении конканавалина A [15]. E. Crawley и соавт. было также показано, что при персистирующем олигоартикулярном варианте ЮИА генотипы, содержащие гаплотип ATA, встречались значительно реже, чем при распространенном олигоартикулярном варианте ЮИА, а генотип ATA/ATA — реже, чем при всех других вариантах ЮИА и у здоровых лиц, однако ввиду малочисленности групп индивидов с указанным генотипом статистический анализ не проводился [14]. Приведенные данные согласуются с результатами, полученными в нашей работе и свидетельствующими о том, что аллель A полиморфного локуса —592C>A гена *IL10* маркирует значимо более низкий риск развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА у девочек из Республики Башкортостан.

Кроме того, E. Crawley и соавт. было установлено, что у родителей пациентов с распространенным ЮИА генотипы, содержащие гаплотип ATA, встречались значительно чаще, чем у здоровых лиц, тогда как для родителей детей с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА статистически значимых различий выявлено не было [16]. В то же время при обследовании индивидов

Отмечалась также тенденция к повышению частоты аллеля C у больных, однако она не достигла уровня статистической значимости ($p(F) = 0,055$; $OR = 1,457$, $95\% CI 1,000–2,106$). Наиболее удачной моделью наследования оказалась доминантная (генотипы SA+AA против CC), согласно которой генотипы, содержащие аллель A, маркируют пониженный риск развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА ($p = 0,031$; $OR = 0,60$, $95\% CI 0,37–0,96$). При последующей стратификации по полу значимые различия были выявлены только для девочек. Так, генотип CC и аллель C встречались у девочек с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА значимо чаще, чем у девушек в контрольной группе ($p(F) = 0,042$; $OR = 1,840$, $95\% CI 1,049–3,307$ и $p(F) = 0,025$; $OR = 1,712$, $95\% CI 1,098–2,706$ соответственно) (рисунок).

При изучении моделей наследования наиболее удачной оказалась лог-аддитивная ($p = 0,023$, $OR = 0,60$, $95\% CI 0,38–0,94$), однако и для доминантной модели были получены статистически значимые результаты ($p = 0,038$; $OR = 0,54$, $95\% CI 0,30–0,97$). В группах мальчиков (основной и контрольной) различия в частотах генотипов и аллелей оказались статистически незначимыми ($p > 0,1$).



Частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса—592C>A гена *IL10* в группах пациентов с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА и здоровых лиц из Республики Башкортостан с учетом гендерных различий

европейского происхождения канадскими учеными К. Оен и соавт. не было обнаружено взаимосвязи полиморфных локусов -1082G>A, -819C>T и -592C>A гена *IL10* и их гаплотипов с риском развития всех вариантов ЮИА, а также каких-либо различий в распределении генотипов между пациентами с персистирующим и распространенным олигоартикулярными вариантами ЮИА [17]. М. Fife и соавт. также не обнаружили ассоциации полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* с развитием системного ЮИА у пациентов из Великобритании [9]. Противоречивость приведенных данных может быть обусловлена различиями в этнической принадлежности обследованных лиц, а также недостаточным объемом соответствующих выборок и свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения роли полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* в развитии ЮИА и его вариантов.

Литература

1. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007; 369 (9563): 767–78.
2. Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn L. *Textbook of pediatric rheumatology*. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
3. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear E, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs: Extent of clinical phenotype concordance. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (6): 1928–34.
4. Hinks A, Cobb J, Marion MC, Prahalad S, Sudman M, Bowes J. et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis. *Nat Genet*. 2013; 45 (6): 664–9.
5. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev*. 2011; 10 (8): 482–9.
6. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683–765.
7. Muller K, Herner EB, Stagg A, Bendtzen K, Woo P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998; 37 (5): 562–9.
8. Westendorp R. G., Langermans J. A., Huizinga T. W. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 1997; 349 (9046): 170–3.
9. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8 (5): R. 148.
10. Iyer SS., Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in

References

1. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007; 369 (9563): 767–78.
2. Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn L. *Textbook of pediatric rheumatology*. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
3. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear E, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs: Extent of clinical phenotype concordance. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (6): 1928–34.
4. Hinks A, Cobb J, Marion MC, Prahalad S, Sudman M, Bowes J. et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis. *Nat Genet*. 2013; 45 (6): 664–9.
5. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev*. 2011; 10 (8): 482–9.
6. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683–765.
7. Muller K, Herner EB, Stagg A, Bendtzen K, Woo P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998; 37 (5): 562–9.
8. Westendorp R. G., Langermans J. A., Huizinga T. W. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 1997; 349 (9046): 170–3.
9. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8 (5): R. 148.
10. Iyer SS., Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in

ВЫВОДЫ

Результаты нашего исследования свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА у детей из Республики Башкортостан. Показано, что генотип CC маркирует значимо повышенный риск развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА в целом, а с учетом гендерных особенностей — только у девочек. Кроме того, у девочек маркером повышенного риска персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА является также аллель С.

- inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012; 32 (1): 23–63.
11. Mathew CC. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. N.Y., L.: Human Press; 1984. P. 31–4.
 12. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. P. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut*. 2000; 46 (4): 540–5.
 13. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesto R, Morena V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22 (15): 1928–9.
 14. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42 (6): 1101–8.
 15. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24 (1): 1–8.
 16. Crawley E, Kon S, Woo P. Hereditary predisposition to low interleukin-10 production in children with extended oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40 (5): 574–8.
 17. Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, et al. Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44 (9): 1115–21.

- inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012; 32 (1): 23–63.
11. Mathew CC. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. N.Y., L.: Human Press; 1984. P. 31–4.
 12. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. P. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut*. 2000; 46 (4): 540–5.
 13. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesto R, Morena V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22 (15): 1928–9.
 14. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42 (6): 1101–8.
 15. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24 (1): 1–8.
 16. Crawley E, Kon S, Woo P. Hereditary predisposition to low interleukin-10 production in children with extended oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40 (5): 574–8.
 17. Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, et al. Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44 (9): 1115–21.

ВЫСОКАЯ ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ МУТАЦИЙ ГЕНА *CFTR*, АССОЦИИРОВАННЫХ С МУКОВИСЦИДОЗОМ, И МУТАЦИЙ ГЕНА *PAH*, АССОЦИИРОВАННЫХ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ

Д. Д. Абрамов¹✉, В. В. Кадочникова¹, Е. Г. Якимова¹, М. В. Белоусова¹, А. В. Маерле³, И. В. Сергеев¹, А. А. Рагимов², А. Е. Донников³, Д. Ю. Трофимов³

¹ Государственный научный центр "Институт иммунологии", Москва

² Центр крови Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова, Москва

³ ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

Целью исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *CFTR* и *PAH* у доноров первичной кроводачи. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации, обнаружены 29 носителей мутаций в гене *CFTR*, ассоциированных с развитием муковисцидоза (частота в выборке составила 2,9 %, или 1:34), и 32 носителя мутаций в гене *PAH*, ассоциированных с развитием фенилкетонурии (частота в выборке — 3,2 %, или 1:31). Всего обнаружен 61 носитель мутаций в генах *CFTR* и *PAH* (частота в выборке — 6,1 %, или 1:16). Полученные данные могут быть использованы для разработки оптимальных схем диагностики указанных наследственных заболеваний.

Ключевые слова: муковисцидоз, *CFTR*, фенилкетонурия, *PAH*, генотипирование, российская популяция

✉ Для корреспонденции: Дмитрий Дмитриевич Абрамов
115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2; d.d.abramov@mail.ru
Статья поступила: 11.09.2015 Статья принята к печати: 05.11.2015

HIGH CARRIER FREQUENCY OF *CFTR* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH CYSTIC FIBROSIS, AND *PAH* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH PHENYLKETONURIA IN RUSSIAN POPULATION

Abramov DD¹✉, Kadochnikova VV¹, Yakimova EG¹, Belousova MV¹, Maerle AV³, Sergeev IV¹, Ragimov AA², Donnikov AE³, Trofimov DY³

¹ National Research Centre – Institute of Immunology, Moscow

² Blood Centre of The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow

³ DNA-Technology LLC, Moscow

The study aimed to establish the frequency of common *CFTR* and *PAH* mutations in the Russian population in first time blood donors. Genotyping of 1000 first time blood donors who identify themselves as Russians and live permanently in the Russian Federation, detected 29 carriers of *CFTR* mutations associated with cystic fibrosis development (carrier frequency in the sample of subjects was 2.9 %, or 1:34) and 32 carriers of *PAH* mutations associated with phenylketonuria development (carrier frequency in the sample of subjects was 3.2 %, or 1:31). Altogether 61 carrier of *CFTR* and *PAH* mutations was found (carrier frequency in the sample of subjects was 6.1 %, or 1:16). The obtained data can be used for developing effective diagnostic guidelines for the above mentioned hereditary diseases.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR*, phenylketonuria, *PAH*, genotyping, Russian population

✉ Correspondence should be addressed: Dmitry Abramov
Build. 2, 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478; d.d.abramov@mail.ru
Received: 11.09.2015 Accepted: 05.11.2015

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз — наследственное заболевание (OMIM: 219700), связанное с нарушением ионного транспорта в эпителии и вызываемое мутациями в гене трансмембранного регулятора ионной проводимости (*CFTR*). Кодированный этим геном белок функционирует как цАМФ-зависимый хлорный канал, встроенный в мембрану клетки. Тип наследования муковисцидоза — аутосомно-рецессивный. Частота носительства мутаций, ассоциированных с развитием муковисцидоза, различается в зависимости от популяции и может варьировать от 1:90 для азиатских популяций до 1:29 для европейских популяций. В среднем с этим заболеванием среди европейцев рождается 1 человек на 2500–4500 населения.

Муковисцидоз — тяжелое системное заболевание, сопро-

вождающееся существенным снижением качества и продолжительности жизни. У больных МВ поражены многие органы, особенно выделяющие слизистый секрет: верхние и нижние дыхательные пути, поджелудочная железа, желчевыводящая система, кишечник, мужские половые органы, потовые железы. У некоторых больных при рождении возникает меконияльный илеус. У мужчин с МВ практически всегда отмечают азооспермию (отсутствие сперматозоидов в эякуляте) и бесплодие из-за двухсторонней аплазии семявыносящего протока (OMIM: 277180, Congenital bilateral absence of vas deferens — врожденное двухстороннее отсутствие семявыносящих протоков). Считается, что более 50 % мужчин, страдающих бесплодием и имеющих азооспермию или олигозооспермию тяжелой сте-

пени, являются носителями мутаций в гене *CFTR* [1, 2].

Фенилкетонурия (ФКУ) — наследственное заболевание обмена веществ, связанное с нарушением метаболизма аминокислот, главным образом фенилаланина. Без корректной терапии ФКУ сопровождается накоплением фенилаланина и его токсических продуктов в организме, что приводит к тяжелому поражению центральной нервной системы и нарушению умственного развития. Частота и распространенность заболевания варьирует от популяции к популяции. Самая высокая частота рождения ребенка с ФКУ отмечена среди отдельных цыганских популяций Словакии — 1 больной на 40 рождений, самая низкая — в Японии, менее 1 случая на 100 000 рождений. В России частота рождения ребенка с ФКУ составляет примерно 1 случай на 10 000 новорожденных, с частотой носительства по литературным данным примерно 1:50 [3, 4]. Заболевание связано с мутацией в гене *PAH*, кодирующем фенилаланингидроксилазу. Ген локализован на длинном плече хромосомы 12. На сегодняшний день в гене фенилаланингидроксилазы описано свыше 400 мутаций, частота и встречаемость которых характеризуется существенными межпопуляционными различиями, однако лишь несколько из них встречаются с частотой более 1 %. Среди жителей Европы и России наиболее распространена миссенс-мутация в 12-м экзоне гена *PAH* — R408W. Тип наследования фенилкетонурии — аутосомно-рецессивный [5].

В Российской Федерации с 2006 г. в рамках реализации приоритетного национального проекта «Здоровье» (приказ Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания») проводят неонатальный скрининг на пять подобных заболеваний, включая муковисцидоз и фенилкетонурию. Кровь берут из пятки новорожденных и исследуют с применением биохимических и молекулярно-генетических методов диагностики. В ряде стран, учитывая высокую частоту носительства при сравнительно небольшом количестве мажорных мутаций в генах *CFTR* и *PAH*, скрининг на наиболее частые мутации предлагают проводить всем парам, планирующим деторождение.

Целью данного исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *CFTR* и *PAH* у доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для настоящего исследования использовали коллекцию периферической крови 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских). Выделение ДНК проводили из 0,1 мл периферической крови при помощи набора реагентов «ПРО-БА-ГС-ГЕНЕТИКА» компании «ДНК-Технология» (Москва). Методика выделения основана на лизисе биоматериала с последующими сорбцией ДНК на носителе, отмывке примесей, элюцией ДНК с сорбента. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования либо хранили при -20°C . Концентрация ДНК, определенная на специализированном флуориметре Qubit (Invitrogen, США), составляла в среднем 50–100 мкг/мл.

Определение замен одиночных нуклеотидов проводили с использованием комплектов реагентов «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз Скрин», «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз — редкие мутации» и «Генетика наследственных заболеваний. Фенилкетонурия» компании «ДНК-Технология» (Москва). Принцип их действия основан на применении метода примыкающих проб (adjacent probes, kissing probes) [6, 7]. Указанные комплекты

реагентов позволяют выявлять 24 мутации в гене *CFTR*, ассоциированные с развитием муковисцидоза, и 16 мутаций в гене *PAH*, ассоциированные с развитием фенилкетонурии.

В каждый из комплектов реагентов входят амплификационные смеси для определения конкретной мутации. Каждая из смесей содержит праймеры, общие для дикого и мутантного вариантов нуклеотидной последовательности, один общий олигонуклеотид с гасителем флуоресценции и два сиквенс-специфичных олигонуклеотида (пробы), несущих различные флуорофоры. Олигонуклеотидные пробы, соответствующие тому или иному варианту последовательности, мечены различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта в одной пробирке.

При идентификации замен одиночных нуклеотидов проводили ПЦР, затем понижали температуру реакционной смеси для гибридизации полученной матрицы с олигонуклеотидными пробами. Определение генотипа выполняли после ПЦР и гибридизации путем измерения уровня флуоресценции в ходе температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидов и полученных матриц. Данное измерение проходило в режиме реального времени, в результате были получены кривые плавления (рисунок). Если анализируемый образец содержал только один вариант нуклеотидной последовательности гена, т. е. был гомозиготен по данному полиморфизму, температура плавления для пробы, образующей совершенный дуплекс, была существенно выше, нежели для пробы, образующей несовершенный дуплекс. Если же анализировали гетерозиготный образец, содержащий оба варианта нуклеотидной последовательности, оба варианта проб могли образовать совершенный дуплекс, поэтому температуры их плавления были практически одинаковы. Применяемый подход выгодно отличается от большинства молекулярно-генетических методов определения полиморфизмов одиночных нуклеотидов, в т. ч. использующих технологию TaqMan. Определение генотипа происходит дважды, независимо по двум каналам флуоресценции, что существенно повышает надежность генотипирования и практически нереализуемо другими способами.

Полимеразную цепную реакцию и определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с помощью детектирующего амплификатора DTrime («ДНК-Технология», Россия). Использовали следующий температурный режим амплификации: 94°C — 10 с, 64°C — 30 с в течение 50 циклов. По завершении реакции амплификации реакционную смесь остужали до 25°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Кривые плавления получали следующим образом: температуру реакции смеси повышали с 25°C до 75°C с шагом в 1°C , измеряя уровень флуоресценции на каждом шаге. В ходе выполнения работы применяли комплекс отечественного оборудования для автоматизирования основных этапов проведения исследований, что позволило проводить генотипирование до 100 образцов по 40 мутациям в день. В качестве подтверждающего метода проводили выборочное автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), использовали реактивы и рекомендации производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

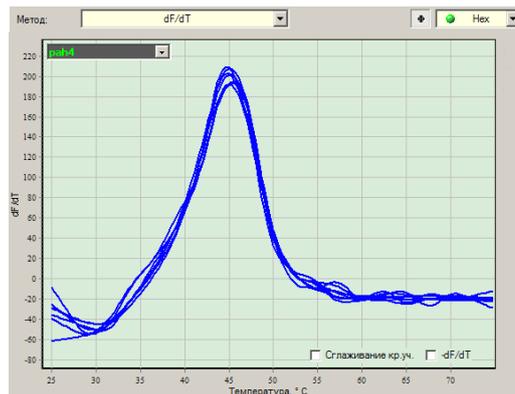
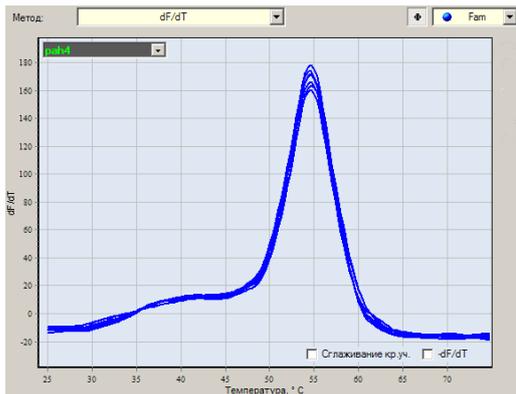
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты по частотам встречаемости 29 мутаций в гене *CFTR* и 18 мутаций в гене *PAH* у 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации) представлены в таблицах 1 и 2. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи были обнаружены 29 носителей мутаций в гене *CFTR*, ассоциированных с развитием муковисцидоза (частота в выборке

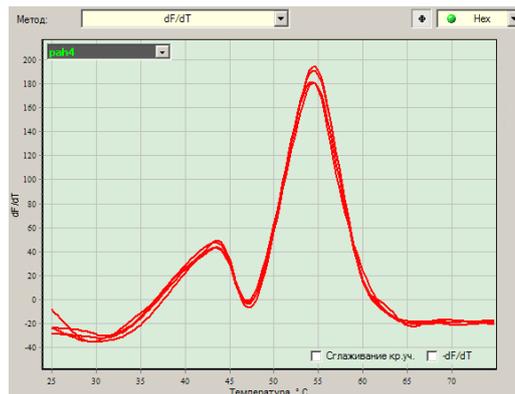
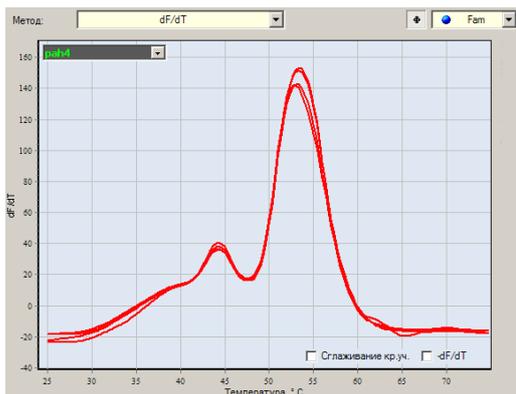
Флуорофор FAM

Флуорофор HEX

Гомозиготы
дикого типа



Гетерозиготы



Кривые плавления для различных вариантов генотипа, полученные при определении мутации R408W в гене PAH

Таблица 1. Выявленные гетерозиготы по мутациям в гене *CFTR* у 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских

| Мутация в гене <i>CFTR</i> | Выявлено гетерозигот |
|----------------------------|----------------------|
| F508del | 15 |
| R117H | 4 |
| N1303K | 3 |
| 3849+10kbC>T | 3 |
| dele2,3(21kb) | 1 |
| E92K | 1 |
| L138ins | 1 |
| K598ins | 1 |
| W1282X | 0 |
| G542X | 0 |
| 2143delT | 0 |
| 2184insA | 0 |
| 604insA | 0 |
| 621+1G>T | 0 |
| S1196X | 0 |
| 3821delT | 0 |
| 3667insTCAA | 0 |
| R334W | 0 |
| 394delTT | 0 |
| R553X | 0 |
| 1677delTA | 0 |
| 2183AA>G | 0 |
| 2789+5G>A | 0 |
| 3944delGT | 0 |

Таблица 2. Выявленные гетерозиготы по мутациям в гене *PAH* у 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских

| Мутация в гене <i>PAH</i> | Выявлено гетерозигот |
|---------------------------|----------------------|
| R408W | 24 |
| R158Q | 2 |
| R261Q | 2 |
| L48S | 1 |
| Y414C | 1 |
| IVS4+5G>T | 1 |
| IVS10nt546 | 1 |
| G188D | 0 |
| R252W | 0 |
| R261X | 0 |
| E280K | 0 |
| P281L | 0 |
| F331S | 0 |
| c.836C>T | 0 |
| IVS2+5G>C | 0 |
| IVS12+1G>A | 0 |

составила 2,9 %, или 1:34), и 32 носителя мутаций в гене *PAH*, ассоциированных с развитием фенилкетонурии (частота в выборке — 3,2 %, или 1:31).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из 29 доноров первичной кроводачи, для которых были выявлены гетерозиготы по мутациям в гене *CFTR*, 19 были носите-

лями фенотипически «тяжелых» мутаций, ассоциированных со значительной степенью поражения поджелудочной железы при заболевании муковисцидозом. Наличие подобных мутаций I–II классов приводит к нарушению синтеза или созревания (фолдинга) белка. У 10 доноров обнаруженные мутации в гене *CFTR* относились к IV и V классам с фенотипически более «мягкими» проявлениями, приводящими к нарушениям проводимости хлорных каналов и транспорта белка соответственно [8]. Следует отметить, что в нашем исследовании не было ни одного случая выявления сочетанного носительства мутаций, ассоциированных как с муковисцидозом, так и с фенилкетонурией.

По данным литературных источников для российской популяции частота носительства мутаций, ассоциированных с муковисцидозом, варьирует от 1:26 до 1:44, что в целом сопоставимо с подобной характеристикой для стран Европы [9–11]. В свою очередь, частота носительства мутаций, ассоциированных с фенилкетонурией, составляет в среднем 1:50, что также соответствует другим европейским популяциям [3–5]. Результаты настоящего исследования в целом согласуются с опубликованными данными для российской популяции, при этом нами была получена несколько более высокая частота носительства мутаций, ассоциированных с фенилкетонурией.

Литература

- Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebek AA. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest*. 2005 Aug; 115 (8): 2039–46.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008 May; 7 (3): 179–96.
- Аничкина А. А., Гаврилюк А. П., Тверская С. М., Поляков А. В. Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией. *Мед. ген*. 2003; 2 (4): 175–81.
- Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat*. 2003 Apr; 21 (4): 345–56.
- Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 Sep; 82 (18): 6221–5.
- Кофиади И. А., Ребриков Д. В. Методы детекции однонуклеотид-

References

- Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebek AA. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest*. 2005 Aug; 115 (8): 2039–46.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008 May; 7 (3): 179–96.
- Anichkina AA, Gavrilyuk AP, Tverskaya SM, Poliakov AV. Analiz naibolee chasto vstrechayushchikhsya mutatsiy v gene fenilalaningidroksilazy u bolnykh fenilketonuriei. *Med Gen*. 2003; 2 (4): 175–81. Russian.
- Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat*. 2003 Apr; 21 (4): 345–56.
- Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 Sep; 82 (18): 6221–5.
- Kofidi IA, Rebrikov DV. Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe. *Genetika*. 2006 Jan; 42 (1): 22–32. Russian.

ВЫВОДЫ

В результате исследования были установлены частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *CFTR* и *PAH* у здоровых индивидов. Всего обнаружен 61 носитель мутаций в генах *CFTR* и *PAH* (частота в выборке составила 6,1 %, или 1:16). Подобная высокая частота распространения носительства наследственных заболеваний позволяет сделать предположение о необходимости проведения не только неонатального скрининга, но и молекулярно-генетической диагностики в составе комплекса мероприятий при планировании беременности, в том числе при решении вопроса о применении вспомогательных репродуктивных технологий для преодоления бесплодия. Наиболее подходящей платформой для таких исследований является ПЦР в реальном времени. Данный подход открывает принципиально новые возможности для массового высокопропускного генотипирования, позволяет роботизировать работу лаборатории при высокой надежности получаемых результатов.

- ных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. *Генетика*. 2006; 42 (1): 22–32.
- Сергеев И. В., Хаитов М. Р., Трофимов Д. Ю. и др. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа. *Физиол. и патол. иммун. системы*. 2009; 13 (4): 21–5.
- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993 Jul 2; 73 (7): 1251–4.
- Кусова З. А., Петрова Н. В., Васильева Т. А. и др. Результаты массового скрининга новорожденных на муковисцидоз в Москве. *Вопр. соврем. педиатр*. 2010; 9 (6): 26–30.
- Петрова Н. В., Тимковская Е. Е., Зинченко Р. А., Гинтер Е. К. Анализ частоты некоторых мутаций в гене *CFTR* в разных популяциях России. *Мед. ген*. 2006; 5 (2): 32–9.
- Brice P, Jarrett J, Mugford M. Genetic screening for cystic fibrosis: an overview of the science and the economics. *J Cyst Fibros*. 2007 Jul; 6 (4): 255–61.

- Sergeev IV, Khaitov MR, Trofimov DYU, et al. Razrabotka metodov dlya provedeniya shirikomasshtabnykh issledovaniy polimorfizma genov, reguliruyuschikh razlichnye komponenty immunnogo otveta. *Fiziol Patol Immun Sist*. 2009; 13 (4): 21–5. Russian.
- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993 Jul 2; 73 (7): 1251–4.
- Kusova ZA, Petrova NV, Vasil'eva TA, et al. Rezultaty massovogo skringinga novorozhdennykh na mukovistsidoz v Moskve. *Vopr Sovrem Peditr*. 2010; 9 (6): 26–30. Russian.
- Petrova NV, Timkovskaya EE, Zinchenko RA, Ginter EK. Analiz chastoty nekotorykh mutatsiy v gene CFTR v raznykh populyatsiyakh Rossii. *Med Gen*. 2006; 5 (2): 32–9. Russian.
- Brice P, Jarrett J, Mugford M. Genetic screening for cystic fibrosis: an overview of the science and the economics. *J Cyst Fibros*. 2007 Jul; 6 (4): 255–61.

АССОЦИАЦИЯ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТА CYP2D6 С ПРОФИЛЕМ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ГАЛОПЕРИДОЛА У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ПАТОЛОГИЧЕСКИМ ВЛЕЧЕНИЕМ К АЛКОГОЛЮ

Д. А. Сычев¹, М. С. Застрожин^{2✉}, В. В. Смирнов⁴, Л. М. Савченко¹, Е. А. Брюн^{2,1}, Ю. Ш. Гущина³, А. С. Сорокин², А. Д. Агузаров²

¹ Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

² Московский научно-практический центр наркологии, Москва

³ Российский университет дружбы народов, Москва

⁴ Государственный научный центр "Институт иммунологии", Москва

На сегодняшний день существуют данные, что в биотрансформации галоперидола принимает участие изофермент CYP2D6. Целью исследования была попытка оценить взаимосвязь активности изофермента CYP2D6 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью. Исследование выполнено на 20 мужчинах (средний возраст — $39,5 \pm 9,5$ года), страдающих алкогольной зависимостью. В работе использовали батарею психометрических шкал. Активность CYP2D6 оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией по отношению 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболин к пинолину. Значения показателей коэффициентов корреляции Спирмена (r_s) между активностью CYP2D6 и изменением количества баллов по шкалам составили: SoPA — $-0,507$ ($p < 0,05$), HARS — $-0,531$ ($p < 0,05$), BARS — $-0,549$ ($p < 0,05$), CARS — $-0,763$ ($p < 0,001$), ZARS — $-0,567$ ($p < 0,01$), SARS — $-0,479$ ($p < 0,05$), HDRS — $-0,345$ ($p > 0,05$), UKU — $0,436$ ($p > 0,05$), SAS — $0,416$ ($p > 0,05$). Таким образом, в исследовании статистически показано наличие взаимосвязи между активностью изофермента CYP2D6 и профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью.

Ключевые слова: галоперидол, биотрансформация, CYP2D6, нежелательные лекарственные реакции, алкогольная зависимость

✉ Для корреспонденции: Михаил Сергеевич Застрожин
109390, Москва, ул. Люблинская, 37/1; rudnmed@yandex.ru
Статья поступила: 06.10.2015 Статья принята к печати: 13.11.2015

ASSOCIATION BETWEEN THE ACTIVITY OF CYP2D6 ENZYME AND PROFILE OF EFFICACY AND SAFETY OF HALOPERIDOL IN PATIENTS WITH ALCOHOL ADDICTION

Sychev DA¹, Zastrozhin MS^{2✉}, Smirnov VV⁴, Savchenko LM¹, Bryun EA^{2,1}, Guschina YuSh³, Sorokin AS², Aguzarov AD²

¹ Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

² Moscow Research and Practical Centre for Narcology, Moscow

³ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

⁴ National Research Center — Institute of Immunology, Moscow

Today there is evidence that CYP2D6 isoenzyme is involved in the biotransformation of haloperidol. The objective of this study was to assess the correlation between CYP2D6 isoenzyme activity and haloperidol efficacy and safety profile in patients with alcohol addiction. The study enrolled 20 men (mean age of 39.5 ± 9.5 years) with alcohol addiction. A battery of psychometric scales was utilized in the study. CYP2D6 activity was assessed using a high performance liquid chromatography - mass spectrometry method by the ratio of 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline to pinoline. Values of Spearman's correlation coefficient (r_s) between CYP2D6 activity and changes in scores were as follows: SoPA— -0.507 ($p < 0.05$), HARS — -0.531 ($p < 0.05$), BARS— -0.549 ($p < 0.05$), CARS— -0.763 ($p < 0.001$), ZARS — -0.567 ($p < 0.01$), SARS— -0.479 ($p < 0.05$), HDRS — -0.345 ($p > 0.05$), UKU — 0.436 ($p > 0.05$), SAS — 0.416 ($p > 0.05$). Thus, the study showed a statistically significant correlation between CYP2D6 isoenzyme activity and efficacy and safety profile of haloperidol in patients with alcohol addiction.

Keywords: haloperidol, biotransformation, CYP2D6, side effects, alcohol addiction

✉ Correspondence should be addressed: Mikhail Zastrozhin
37/1, Lyublinskaya st., Moscow, 109390; rudnmed@yandex.ru
Received: 06.10.2015 Accepted: 13.11.2015

Галоперидол — один из наиболее часто используемых типичных антипсихотических препаратов [1], обладает мощным антипсихотическим действием посредством блокады постсинаптических дофаминергических рецепторов, расположенных в мезолимбической системе. При приеме данного препарата возможны серьезные нежелательные лекарственные реакции со стороны большей части органов и систем. В связи с этим

отношение к галоперидолу у больных алкоголизмом неоднозначное и нередко крайне негативное, что в определенной мере ограничивает его применение в наркологической практике [2]. Под действием цитоплазматической карбонилредуктазы происходит преобразование галоперидола в восстановленную форму, имеющую 10–20 % активности от исходной молекулы, подвергающуюся дальнейшему метаболизму при

участии изофермента CYP2D6 с преобразованием в тетрагидропиридин и конъюгированную с глюкуронатом или сульфатом формы.

Восстановленная форма окисляется обратно в галоперидол преимущественно при участии CYP2D6. Галоперидол подвергается N-деалкилированию при участии CYP2D6 с преобразованием в 4-хлорофенил-4-гидроксипиперидин и p-фторбензоилпропионовую кислоту. Связь активности CYP2D6 со скоростью биотрансформации галоперидола была показана в ряде исследований на больных шизофренией [1, 3, 4].

В то же время некоторые работы опровергают наличие данной связи [5]. Исследований по изучению взаимосвязи скорости биотрансформации галоперидола с активностью CYP2D6 у больных, страдающих патологическим влечением к алкоголю, не проводили. В том числе отсутствуют данные по изучению взаимосвязи активности CYP2D6 и профилем эффективности и безопасности галоперидола у больных, страдающих любыми формами зависимостей от психоактивных веществ.

Целью данной работы было оценить взаимосвязь активности изофермента CYP2D6 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью, в период актуализации патологического влечения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 20 мужчин (средний возраст — $39,5 \pm 9,5$ года), страдающих алкогольной зависимостью и находящихся на стационарном лечении в МНПЦ наркологии. В период актуализации патологического влечения пациенты получали галоперидол в таблетированной форме (ООО «Озон», Россия) в дозировке $5,00 \pm 1,87$ мг/сут (9 пациентов, однократный прием) и в инъекционной форме (ЗАО «БРЫНЦАЛОВ-А», Россия) в дозировке $5,86 \pm 2,39$ мг/сут (11 пациентов, однократный прием). Критерии включения в исследование: терапия, содержащая галоперидол длительностью 5 дней; пероральная и внутримышечная формы введения галоперидола; отсутствие в анамнезе сопутствующего психического заболевания. Критерии исключения: применение в терапии иных антипсихотических препаратов, помимо галоперидола; клиренс креатинина <50 мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови $\geq 1,5$ мг/дл (133 мкмоль/л); масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; возраст 75 лет и более; наличие противопоказаний к применению галоперидола.

Активность изофермента CYP2D6 оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ с МС/МС) по содержанию в моче эндогенного субстрата данного изофермента и его метаболитов — отношение 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболина (6-НО-ТНВС) к пинолину [6].

Результаты оценки активности изофермента представлены в условных единицах.

Для оценки эффективности галоперидола применяли международные психометрические шкалы: шкала патологического влечения (The Scale of Pathological Addiction — SoPA), шкала тревоги Гамильтона (Hamilton Anxiety Rating Scale — HARS), шкала тревоги Бека (The Beck Anxiety Inventory — BARS), шкала тревоги Кови (Covy Anxiety Scale — CARS), шкала самооценки тревоги Цунга (The Zung Self-Rating Anxiety Scale — ZARS), шкала тревоги Шихана (Sheehan Clinical Anxiety Rating Scale — SARS), шкала депрессии Гамильтона (Hamilton Rating Scale for Depression — HDRS). Профиль безопасности исследовали с помощью шкал оценки побочного действия (UKU Side-Effect Rating Scale — UKU) и Симпсона-Ангуса для оценки экстрапирамидных побочных эффектов (Simpson-Angus Scale for Extrapyrimal Symptoms — SAS). Шкалы отражают клиническую картину патологического влечения, чем выше балл, тем влечение более выражено. Шкалирование у пациентов проводили за день до начала терапии, включающей галоперидол, и через 5 дней терапии. Большой разнице в баллах соответствовали более выраженные изменения в клинической картине и большая эффективность терапии.

Статистический анализ результатов исследования проводили методами непараметрической статистики с помощью пакета прикладных программ Statsoft Statistica v. 10.0. При выборе метода брали во внимание нормальность распределения выборок, которую оценивали с помощью W-теста Шапиро-Уилка. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (при статистической мощности свыше 80%). Для определения корреляционной связи между количественными характеристиками вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Значение коэффициента корреляции r_s в диапазоне от $0,3$ до $0,7$ при $p < 0,05$ означало положительную умеренную, но достоверную корреляцию между признаками; $r_s > 0,7$ при $p < 0,05$ — сильную и достоверную связь; отрицательное значение r_s соответствовало обратной корреляции.

Форма представления количественных данных в таблице — среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Медиана показателя активности изофермента, определяемой по отношению концентрации 6-НО-ТНВС к концентрации пинолина и рассчитанной на основании данных ВЭЖХ с МС/МС, и интерквартильный интервал (25% ; 75%) составили $1,16$ ($0,64$; $2,06$).

Результаты анализа данных психометрических шкал и шкал оценки выраженности нежелательных лекарственных реакций

Таблица 1. Данные психометрических шкал и шкал оценки выраженности НЛР (баллы)

| Наименование шкалы | Значение шкалы до терапии | Значение шкалы через 5 дней после начала терапии | Разность значений |
|--------------------|---------------------------|--|-------------------|
| SoPA | $23,70 \pm 2,85$ | $11,40 \pm 3,39^*$ | $12,47 \pm 2,10$ |
| HARS | $40,10 \pm 4,15$ | $25,90 \pm 4,52^*$ | $14,86 \pm 2,48$ |
| BARS | $34,40 \pm 4,04$ | $13,10 \pm 5,41^*$ | $20,48 \pm 3,27$ |
| CARS | $9,25 \pm 1,25$ | $4,75 \pm 1,37^*$ | $4,60 \pm 0,66$ |
| ZARS | $41,10 \pm 3,40$ | $18,85 \pm 3,96^*$ | $20,54 \pm 2,62$ |
| SARS | $77,35 \pm 3,84$ | $35,25 \pm 7,66^*$ | $40,01 \pm 6,18$ |
| HDRS | $22,20 \pm 2,07$ | $10,50 \pm 2,35^*$ | $11,48 \pm 1,47$ |
| UKU | $17,30 \pm 4,29$ | $33,60 \pm 4,30^*$ | $-17,12 \pm 2,52$ |
| SAS | $2,60 \pm 1,79$ | $14,10 \pm 1,29^*$ | $-11,47 \pm 1,66$ |

Примечание: * — $p < 0,001$ при сравнении с соответствующим значением шкалы до терапии (U-тест Манна-Уитни).

представлены в таблице 1. Расчет коэффициентов корреляции Спирмена показал наличие статистически значимой отрицательной умеренной связи между активностью CYP2D6 и изменением количества баллов по шкалам SoPA, HARS, BARS, CARS, ZARS, SARS и положительной умеренной связи с изменением значений шкалы UKU. По шкалам HDRS и SAS статистически значимых корреляций обнаружено не было. Данные расчета показаны в таблице 2. Линейный регрессионный анализ позволил построить регрессионные модели изучаемых зависимостей, графическое отображение которых представлено на рисунках 1 и 2.

Таблица 2. Значения коэффициентов корреляции Спирмена, отражающих взаимосвязь между активностью изофермента CYP2D6 и разностью величин изучаемых шкал до и после терапии галоперидолом

| Наименование шкалы | r_s | p |
|--------------------|--------|--------|
| SoPA | -0,507 | <0,05 |
| HARS | -0,531 | <0,05 |
| BARS | -0,549 | <0,05 |
| CARS | -0,763 | <0,001 |
| ZARS | -0,576 | <0,01 |
| SARS | -0,479 | <0,05 |
| HDRS | -0,345 | >0,05 |
| UKU | 0,436 | <0,05 |
| SAS | 0,416 | >0,05 |

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования статистически показано, что профиль эффективности и безопасности галоперидола у больных, страдающих патологическим влечением к алкоголю, зависит от активности изофермента CYP2D6. Чем выше активность CYP2D6, тем ниже показатель эффективности терапии галоперидолом, что, вероятно, связано с ускорением биотрансформации галоперидола и элиминацией его из организма. Показатели профиля безопасности растут с увеличением активности CYP2D6, что также связано с ускорением элиминации галоперидола. Пациентам с высокой активностью CYP2D6 рекомендовано назначение препарата в средних терапевтических дозировках с осторожностью, поскольку высокая активность CYP2D6 будет препятствовать достижению терапевтической концентрации, что приведет к отсутствию лечебного эффекта. У пациентов с низкой активностью CYP2D6, получающих средние терапевтические дозировки галоперидола, возможна более высокая его концентрация в плазме, что будет ассоциировано с повышением частоты развития и выраженности нежелательных лекарственных реакций. У пациентов с очень высокой или очень низкой активностью CYP2D6 назначение галоперидола противопоказано, рекомендуется использовать другие антипсихотические препараты, в биотрансформации которых CYP2D6 не принимает участия.

Литература

1. Butwicka A, Krystyna S, Retka W, Wolanczyk T. Neuroleptic malignant syndrome in an adolescent with CYP2D6 deficiency. *Eur J Pediatr.* 2014 Dec; 173 (12): 1639–42. doi: 10.1007/s00431-013-2208-z. Epub 2013 Nov 20.
2. Gasso P, Papagianni K, Mas S, de Bobadilla RF, Arnaiz JA, Bernardo M, et al. Relationship between CYP2D6 genotype and haloperidol pharmacokinetics and extrapyramidal symptoms in healthy volunteers. *Pharmacogenomics.* 2013 Oct; 14 (13): 1551–63. doi: 10.2217/pgs.13.150.
3. Сиволоп Ю. П. Рациональные подходы к применению нейролепти-

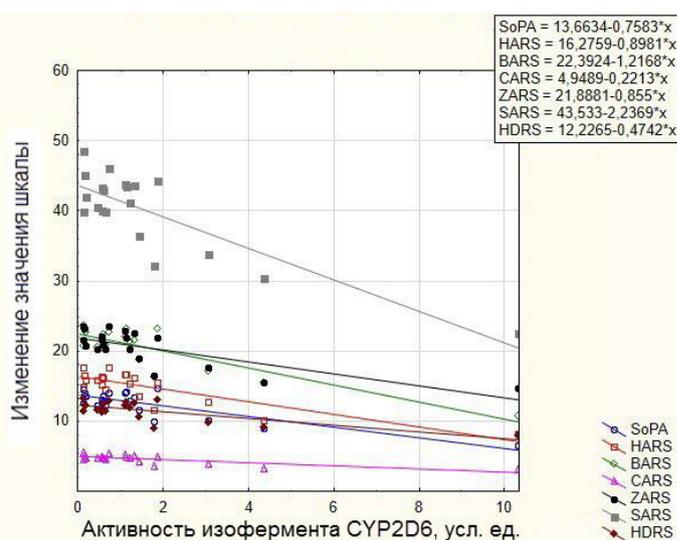


Рис. 1. Зависимость изменения значения психометрических шкал после 5-дневной терапии галоперидолом от активности изофермента CYP2D6

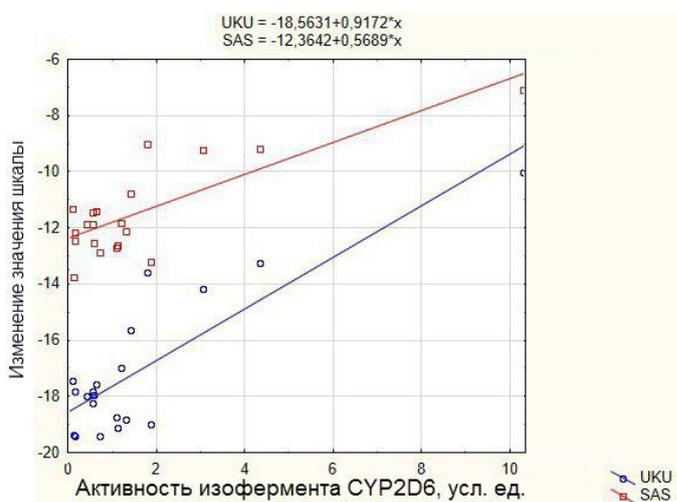


Рис. 2. Зависимость изменения значения шкал оценки выраженности НЛР после 5-дневной терапии галоперидолом от активности изофермента CYP2D6

ВЫВОДЫ

При исследовании на группе из 20 пациентов, страдающих алкогольной зависимостью, было статистически показано существование взаимосвязи между эффективностью и безопасностью галоперидола и активностью изофермента CYP2D6. Для повышения уровня достоверности необходимо проведение дальнейших исследований с большим числом пациентов.

ков в наркологической практике. *Здоровая Украина.* 2008; 7 (1): 83–4.

4. Nakamura A, Mihara K, Nemoto K, Nagai G, Kagawa S, Suzuki T, et al. Lack of correlation between the steady-state plasma concentrations of aripiprazole and haloperidol in Japanese patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit.* 2014 Dec; 36 (6): 815–8. doi: 10.1097/FTD.0000000000000082.
5. Van der Weide K, van der Weide J. The influence of the CYP3A4*22 polymorphism and CYP2D6 polymorphisms on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, pimozide, and risperidone in psychiatric

- patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2015 Jun; 35 (3): 228–36. doi: 10.1097/JCP.0000000000000319.
6. Jiang XL, Shen HW, Yu AM. Pinoline may be used as a probe for

CYP2D6 activity. *Drug Metab Dispos*. 2009 Mar; 37 (3): 443–6. doi: 10.1124/dmd.108.025056. Epub 2008 Dec 18.

References

1. Butwicka A, Krystyna S, Retka W, Wolanczyk T. Neuroleptic malignant syndrome in an adolescent with CYP2D6 deficiency. *Eur J Pediatr*. 2014 Dec; 173 (12): 1639–42. doi: 10.1007/s00431-013-2208-z. Epub 2013 Nov 20.
2. Gasso P, Papagianni K, Mas S, de Bobadilla RF, Arnaiz JA, Bernardo M, et al. Relationship between CYP2D6 genotype and haloperidol pharmacokinetics and extrapyramidal symptoms in healthy volunteers. *Pharmacogenomics*. 2013 Oct; 14 (13): 1551–63. doi: 10.2217/pgs.13.150.
3. Sivolap JuP. Racional'nye podhody k primeneniyu nejroleptikov v narkologicheskoy praktike. *Zdorovaja Ukraina*. 2008; 7 (1): 83–4. Russian.
4. Nakamura A, Mihara K, Nemoto K, Nagai G, Kagawa S, Suzuki T, et al. Lack of correlation between the steady-state plasma concentrations of aripiprazole and haloperidol in Japanese patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit*. 2014 Dec; 36 (6): 815–8. doi: 10.1097/FTD.000000000000082.
5. Van der Weide K, van der Weide J. The influence of the CYP3A4*22 polymorphism and CYP2D6 polymorphisms on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, pimozone, and risperidone in psychiatric patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2015 Jun; 35 (3): 228–36. doi: 10.1097/JCP.0000000000000319.
6. Jiang XL, Shen HW, Yu AM. Pinoline may be used as a probe for CYP2D6 activity. *Drug Metab Dispos*. 2009 Mar; 37 (3): 443–6. doi: 10.1124/dmd.108.025056. Epub 2008 Dec 18.

ДИАПАЗОНЫ НОРМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ ПАРАМЕТРОВ СТАНДАРТНЫХ КОАГУЛОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ И ТЕСТА ТРОМБОДИНАМИКИ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ НА РАЗНЫХ СРОКАХ ГЕСТАЦИИ

Е. С. Ворошилина^{1,4}, Р. А. Овсепян², Е. Э. Плотко^{1,4}, О. Б. Герасимова¹, О. Ю. Баскова¹, Т. С. Будыкина³, Т. А. Вуймо^{2✉}

¹ Медико-Фармацевтический Центр «Гармония», Екатеринбург

² Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва

³ Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии, Москва

⁴ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

При беременности в организме женщины происходит целый ряд адаптационно-приспособительных процессов. Одной из систем, быстро меняющихся в данный период, является система гемостаза. Целью работы было определить диапазон значений параметров теста тромбодинамики при физиологической беременности, сравнить полученные данные с референсным диапазоном норм данного теста, а также оценить динамику изменений параметров стандартных тестов. В работе использовали стандартные коагулологические тесты и тест тромбодинамики. Для выявления диапазонов значений параметров теста тромбодинамики для условно здоровых беременных были обследованы 84, 113 и 94 женщины в I, II и III триместрах беременности соответственно (медианы по возрасту — 30, 30 и 31 год). Полученные данные коагулологических тестов соответствуют нормам при беременности. Уровни фибриногена, растворимых фибрин-мономерных комплексов, D-димера демонстрируют плавное нарастание значений от триместра к триместру. Получены референсные диапазоны для каждого триместра беременности по всем параметрам теста тромбодинамики, которые статистически достоверно отличаются от диапазонов контрольной и общепопуляционной групп. Таким образом, параметры теста тромбодинамики (кроме времени задержки роста сгустка) демонстрируют смещение диапазонов значений в область гиперкоагуляции по сравнению с диапазоном норм для общей популяции, без динамического нарастания от триместра к триместру. Исключение составляет плотность сгустка — смещение диапазона сопровождается плавным увеличением значений параметра от триместра к триместру.

Ключевые слова: гемостаз, нормальная беременность, гиперкоагуляция, тромбодинамика

✉ Для корреспонденции: Татьяна Алексеевна Вуймо
117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1; tagaty@yandex.ru

Статья поступила: 08.10.2015 Статья принята к печати: 28.10.2015

REFERENCE RANGES FOR STANDARD COAGULATION TESTS AND THROMBODYNAMICS ASSAY DURING NORMAL PREGNANCY AT VARIOUS GESTATIONAL AGES

Voroshilina ES^{1,4}, Ovsepyan RA², Plotko EE^{1,4}, Gerasimova OB¹, Baskova OYu¹, Budykina TS³, Vuimo TA^{2✉}

¹ «Harmony» Medical and Pharmaceutical Centre, Ekaterinburg

² Dmitry Rogachev Federal Research Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

³ Moscow Regional Scientific Research Institute of Obstetrics and Gynaecology, Moscow

⁴ Ural State Medical University, Ekaterinburg

During pregnancy the woman's body undergoes the whole range of adaptive adjustment processes. The hemostatic system is one of the body systems that changes rapidly during this period. The objective of the present work is to determine a range of values for the thrombodynamics assay parameters during normal pregnancy, to compare the obtained data with normal reference ranges for this assay and to evaluate the pattern of value changes in the parameters of standard tests. The study enrolled women at various gestational ages with no pregnancy pathologies, inherited medical conditions or concurrent treatments. The study excluded patients with pregnancy pathologies causally related to hemostatic disorders, miscarriage threats, endocrine pathologies or those undergoing medical treatments affecting hemostasis. Standard coagulation tests (activated partial thromboplastin time, prothrombin and thrombin time, antithrombin, international normalized ratio, fibrinogen concentration, D-dimer, soluble fibrin monomer complex) and the thrombodynamics assay were utilized. To determine a range of values for thrombodynamics assay parameters in relatively healthy pregnant women, 84, 113 and 94 patients in the first, second and third trimester respectively, with a median age of 30, 30 and 31 years were examined. The data obtained from coagulation tests correspond to normal values during pregnancy. The levels of fibrinogen, soluble fibrin monomer complexes and D-dimer increase gradually from one trimester to another. Reference values for all parameters of the thrombodynamics assay for each pregnancy trimester were obtained. Their difference from value ranges in the control and general population groups is statistically valid. Thus, the value ranges of thrombodynamics assay parameters, except for the lag time, shift towards hypercoagulation in comparison with the reference ranges for general population, with no increase from one trimester to another. The only exception is clot density: a shift in a value interval was accompanied by a gradual growth of the parameter value from one trimester to another.

Keywords: hemostasis, normal pregnancy, hypercoagulation, thrombodynamics

✉ Correspondence should be addressed: Tatiana Vuimo
1, Samora Mashel st., Moscow, 117997; tagaty@yandex.ru

Received: 08.10.2015 Accepted: 28.10.2015

Физиологически протекающая беременность вызывает ряд изменений в свертывающей системе крови [1, 2]. С одной стороны, отмечено повышение концентрации факторов свертывания (V, VII, VIII, IX, X), двукратный прирост уровня фибриногена по сравнению с общей (небеременной) популяцией [3–7]. С другой — происходит снижение концентрации физиологических антикоагулянтов, в частности растворимого протеина S, и активности системы фибринолиза [8]. Эти изменения направлены на поддержание функции плаценты в течение беременности и на предупреждение кровопотери в родах, однако они повышают риск развития тромбозов и плацентарно-сосудистых осложнений [9].

Для оценки состояния системы гемостаза у беременных применяются стандартный набор лабораторных тестов с установленными диапазонами нормальных показателей для общей популяции. При интерпретации результатов исследований у беременных ориентироваться на эти диапазоны нецелесообразно, однако не для всех тестов для данной категории женщин определены нормативные значения [10–12].

Появление нового интегрального теста оценки системы гемостаза — теста тромбодинамики (ТД) — открыло дополнительные возможности для мониторинга состояния коагуляционного потенциала крови у беременных. Основным принципом теста состоит в локальной активации свертывания активатором с тканевым фактором, имитирующим поврежденную стенку сосуда, и в последующем наблюдении за ростом фибринового сгустка. Проведенные ранее исследования продемонстрировали высокую чувствительность теста к гипо- и гиперкоагуляционным состояниям различной природы [13–18]. Ранее также были определены значения нормальных показателей параметров теста для популяции [19].

Цель данной работы — установление диапазона референсных показателей стандартных коагулологических тестов и теста тромбодинамики на разных сроках физиологически протекающей беременности и оценка динамики изменений параметров тестов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 314 женщин. Основная группа наблюдения состояла из 291 беременной в течение всего срока гестации, из них 84 женщины в возрасте от 19 до 40 лет (медиана — 30 лет) были обследованы в I триместре беременности; 113 (21–40 лет, медиана — 30 лет) — во II триместре и 94 женщины (21–40 лет, медиана — 31 год) — в III триместре беременности. Группу сравнения составили 23 женщины вне беременности в возрасте от 20 до 39 лет (медиана — 28 лет).

Критерий включения в основную группу: физиологически протекающая беременность. Критерии исключения: патология беременности, потенциально ассоциированная с изменениями в системе гемостаза, отягощенный личный и семейный тромботический анамнез, носительство мутаций в генах факторов II и V, отягощенный акушерский анамнез, наличие антикоагулянтной терапии. Критерии исключения из группы сравнения: отягощенный личный и семейный тромбофильный анамнез, курение, прием комбинированных оральных контрацептивов или препаратов заместительной гормонотерапии, антикоагулянтов, отягощенный акушерско-гинекологический анамнез.

Оценку параметров свертывающей системы крови проводили с помощью стандартных (рутинных) коагулологических тестов: определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), активность антитромбина III (АТ III), значение международного нормализованного отношения (МНО), содержание фибриногена на автоматическом коагулометре CA-500 (Sysmex, Япония) с использованием реагентов фирмы Siemens (Германия). Уровень D-димера измеряли на имму-

нохемиллюминесцентном анализаторе Immulite 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., США), реагенты были получены от фирмы Siemens. Содержание растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) определяли в орто-фенантролиновом тесте (реагенты фирмы «Технология-Стандарт», Россия). Количество тромбоцитов в крови считали на гематологическом анализаторе BC-5300 (Mindray, КНР).

Интегральную оценку системы гемостаза проводили с помощью теста тромбодинамики на диагностической лабораторной системе «Регистратор Тромбодинамики Т-2» (реагенты компании «ГемаКор», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программ MedCalc Statistical Software 14 и Origin Pro 8. Для анализа нормальности распределения значений применяли критерии Шапиро–Уилка и Лиллиефорса, для статистического анализа — критерий Манна–Уитни. С учетом того, что анализируемые выборки не подчиняются закону нормального распределения, в качестве меры среднего выбрали медиану, в референсный интервал были включены значения, соответствующие процентилем в диапазоне от 2,5 до 97,5 [20].

Плазму для анализа получали из образцов крови, заготовленных стандартным образом в вакуумных пластиковых пробирках с 3,2 % (0,109 M) цитратом натрия при соотношении крови к цитрату — 9:1. Определение параметров стандартных тестов проводили в бедной тромбоцитами плазме, для получения которой кровь центрифугировали 15 мин при 1600 g и комнатной температуре и отбирали верхнюю часть (~ 75 %) полученной плазмы. Для проведения теста тромбодинамики использовали свободную от тромбоцитов плазму, которую получали путем дополнительного центрифугирования бедной тромбоцитами плазмы в течение 5 мин при 10 000 g и комнатной температуре. Для анализа отбирали верхнюю часть (~ 90 %) полученной свободной от тромбоцитов плазмы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования системы гемостаза стандартными коагулометрическими тестами представлены в таблице 1. Такие показатели, как количество тромбоцитов, ТВ, АЧТВ, ПВ, МНО, АТ III находились в пределах референсных диапазонов в группах беременных и в контрольной группе. Исключение составили фибриноген, РФМК и D-димер, уровень которых у беременных был выше, чем в общей популяции. На рисунке 1 представлена динамика содержания РФМК и фибриногена в плазме крови у беременных различного срока гестации и у женщин вне беременности. Показатели данных тестов статистически значимо выше у беременных по сравнению с контрольной группой, кроме того, отмечено увеличение содержания РФМК и фибриногена с увеличением срока гестации в течение беременности. В таблице 2 приведены результаты исследования свертывающей системы крови в тесте ТД у беременных и в контрольной группе. Значения времени задержки роста сгустка (Ptag) укладываются в референсный диапазон для общей популяции как в группах беременных, так и в контрольной группе. Увеличения показателя Ptag от триместра к триместру не наблюдали. На рисунке 2 представлена динамика значений различных параметров теста ТД в плазме крови у беременных различного срока гестации и у женщин вне беременности.

Для параметра начальной скорости роста сгустка (Vi) у беременных отмечено небольшое смещение в область гиперкоагуляции (рис. 2, А): почти 10 % значений Vi превышали норму для женщин вне беременности. Статистически значимых различий между группами беременных женщин и контрольной группой не установлено.

Стационарная скорость роста сгустка Vst (рис. 2, Б) у бере-

Таблица 1. Показатели стандартных коагулологических тестов у беременных различного срока гестации и женщин вне беременности

| Показатель | Триместр | | | Норма для беременных (внутрилабораторная) | Контрольная группа n = 23 | Референсный диапазон норм для общей популяции |
|---|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--|---------------------------|---|
| | I (1–12 нед) n = 84 | II (13–24 нед) n = 113 | III (25–42 нед) n = 94 | | | |
| Количество тромбоцитов, × 10 ⁹ /л | 221 (140–300) | 225 (146–317) | 212 (142–302) | 150–400 | 262 (174–415) | 180–320 |
| Фибриноген, г/л | 3 ^{*^} (1,8–4,6) | 3,7 [^] (2,1–5,7) | 4,3 ^{*^} (2,4–6,6) | 1,8–5,5 | 2,3 (1,4–3,2) | 2–4 |
| Тромбиновое время, с | 17,3 (14,6–20,7) | 17 (14,8–19,7) | 17,5 (14–20,2) | 14–21 | 18,5 (17–20,1) | 14–21 |
| Активированное частичное тромбопластиновое время, с | 35,3 (30–42) | 32,2 (28–38) | 31,5 (27–38) | 26–39 | 35 (27–40) | 26–38 |
| Протромбиновое время, с | 11,2 (9,8–13) | 11,1 (10–12,7) | 11,2 (10–12,9) | – | 11,3 (10,3–12,2) | 10–13,3 |
| МНО | 0,95 (0,83–1,11) | 0,92 (0,84–1,04) | 0,95 (0,85–1,09) | – | – | 1–1,2 |
| Антитромбин III, % | 91 (73–112) | 92 (71–114) | 95 (72–120) | 71–116 | 98 (76–110) | 80–120 |
| Растворимые фибрин-мономерные комплексы, мг/л | 45 ^{**^} (15–120) | 100 [^] (35–210) | 120 ^{**^} (50–210) | 35–100 | 35 (30–45) | 0–45 |
| D-димер, нг/мл | 153 (50–685) | 391 (75–907) | 530 (139–1385) | 0–500 [#] 0–900 ^{##} 0–1500 ^{###} | – | 0–500 |

Примечание: результаты представлены в виде медианы (95 % ДИ). Прочерком обозначены параметры, не измеряемые в данной группе. # — норма D-димер для I триместра; ## — для II триместра; ### — для III триместра; * — p < 0,05; ** — p < 0,001 при сравнении с соответствующим показателем беременных во II триместре; ^ — p < 0,001 при сравнении с соответствующим показателем контрольной группы.

менных также смещена в область гиперкоагуляции: 40 % значений Vst в этой группе превышают норму для женщин вне беременности. Статистически значимые различия установлены между беременными в I триместре и группой контроля, а также между беременными в I и II триместрах. Возможно, это связано с гормональными изменениями, пик которых приходится на I триместр. По мере прогрессирования беременности организм адаптируется к изменениям, и уже ко II триместру гиперкоагуляция уменьшается. Для 25 % беременных

в каждом триместре характерно смещение размера сгустка относительно верхней границы нормы для общей популяции (рис. 2, В). Статистически значимых различий между группами беременных и контрольной группой не установлено.

Плотность сгустка (рис. 2, Г) нарастает от триместра к триместру с небольшим превышением нормы для данного показателя во II и III триместрах. Плотность сгустка у женщин в группе сравнения укладывается в референсный диапазон для нормы.

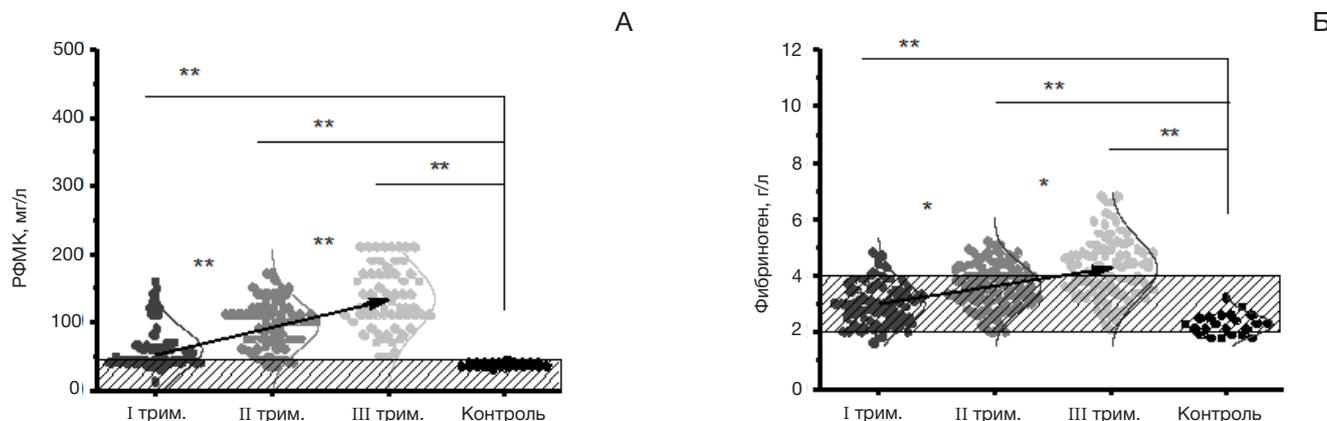


Рис. 1. Уровень РФМК (А) и фибриногена (Б) в плазме крови у беременных различного срока гестации и у женщин вне беременности. Темно-серые, серые и светло-серые обозначения соответствуют значениям параметра в группе беременных в I, II и III триместрах соответственно. Черные обозначения — контрольная группа (небеременные). Заштрихованный прямоугольник — диапазон референсных значений параметра, используемый в лаборатории для общей популяции. Звездочками обозначены статистически значимые различия между рассмотренными группами (* — p < 0,05; ** — p < 0,001), соответствия указаны либо между соседними группами, либо с помощью линий между рассмотренными группами. Черной стрелкой отмечено наличие динамического нарастания параметра от триместра к триместру

Таблица 2. Динамика параметров теста тромбодинамики у беременных различного срока гестации и у женщин вне беременности

| Показатель | Триместр | | | Контрольная группа n = 23 | Норма для общей популяции |
|--|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | I (1–12 нед) n = 84 | II (13–24 нед) n = 113 | III (25–42 нед) n = 94 | | |
| Время задержки роста сгустка (Паг), мин | 0,9 (0,7–1,5) | 0,9 (0,7–1,2) | 0,9 (0,7–1,5) | 1,0 (0,8–1,4) | 0,6–1,5 |
| Начальная скорость роста сгустка (Vi), мкм/мин | 52 (42–61) | 52 (43–59) | 51 (44–60) | 52 (45–56) | 38–56 |
| Стационарная скорость роста сгустка (Vst), мкм/мин | 28*^ (23–36) | 27 (23–37) | 28 (24–35) | 27 (22–30) | 20–29 |
| Размер сгустка на 30-й минуте исследования (CS), мкм | 1155 (964–1368) | 1136 (908–1323) | 1150 (1005–1345) | 1116 (954–1220) | 800–1200 |
| Плотность сгустка (D), у. е. | 25534**^ (17740–31500) | 27451^ (21960–31210) | 28864**^^ (21774–33768) | 22847 (20036–26339) | 15000–32000 |

Примечание: Результаты представлены в виде: медиана (95 % ДИ).

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ при сравнении с соответствующим показателем беременных во II триместре;

^ — $p < 0,05$; ^^ — $p < 0,001$ при сравнении с соответствующим показателем контрольной группы

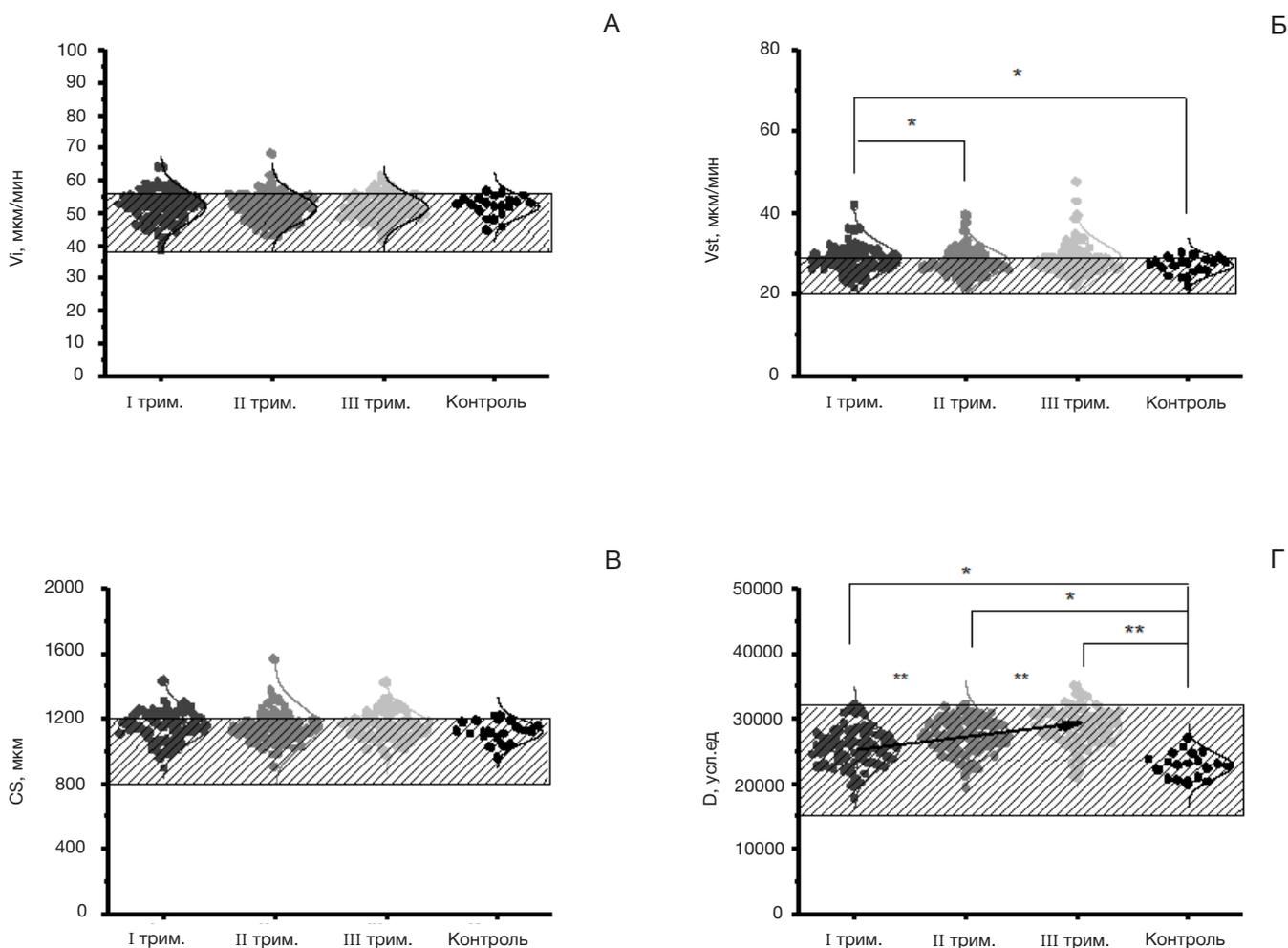


Рис. 2. Значение параметров теста ТД у беременных различного срока гестации и у женщин вне беременности. А — начальная скорость роста сгустка (Vi); Б — стационарная скорость роста сгустка (Vst); В — размер сгустка на 30-й минуте исследования (CS); Г — плотность сгустка (D). Темно-серые, серые и светло-серые обозначения соответствуют значениям параметра в группе беременных в I, II и III триместрах соответственно. Черные обозначения — контрольная группа (небеременные). Заштрихованный прямоугольник — диапазон референсных значений параметра, используемый в лаборатории для небеременной группы. Звездочками обозначены статистически значимые различия между рассмотренными группами (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$), соответствия указаны либо между соседними группами, либо с помощью линий между рассмотренными группами. Черной стрелкой отмечено наличие динамического нарастания параметра от триместра к триместру

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение состояния системы гемостаза в течение физиологически протекающей беременности является веским основанием для определения собственных диапазонов норм для «локальных» и интегральных коагулологических тестов. Полученные референсные диапазоны позволяют точно выделять группы нормы и патологии среди беременных и своевременно предупреждать тромботические осложнения.

В результате сравнительного анализа, проведенного в настоящей работе, было показано, что значения стандартных коагулологических тестов для всех групп беременных укладывались в референсные интервалы, характерные для популяции взрослых людей вне беременности. Изменения D-димера соответствуют допустимым пределам для каждого периода гестации. Исключение составляют фибриноген и РФМК, уровни плазменной концентрации которых увеличивались с течением беременности, что соответствует ранее описанным наблюдениям [7–9, 21–23]. Закономерное повышение уровней фибриногена, D-димера, РФМК при беременности позволяет говорить о «физиологической» гиперкоагуляции беременных. Динамические параметры теста ТД — начальная (Vi) и стационарная (Vst) скорости в группах беременных — смещаются в область гиперкоагуляции (на 10 и 40 % соответственно), без нарастания значений от триместра к триместру. Размер сгустка (CS) в значениях, превышающих верхнюю границу нормы, был зафиксирован в 25 % случаев. Плотность сгустка (D) плавно возрастает со сроком гестации, причем, начиная со II триместра, превышает верхнюю границу референсного диапазона нормы, что связано с увеличением уровня фибриногена во время беременности.

Показатели рутинных коагулологических тестов (ТВ, АЧТВ, ПВ, МНО, АТ III) слабо отражают реальное состояние системы гемостаза. Очевидно, что для адекватной оценки и выявления патологических изменений в системе гемостаза у беременных стоит использовать те параметры, которые изменяются

в зависимости от сроков гестации (РФМК, D-димеры, фибриноген, параметры ТД), причем для каждого триместра необходим собственный диапазон референсных значений нормы. Отклонение значений параметров, необходимых для мониторинга состояния системы гемостаза как выше, так и ниже установленных границ референсных диапазонов, свидетельствует о развитии патологического состояния.

ВЫВОДЫ

Гомогенная группа контроля (женщины репродуктивного возраста) по параметрам теста тромбодинамики и стандартных коагулологических тестов укладывается в диапазоны норм. Это позволяет использовать нормы, принятые для общей популяции, в качестве контрольных значений.

Значения параметров стандартных коагулологических тестов находятся в пределах референсных интервалов норм в соответствии с триместрами. Исключение составляют фибриноген и растворимые фибрин-мономерные комплексы, уровни значений которых нарастают от триместра к триместру.

Параметры теста тромбодинамики (кроме времени задержки роста сгустка) демонстрируют смещение диапазонов значений в область гиперкоагуляции в сравнении с общим диапазоном норм, без динамического нарастания от триместра к триместру. Исключение составляет плотность сгустка — смещение диапазона параметра сопровождается плавным увеличением значений от триместра к триместру.

Тест тромбодинамики можно использовать как чувствительный и адекватный инструмент для мониторинга и контроля состояния системы гемостаза беременных. Отклонение значений параметров, необходимых для мониторинга состояния системы гемостаза, как выше, так и ниже установленных границ референсных диапазонов свидетельствует о развитии патологического состояния.

Литература

- Chan WS, Ginsberg JS. Management of venous thromboembolism in pregnancy. In: van Beek EJR, Buller HR, Oudkerk M, editors. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2009. p. 353–371. doi: 10.1002/9780470745007.ch16.
- Макацария А. Д., Бицадзе В. О, Акиншина С. В. Тромбозы и тромбоемболии в акушерско-гинекологической клинике. М.: Медицинское информационное агентство; 2007. С. 1047–54.
- Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 1984 Oct 31; 52 (2): 176–182.
- Bonnar J. Haemostasis and coagulation disorders in pregnancy. In: Bloom AL, Thomas DP, editors. Haemostasis and thrombosis. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987. p. 570–84.
- Letsky EA. Coagulation problems during pregnancy. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985. 137 p.
- Greer IA. Haemostasis and thrombosis in pregnancy. In: Bloom AL, Thomas DP, Tuddenham EGD, editors. Haemostasis and thrombosis. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 987–1015.
- Holmes VA. Changes in haemostasis during normal pregnancy: does homocysteine play a role in maintaining homeostasis? *Proc Nutr Soc.* 2003; 62 (2): 479–93. doi: 10.1079/pns2003251.
- Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res.* 2004; 114 (5–6): 409–14. doi: 10.1016/j.thromres.2004.08.004.
- Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2003; 16 (2): 153–68. doi: 10.1016/s1521-6926(03)00021-5.
- Wickström K, Edellstam G, Löwbeer CH, Hansson LO, Siegbahn A. Reference intervals for plasma levels of fibronectin, von Willebrand factor, free protein S and antithrombin during third-trimester pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004; 64 (1): 31–40. doi: 10.1080/00365510410003859.
- Shizuka R, Amagai H, Kojima J, Imaizumi S, Fukumura Y, Kobayashi I, et al. A trial of setting of the reference interval of thrombin antithrombin III complex and fibrin-fibrinogen degradation products in pregnant women. *Rinsho Byori.* 1994 Nov; 42 (11): 1194–8.
- Della Rocca G, Dogareschi T, Ceconet T, Buttera S, Spasiano A, Nadbath P, et al. Coagulation assessment in normal pregnancy: thromboelastography with citrated non activated samples. *Minerva Anesthesiol.* 2012 Dec; 78 (12): 1357–64.
- Soshitova NP, Karamzin SS, Balandina AN, Fadeeva OA, Kretchetova AV, Galstian GM, et al. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012 Sep; 23 (6): 498–507. doi: 10.1097/mbc.0b013e328352e90e.
- Poletaev A, Balandina A, Rabotinskiy S, et al. A global hemostasis assays in laboratory monitoring of low molecular weight heparin treatment in patients after surgery. Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 29–July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands. *J Thromb Haemost.* 2013 Jul; (11 Suppl 2): S1–1322. doi: 10.1111/jth.12284.
- Serebriyskiy I, Taranenko I, Vuimo T, et al. Time-and space-resolved imaging of coagulation as a method for monitoring the effectiveness of LMWH therapy after total hip replacement. Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 29–July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands. *J Thromb Haemost.* 2013 Jul; (11 Suppl 2): S1–1322. doi: 10.1111/jth.12284.
- Gracheva M, Urnova E, Mendeleeva L, et al. Conventional and new global haemostasis laboratory test reveal hypercoagulation in primary multiple myeloma patients. Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 29–July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands. *J Thromb Haemost.* 2013 Jul; (11 Suppl 2): S1–1322. doi: 10.1111/jth.12284.
- Ovanesov MV, Krasotkina JV, Ul'yanova LI, Abushinova KV, Plyushch OP, Domogatskiy SP, et al. Hemophilia A and B are associated with abnormal spatial dynamics of clot growth. *Biochim Biophys Acta.* 2002

- Aug 15; 1572 (1): 45-57. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00278-7.
18. Сошитова Н. П., Верхолюмова Ф. Ю., Манукян И. Г., Крылов А. Ю., Шулуток А. М., Атауллаханов Ф. И. и др. Выделение группы риска прогрессирувания/рецидива у больных со спонтанным тромбозом глубоких вен нижних конечностей на терапии варфарином. *Моск. хир. журн.* 2013; 5 (33):15-22.
 19. Шулуток А. М., редактор. Применение теста тромбодинамики для оценки состояния системы гемостаза: учеб. пособие. М., 2014. 85 с.
 20. Правила оценки клинической эффективности лабораторных тестов. ГОСТ Р 53022-3-2008. Технологии лабораторные и клинические. Требования к качеству лабораторных исследований. М., 2008; (Ч. 3): 6, 14-17.

References

1. Chan WS, Ginsberg JS. Management of venous thromboembolism in pregnancy. In: van Beek EJR, Buller HR, Oudkerk M, editors. *Deep vein thrombosis and pulmonary embolism*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2009. p. 353-371. doi: 10.1002/9780470745007.ch16.
2. Makatsaria AD, Bitsadze VO, Akinshina SV. *Trombozy i tromboembolii v akushersko-ginekologicheskoy klinike*. Moscow: Medical information agency; 2007. p. 1047-54. Russian.
3. Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 1984 Oct 31; 52 (2): 176-182.
4. Bonnar J. Haemostasis and coagulation disorders in pregnancy. In: Bloom AL, Thomas DP, editors. *Haemostasis and thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987. p. 570-84.
5. Letsky EA. *Coagulation problems during pregnancy*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985. 137 p.
6. Greer IA. Haemostasis and thrombosis in pregnancy. In: Bloom AL, Thomas DP, Tuddenham EGD, editors. *Haemostasis and thrombosis*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 987-1015.
7. Holmes VA. Changes in haemostasis during normal pregnancy: does homocysteine play a role in maintaining homeostasis? *Proc Nutr Soc.* 2003; 62 (2): 479-93. doi: 10.1079/pns2003251.
8. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res.* 2004; 114 (5-6): 409-14. doi: 10.1016/j.thromres.2004.08.004.
9. Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2003; 16(2):153-68. doi:10.1016/s1521-6926(03)00021-5.
10. Wickström K, Edelstam G, Löwbeer CH, Hansson LO, Siegbahn A. Reference intervals for plasma levels of fibronectin, von Willebrand factor, free protein S and antithrombin during third-trimester pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004; 64 (1): 31-40. doi: 10.1080/00365510410003859.
11. Shizuka R, Amagai H, Kojima J, Imaizumi S, Fukumura Y, Kobayashi I, et al. A trial of setting of the reference interval of thrombin antithrombin III complex and fibrin-fibrinogen degradation products in pregnant women. *Rinsho Byori.* 1994 Nov; 42 (11): 1194-8.
12. Della Rocca G, Dogareschi T, Ceconet T, Buttera S, Spasiano A, Nadbath P, et al. Coagulation assessment in normal pregnancy: thromboelastography with citrated non activated samples. *Minerva Anesthesiol.* 2012 Dec; 78 (12): 1357-64.
13. Soshitova NP, Karamzin SS, Balandina AN, Fadeeva OA, Kretchetova AV, Galstian GM, et al. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012 Sep; 23 (6): 498-507. doi: 10.1097/mbc.0b013e328352e90e.
14. Poletaev A, Balandina A, Rabotinskiy S, et al. A global hemostasis assays in laboratory monitoring of low molecular weight heparin treatment in patients after surgery. Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 29-July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands. *J Thromb Haemost.* 2013 Jul; (11 Suppl 2): S1-1322. doi: 10.1111/jth.12284.
15. Serebriyskiy I, Taranenko I, Vuimo T, et al. Time-and space-resolved imaging of coagulation as a method for monitoring the effectiveness of LMWH therapy after total hip replacement. Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 29-July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands. *J Thromb Haemost.* 2013 Jul; (11 Suppl 2): S1-1322. doi: 10.1111/jth.12284.
16. Gracheva M, Urnova E, Mendeleeva L, et al. Conventional and new global haemostasis laboratory test reveal hypercoagulation in primary multiple myeloma patients. Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 29-July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands. *J Thromb Haemost.* 2013 Jul; (11 Suppl 2): S1-1322. doi: 10.1111/jth.12284.
17. Ovanesov MV, Krasotkina JV, Ul'yanova LI, Abushinova KV, Plyushch OP, Domogatskii SP, et al. Hemophilia A and B are associated with abnormal spatial dynamics of clot growth. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Aug 15; 1572 (1): 45-57. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00278-7.
18. Soshitova NP, Verkholomova FYu, Manukyan IG, Krylov AYu, Shulutko AM, Ataullakhanov FI, et al. Выделение группы риска прогрессирувания/рецидива у больных со спонтанным тромбозом глубоких вен нижних конечностей на терапии варфарином. *Mosc Surg J.* 2013; 5 (33): 15-22. Russian.
19. Shulutko AM, editor. *Применение теста тромбодинамики для оценки состояния системы гемостаза: учебное пособие*. Moscow, 2014. 85 p. Russian.
20. *Правила оценки клинической эффективности лабораторных тестов // ГОСТ Р 53022-3-2008. Технологии лабораторные и клинические. Требования к качеству лабораторных исследований*. Moscow, 2008; (Pt. 3): 6, 14-17. Russian.
21. Joly B, Barbay V, Borg JY, Le Cam-Duchez V. Comparison of markers of coagulation activation and thrombin generation test in uncomplicated pregnancies. *Thromb Res.* 2013 Sep; 132 (3): 386-91. doi: 10.1016/j.thromres.2013.07.022.
22. Thornton P, Douglas J. Coagulation in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2010 Jun; 24 (3): 339-52. doi:10.1016/j.bpobgyn.2009.11.010.
23. Sharma SK, Philip J, Wiley J. Thromboelastographic changes in healthy parturients and postpartum women. *Anesth Analg.* 1997 Jul; 85 (1): 94-8. doi: 10.1213/00000539-199707000-00017.

ОЦЕНКА И ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОБЪЕДИНЕНИЯ II-III ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА «ГЕКСАСЕНС»

В. И. Иванова-Радкевич^{1,2✉}, Е. А. Мачинская¹, Е. В. Филоненко³, Е. А. Лукьянец¹

¹ Государственный научный центр «НИОПИК», Москва

² Российский университет дружбы народов, Москва

³ Московский научно-исследовательский онкологический центр имени П. А. Герцена, Москва

Флюоресцентная диагностика (ФД) — перспективный метод выявления злокачественных опухолей за счёт накопления раковыми клетками фотоактивных соединений и возникновения флюоресцентного контраста между опухолевыми и здоровыми тканями. Для ФД можно использовать препараты, индуцирующие синтез эндогенных фотоактивных соединений. Так, 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК) усиливает образование в организме фотоактивного протопорфирина IX. Препараты на основе эфиров 5-АЛК, например «Гексвикс» (Норвегия), показывают высокую диагностическую эффективность. В России был разработан оригинальный препарат на основе гексилового эфира 5-АЛК «Гексасенс», предназначенный для ФД рака мочевого пузыря и успешно прошедший I фазу клинического исследования. В статье обоснована возможность объединения следующих, II и III, фаз клинического исследования «Гексасенса». Описана схема двухэтапной оценки эффективности ФД с препаратом: оценка эффективности двух вариантов диагностики с разной экспозицией раствора препарата (1 и 2 ч) и сравнение результатов наиболее эффективного варианта с результатами стандартной цистоскопии. Проведен статистический анализ и рассчитан объем выборки: 134 пациента. Показано, что при минимальной клинически значимой разности между показателями чувствительности и специфичности 10 % (уровень значимости 2,5 %, мощность 80 %) выборки такого объема достаточно для получения достоверных результатов и проведения в III фазе исследования ретроспективного анализа без набора новых пациентов.

Ключевые слова: гексасенс, фотосенсибилизатор, гексильный эфир 5-АЛК, флюоресцентная диагностика, рак мочевого пузыря

✉ Для корреспонденции: Вероника Игоревна Иванова-Радкевич
123995, Москва, Большая Садовая, 1/4; pchik@yandex.ru
Статья поступила: 02.10.2015 Статья принята к печати: 13.11.2015

COMBINING PHASES II AND III IN A CLINICAL TRIAL OF "HEXASENS": ASSESSMENT AND REASONING

Ivanova-Radkevich VI^{1,2✉}, Machinskaya EA¹, Filonenko EV³, Lukianets EA¹

¹ State Scientific Centre "NIOPIK", Moscow

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

³ P. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Moscow

Fluorescence diagnosis (FD) is a promising method for detecting malignant tumors based on the accumulation of photoactive compounds in cancer cells and fluorescence contrast between neoplastic and healthy tissues. Agents inducing synthesis of endogenous photoactive compounds can be used for FD. For example, 5-aminolevulinic acid (5-ALA) stimulates production of photoactive protoporphyrin IX in the body. Agents based on 5-ALA hexyl ester such as «Hexvix» (Norway), show high diagnostic efficiency. In Russia, «Hexasens», an original drug based on 5-ALA hexyl ester, has been developed. It is intended for the FD of urinary bladder cancer and has successfully completed phase I of a clinical trial. This article gives reasoning for the possibility of combining phases II and III of «Hexasens» clinical trials. The article also describes a two-stage assessment of efficacy of a "Hexasens"-based FD: evaluation of diagnostic efficacy in two cases with different solution exposure times (1 and 2 hours) and comparing the results of the most effective option to standard cystoscopy results. Statistical analysis was performed and patients sample volume was calculated (134 patients). The study established that with the minimum clinically significant difference between the sensitivity and specificity of 10 % (significance level of 2.5 %, power of 80 %) this sample size is sufficient for obtaining reliable results and conducting a retrospective analysis during phase III without recruiting new patients.

Keywords: Hexasens, photosensitizer, 5-ALA hexyl ester, fluorescence diagnosis, urinary bladder cancer

✉ Correspondence should be addressed: Veronika Ivanova-Radkevich
4/1, Bol'shaya Sadovaya st., Moscow, 123995; pchik@yandex.ru
Received: 02.10.2015 Accepted: 13.11.2015

В основе метода флюоресцентной диагностики (ФД) раковых опухолей лежит избирательное накопление специального вещества, фотосенсибилизатора, в опухолевых тканях и обнаружение его по спектрам экзогенной флюоресценции из освещаемой лазерным излучением области [1–3]. ФД особенно эффективна при выявлении опухолей малых размеров (до 1 мм), локализованных в поверхностных слоях — эпидерми-

се, эпителии слизистых оболочек. В этом случае чувствительность метода выше, чем у других методов ранней диагностики [3–5]. В клинической практике в качестве фотосенсибилизаторов широко используют препараты, относящиеся к группе производных гематопорфирина: «Фотофрин» (США), «Фотосан» (Германия). Однако они имеют низкую интенсивность и контрастность флюоресценции «опухоль/норма», что снижает

их диагностическую ценность [3, 4, 6, 7]. Одним из путей достижения эффективной концентрации фотосенсибилизатора в опухолевой ткани является стимуляция организма к продукции эндогенных фотоактивных соединений — порфиринов и, в частности, протопорфирина IX (ППІХ). Одним из соединений, эффективно индуцирующих его синтез, является 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК) и ее эфирные производные: метиловый и гексиловый эфиры 5-АЛК. 5-АЛК — промежуточный метаболит синтеза гема в клетках человека. Известно, что опухолевые клетки способны к повышенному накоплению фотоактивного ППІХ в присутствии экзогенной 5-АЛК, и это обусловлено повышенной активностью в опухолевых клетках ферментов начального этапа синтеза гема, а также дефицитом в них феррохелатазы — фермента, утилизирующего ППІХ путем его превращения в гем [1, 2, 8]. Накопление ППІХ в клетках опухоли происходит в течение нескольких часов, и его высокое содержание сохраняется на протяжении 6 ч, в то время как в нормальных клетках ППІХ превращается в фотонеактивный гем. В результате наблюдается высокий флюоресцентный контраст между опухолью и окружающей тканью, достигающий 10–15-кратной величины для различных опухолей [1, 9–12].

Применение ФД с препаратами 5-АЛК при диагностике опухолевых и предопухолевых заболеваний активно исследуется как в России, так и за рубежом. В мире зарегистрирован и разрешен к медицинскому применению ряд препаратов на основе 5-АЛК: «Левулан» (Норвегия), «Дуза» (Канада) и «Аласенс» (Россия), — которые показали высокую эффективность при диагностике злокачественных новообразований ряда локализаций, а метод ФД с их применением используется в ведущих клиниках мира как один из наиболее чувствительных для уточнения распространенности опухолевого процесса [4, 6, 7, 12]. Так, в МНИОИ им. П. А. Герцена были проведены многолетние исследования эффективности ФД с препаратом «Аласенс» у пациентов с опухолями верхних дыхательных путей, верхних отделов пищеварительного тракта, толстой кишки, мочевого пузыря, эндометрия, плевры и брюшины и были получены следующие результаты: чувствительность метода составила 87,5–100 %, специфичность — 76–100 % [3, 13–15]. При этом ФД позволила диагностировать скрытые очаги предрака и раннего рака и поверхностные рецидивы опухолей [3]. В последние годы для ФД используются препараты «Метвикс» (Швейцария) и «Гексвикс» (Норвегия) на основе эфиров 5-АЛК — метилового и гексилового соответственно. Будучи более гидрофобными, чем 5-АЛК, эфиры лучше преодолевают биологические мембраны, что способствует их более быстрому и большому накоплению в клетках и включению в биосинтез в качестве предшественников ППІХ. Для диагностики «Гексвикс» используют в виде внутривенных инфузий в дозе 85 мг в виде 0,17 %-го раствора [7, 8, 16, 17].

В Государственном научном центре «НИОПИК» совместно с МНИОИ им. П. А. Герцена был разработан препарат «Гексасенс» на основе гексилового эфира 5-АЛК (как у «Гексвикса»), синтезированного по оригинальной технологии. Разрешенная к медицинскому применению терапевтическая доза норвежского препарата 85 мг и 0,17 %-я концентрация его раствора (рассчитываются по гексиловому эфиру 5-АЛК) соответствуют 100 мг 0,2 %-ой концентрации отечественного препарата (рассчитывается по гидрохлориду гексилового эфира 5-АЛК). В отделении модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии МНИОИ им. П. А. Герцена были выполнены доклинические исследования [7, 18, 19]. В 2014 г. в МНИОИ им. П. А. Герцена была завершена организованная ГНЦ «НИОПИК» I фаза клинических исследований препарата по протоколу «Контролируемое открытое исследование переносимости и диагностической эффективности препарата гексасенс — фотосенсибилизатора для флюоресцентной диагностики (ФД) рака мочевого пузыря». Проведенные исследования показали

отсутствие во всех исследованных дозах (60–100 мг) общих токсических реакций, гемато-, гепато- и нефротоксичности, а также отсутствие местнораздражающего действия раствора препарата на слизистую оболочку мочевого пузыря в концентрации 0,12–0,2 %. Результаты I фазы клинического исследования «Гексасенса» для дозы 100 мг соответствуют опубликованным данным клинического исследования «Гексвикса» для той же дозы.

Следующим этапом разработки препарата «Гексасенс» является организация II и III фаз клинического исследования. Назначение II фазы — определение оптимальной дозировки препарата, режима и курса лечения или диагностики, а III фазы — установление безопасности и эффективности препарата для пациентов с определенным заболеванием. Целью нашего исследования являлась оценка возможности объединения II и III фаз клинического исследования. Мы поставили задачи разработать схемы оценки эффективности флюоресцентной диагностики с «Гексасенсом» (часть дизайна Протокола клинического исследования) и статистически обосновать возможность объединения фаз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для расчета необходимого размера выборки пациентов и оценки возможности получения достоверных результатов на этой выборке при разработанном дизайне клинического исследования использовали формулу [20, 21]:

$$N = [A+B]2 \times [p_1 \times (1-p_1) + p_2 \times (1-p_2)] / [p_1 - p_2]^2 \quad (1),$$

где p_1 и p_2 — это ожидаемые пропорции (чувствительность и специфичность), A и B — табличные критические значения нормального распределения, соответствующие заданным уровням ошибок 1 рода и выбранного уровня значимости, $(p_1 - p_2)$ — минимальная клинически значимая разность, которая может быть обнаружена.

Для корректного расчета были оценены и заданы ожидаемые значения чувствительности и специфичности, определено минимальное клинически значимое различие, а также сделана поправка на множественность сравнения по методу Бонферрони.

При расчете необходимой выборки пациентов учитывали статистические методы, которые планируется использовать в дальнейшем при оценке результатов клинического исследования. Оцениваемые параметры эффективности диагностики (чувствительность и специфичность) представляют собой частоты, измеряемые в процентах, и предполагается тестирование статистической гипотезы об одинаковой эффективности двух разных доз исследуемого препарата. В качестве нулевой гипотезы положили равенство измеряемых пропорций p_1 и p_2 в опытных группах, а за альтернативную гипотезу приняли неравенство эффективности двух разных доз в любом из направлений (двусторонняя гипотеза):

$$H_0: p_1 = p_2$$

$$H_A: p_1 \neq p_2$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами была разработана методика диагностики и оценки её результатов, вошедшая в Протокол № 02-(ФД-ГЭ)-2014 II–III фазы клинического исследования препарата «Гексасенс».

У каждого пациента должны быть исследованы на наличие опухолевых клеток:

- очаги, определяемые как опухолевые в белом свете (как флюоресцирующие, так и не флюоресцирующие);
- очаги дополнительной флюоресценции (при наличии);
- контрольные очаги (не флюоресцирующие и определяемые в белом свете как неизменная слизистая — для взятия контрольной «слепой» биопсии, по одному очагу у каждого пациента).

Оценка эффективности диагностики (ФД и стандартной цистоскопии) должна проводиться по параметрам чувствительности и специфичности. Результаты должны быть представлены в виде суммарного количества истинно положительных, истинно отрицательных, ложноположительных и ложноотрицательных результатов (рис. 1 и 2). Значения параметров чувствительности и специфичности должны быть подсчитаны по формулам (2) и (3):

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИП}}{(\text{ИП}+\text{ЛО})} \times 100 \% \quad (2),$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{ИО}}{(\text{ЛП}+\text{ИО})} \times 100 \% \quad (3).$$

Было решено провести в рамках клинического исследования сравнительную оценку эффективности ФД с учётом времени экспозиции раствора препарата в мочевом пузыре 1 и 2 ч (II фаза исследования, две группы пациентов). В I фазе исследования время экспозиции 2 ч доставляло пациентам неудобство, поэтому важно определить оптимальное время экспозиции раствора, а затем оценить эффективность ФД с выбранным временем экспозиции в сравнении со стандартной цистоскопией в белом свете (III фаза исследования). Всем пациентам, включенным в исследование, должна быть проведена и ФД, и стандартная цистоскопия ещё во II фазе исследования, поэтому мы предположили, что для сравнительного анализа можно использовать результаты ФД и цистоскопии в белом свете, полученные в начале (ретроспективный анализ). Это позволит решать задачи III фазы исследования без набора новых пациентов. Максимально возможное значение, которое может принимать величина $r^*(1-r)$ из уравнения (1), составляет 0,25 при $r = 0,5$. Если положить минимальную клинически значимую разность 5 %, тогда при общем уровне значимости 5 % (соответствует уровню значимости 2,5 % для каждого из двух сравнений), $A = 2,24$ и мощности 80 % ($B = 0,84$) в каждую

группу необходимо включить:

$$N = [2,24 + 0,84]^2 \times [0,25 + 0,25] / [0,05]^2 = 1898 \text{ очагов.}$$

Критерием включения пациентов в планируемое исследование является распространенность опухолевого процесса по классификации TNM T_a-isNOM₀ (T_a — неинвазивная папиллярная карцинома, T_{is} — преинвазивная карцинома (carcinoma in situ), N₀ — метастазы в регионарных лимфатических узлах отсутствуют, M₀ — отдаленные метастазы отсутствуют) и T₁NOM₀ (T₁ — опухоль распространяется на субэпителиальную соединительную ткань, N₀ — метастазы в регионарных лимфатических узлах отсутствуют, M₀ — отдаленные метастазы отсутствуют). Исходя из опыта врачей-исследователей, принимавших участие в проведении I фазы клинического исследования препарата «Гексасенс», предположили, что среднее количество исследованных очагов у пациентов составит 4 (3 опухолевых очага и 1 контрольный очаг). С учетом этого в каждую группу необходимо включить 475 человек. Кроме того, необходимо взять поправку, по меньшей мере 10 % на то, что часть пациентов может выбыть из исследования по разным причинам (несоблюдение процедур исследования, развитие тяжелых нежелательных реакций, желание пациента прекратить исследование, беременность пациента). Тогда общее количество пациентов составит 1044.

В приведенной формуле (1) основным фактором, определяющим размер выборки, является величина минимальной клинически значимой разности. Ниже приведена зависимость величины N от этой разности (табл. 1). Для проведения исследования приняли минимальную клинически значимую разность между показателями чувствительности и специфичности 10 %. В этом случае общее количество пациентов, как следует из таблицы 3, составит 262 человека. Необходимое количество пациентов также зависит от предполагаемых значений пропорций (чувствительности и специфичности) (табл. 2). Из данных о результатах клинического исследования препарата «Гексвикс» известно, что чувствительность и специфичность ФД с его использованием составляет не менее 85 %. В этом случае общее количество пациентов при уровне значимости 2,5 %, мощности 80 % и для минимальной разности пропорций 10 % с учетом поправки 10 % составит 134 человека в двух группах:

$$N = [2,24 + 0,84]^2 \times [0,85 \times 0,15 + 0,85 \times 0,15] / [0,1]^2 = 242 \text{ очага.}$$



Рис. 1. Оценка сопоставления результатов морфологического исследования и ФД



Рис. 2. Оценка сопоставления результатов морфологического исследования и стандартной цистоскопии

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если после проведения II фазы клинического исследования (выбор оптимального времени экспозиции раствора) не будут выявлены достоверные различия в эффективности двух вариантов, для дальнейшей оценки должно быть рекомендовано время экспозиции 1 ч как доставляющее наименьшие неудобства пациенту.

В III фазе исследования режим ФД с оптимальным временем экспозиции раствора будет сравниваться с полученными для этой же группы пациентов результатами стандартной цистоскопии в белом свете. За достоверно значимую разность значений чувствительности и специфичности будет принята разность 10 %. В этом случае та же выборка пациентов (67 человек, каждому из которых проводили оба вида диагностики) при поправке на множественность сравнения (уровень значимости 2,5 %) позволит достоверно сравнить эффективность двух видов диагностики.

Документы, обосновывающие целесообразность объединения II и III фаз клинического исследования препарата «Гексасенс», были поданы на экспертизу в Министерство здравоохранения РФ и были одобрены. Было выдано разрешение на проведение клинического исследования по Протоколу № 02-(ФД-ГЭ)-2014 (версия 2 от 24.04.2015 г.) «Контролируемое открытое исследование диагностической эффективности препарата гексасенс — фотосенсибилизатора для флуоресцентной диагностики рака мочевого пузыря» № 304 от 9 июня 2015 г. В июне 2015 г. начаты клинические исследования по Протоколу в трех исследовательских центрах: МНИОИ им. П.А. Герцена, Онкологическом клиническом диспансере № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы, Городской клинической больнице № 40 Департамента здравоохранения г. Москвы.

ВЫВОДЫ

Была разработана схема двухфазной оценки эффективности флуоресцентной диагностики с применением фотосенсибилизатора «Гексасенс», позволившая объединить в одном Протоколе клинического исследования II и III фазы исследования с участием минимального числа пациентов и без потери в достоверности результатов оценки. Объединение фаз было обосновано статистически. Был рассчитан необходимый объем выборки пациентов — 2 группы по 67 человек (134 пациента в исследовании). Такой выборки будет достаточно для получения статистически достоверных результатов сравнительной оценки эффективности флуоресцентной диагностики со временем экспозиции раствора препарата 1 и 2 ч, а также срав-

Литература

1. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, application and perspectives. *Photochem Photobiol.* 2006 Jul-Aug; 82 (4): 994–1015.
2. Stepp H, Wagner M, Zaak D, Knuchelclarke R. Fluorescence diagnosis of bladder tumors using 5-ALA — fundamentals and result. *Munich*, 1999.
3. Филоненко Е. В. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия — обоснование применения и возможности в онкологии. *Фотодинамич. тер и фотодиагност.* 2014; 1: 3–7.
4. Figueira F, Cavaleiro JAS., Tome JPC. Silica nanoparticles functionalized with porphyrins and analogs for biomedical studies. *J Porphy Phthalocyanines.* 2011; 15: 517–33.
5. Соколов В. В., Филоненко Е. В., Телегина Л. В., Булгакова Н. Н., Смирнов В. В. Комбинация флуоресцентного изображения и локальной спектроскопии при флуоресцентной диагностике раннего рака гортани и бронхов. *Квант. электрон.* 2002; 32 (11): 963–9.
6. Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, Donat R, Susani M, Marberger M. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with

Таблица 1. Зависимость необходимого размера выборки от минимальной клинически значимой разности в параметрах эффективности двух вариантов диагностики

| $p_1 - p_2$, % | Число очагов на группу | Пациентов в группе | Пациентов в двух группах | Общее число пациентов с поправкой 10 % |
|-----------------|------------------------|--------------------|--------------------------|--|
| 2 | 11858 | 2965 | 5930 | 6522 |
| 5 | 1898 | 475 | 950 | 1044 |
| 10 | 474 | 119 | 238 | 262 |
| 15 | 211 | 53 | 106 | 116 |
| 20 | 119 | 30 | 60 | 66 |

Примечание: Расчет выполнен при уровне значимости 2,5 % и мощности 80 %.

Таблица 2. зависимость необходимого размера выборки от истинных значений пропорций p_1 и p_2

| $p_1 = p_2$, % | Число очагов на группу | Пациентов в группе | Пациентов в двух группах | Общее число пациентов с поправкой 10 % |
|-----------------|------------------------|--------------------|--------------------------|--|
| 50 | 474 | 119 | 238 | 262 |
| 60 | 455 | 114 | 228 | 252 |
| 70 | 398 | 100 | 200 | 220 |
| 75 | 356 | 89 | 178 | 196 |
| 80 | 304 | 76 | 152 | 168 |
| 85 | 242 | 61 | 122 | 134 |
| 90 | 171 | 43 | 86 | 94 |
| 95 | 90 | 23 | 46 | 50 |
| 99 | 19 | 5 | 10 | 12 |

Примечание: расчет выполнен при уровне значимости 2,5 %, мощности 80 % и для минимальной разности пропорций 10 %.

нительной оценки эффективности лучшего варианта ФД и стандартной цистоскопии при заданном уровне значимости отличий в параметрах чувствительности и специфичности 10 %.

Работа выполнена в рамках государственного контракта с Министерством промышленности и торговли РФ № 13411.1008799.13.124 от 25.06.2013 г. по мероприятию «Организация и проведение клинических исследований инновационных лекарственных препаратов» Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

- hexaminolevulinic acid fluorescence cystoscopy. *J Urol.* 2004 Jan; 171 (1): 135–8.
7. Якубовская Р. И., Лукьянец Е. А., Негримовский В. М. и др. Новый отечественный препарат гексасенс-лио для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных новообразований. *Рос. биотер. журн.* 2008; 7 (1): 27–8.
8. Jichlinski P, Guillou L, Karlsen SJ, Malmstrom PU, Jocham D, Brennhovd B, et al. Hexyl aminolevulinic acid fluorescence cystoscopy: a new diagnostic tool for the photodiagnosis of superficial bladder cancer — a multicenter study. *J Urol.* 2003 Jul; 170 (1): 226–9.
9. De Leeuw J, van der Beek N, Neugebauer WD, Bjerring P, Neumann HA. Fluorescence detection and diagnosis of non-melanoma skin cancer at an early stage. *Lasers Surg Med.* 2009 Feb; 41 (2): 96–103. doi: 10.1002/lsm.20739.
10. Datta SN, Loh CS, MacRobert AJ, Whatley SD, Matthews PN. Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1998 Oct; 78 (8): 1113–8.

11. Zaak D., Frimberger D., Stepp H. et al. Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection. *J Urol.* 2001 Nov; 166 (5): 1665–9.
12. Филоненко Е. В., Гришаева А. Б. Методологические аспекты флюоресцентной диагностики злокачественных опухолей с препаратом аласенс. *Рос. онкол. журн.* 2011. 5: 30–3.
13. Чиссов В. И., Соколов В. В., Булгакова (Жаркова) Н. Н., Филоненко Е. В. Флюоресцентная эндоскопия, дермаскопия и спектрофотометрия в диагностике злокачественных опухолей основных локализаций. *Рос. биотер. журн.* 2003; 2 (4): 46–56.
14. Трахтенберг А. Х., Соколов В. В., Филоненко Е. В., Сухин Д. Г. Торакоскопическая флюоресцентная диагностика и внутриплевральная терапия у онкологических больных с первичным и метастатическим плевритом. *Рос. онкол. журн.* 2009; 2: 8–11.
15. Филоненко Е. В., Сотников В. Н., Разживина А. А., Перевозников А. И. Возможности флюоресцентной диагностики с препаратом Аласенс в колопроктологии. *Сибирск. онкол. журн.* 2010; 6: 12–6.
16. Goh AC, Lerner SP. Application of new technology in bladder cancer diagnosis and treatment. *World J Urol.* 2009 Jun; 27 (3): 301–7. doi: 10.1007/s00345-009-0387-z. Epub 2009 Feb 22.
17. Geavlete B, Multescu R, Georgescu D, Geavlete P. Hexvix induced fluorescence blue light cystoscopy — a new perspective in superficial bladder tumors diagnosis. *Chirurgia (Bucur).* 2008 Sep–Oct; 103 (5): 559–64.
18. Панкратов А. А., Венедиктова Ю. Б., Андреева Т. А. и др. Оценка общетоксических свойств препарата гексасенс на мелких лабораторных животных. *Рос. онкол. журн.* 2010; 3: 19–21.
19. Якубовская Р. И., Казачкина Н. И., Плютинская А. Д., Панкратов А. А., Андреева Т. Н., Венедиктова Ю. Б. и др. Новый отечественный препарат «Гексасенс» для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных новообразований. *Рос. онкол. журн.* 2009; 2: 17–22.
20. Dunnett CW, Gent M. Significance testing to establish equivalence between treatments, with special reference to data in the form of 2X2 tables. *Biometrics.* 1977 Dec; 33 (4): 593–602.
21. Ляшенко А. А., Свищева М. С. Методология расчета объема выборки в сравнительных контролируемых клинических исследованиях с «неменьшей эффективностью»: сравнение двух пропорций в параллельных группах. *Кач. клин. практик.* 2014; 3: 24–8.

References

1. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochem Photobiol.* 2006 Jul–Aug; 82 (4): 994–1015.
2. Stepp H, Wagner M, Zaak D, Knuchelclarke R. Fluorescence diagnosis of bladder tumors using 5-ALA — fundamentals and result. Munich, 1999.
3. Filonenko EV. Fluorestsennaya diagnostika i fotodinamicheskaya terapiya — obosnovanie primeneniya i vozmozhnosti v onkologii.
4. Figueira F, Cavaleiro JAS, Tome JPC. Silica nanoparticles functionalized with porphyrins and analogs for biomedical studies. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2011; 15: 517–33.
5. Sokolov VV, Filonenko EV, Telegina LV, Bulgakova NN, Smirnov VV. Kombinatsiya fluorestsennogo izobrazheniya i lokal'noy spektrofotometrii pri fluorestsennoy diagnostike rannego raka gortani i bronkhov. *Kvant Electron.* 2002; 32 (11): 963–9. Russian.
6. Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, Donat R, Susani M, Marberger M, et al. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinic acid fluorescence cystoscopy. *J Urol.* 2004 Jan; 171 (1): 135–8.
7. Yakubovskaya RI, Lukyanets EA, Negrimovskiy VM, Pankratov AA, Kazachkina NI. Noviy otechestvennyy preparat geksasens-lio dlya fluorestsennoy diagnostiki i fotodinamicheskoy terapii zlokachestvennykh novoobrazovaniy. *Ros. Biother. Zh.* 2008; 7 (1): 27–8. Russian.
8. Jichlinski P, Guillou L, Karlsen SJ, Malmstrom PU, Jocham D, Brennhovd B, et al. Hexyl aminolevulinic acid fluorescence cystoscopy: a new diagnostic tool for the photodiagnosis of superficial bladder cancer — a multicenter study. *J Urol.* 2003 Jul; 170 (1): 226–9.
9. De Leeuw J, van der Beek N, Neugebauer WD, Bjerring P, Neumann HA. Fluorescence detection and diagnosis of non-melanoma skin cancer at an early stage. *Lasers Surg Med.* 2009 Feb; 41 (2): 96–103. doi: 10.1002/lsm.20739.
10. Datta SN, Loh CS, MacRobert AJ, Whatley SD, Matthews PN. Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1998 Oct; 78 (8): 1113–8.
11. Zaak D, Frimberger D, Stepp H, Wagner S, Baumgartner R, Schneede P, et al. Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection. *J Urol.* 2001 Nov; 166 (5): 1665–9.
12. Filonenko EV, Grishaeva AB. Metodologicheskie aspekty fluorestsennoy diagnostiki zlokachestvennykh opuholey s preparatom alasens. *Ros. Onkol Zh.* 2011; 5: 30–3. Russian.
13. Chissov VI, Sokolov VV, Bulgakova (Zharkova) NN, Filonenko EV. Fluorestsennaya endoskopiya, dermaskopiya i spektrofotometriya v diagnostike zlokachestvennykh opuholey osnovnykh lokalizatsiy. *Ros. Biother Zh.* 2003; 2 (4): 46–56. Russian.
14. Trakhtenberg AKh, Sokolov VV, Filonenko EV, Sukhin DG. Torakoskopicheskaya fluorestsennaya diagnostika i vnutriplevral'naya terapiya u onkologicheskikh bol'nykh s pervichnym i metastaticheskim plevritom. *Ros Onkol Zh.* 2009; (2): 8–11. Russian.
15. Filonenko EV, Sotnikov VN, Razzhivina AA, Perevoznikov AI. Vozmozhnosti fluorestsennoy diagnostiki s preparatom Alasens v koloproktologii. *Sibirsk Onkol Zh.* 2010; (6): 12–6. Russian.
16. Goh AC, Lerner SP. Application of new technology in bladder cancer diagnosis and treatment. *World J Urol.* 2009 Jun; 27 (3): 301–7. doi: 10.1007/s00345-009-0387-z. Epub 2009 Feb 22.
17. Geavlete B, Multescu R, Georgescu D, Geavlete P. Hexvix induced fluorescence blue light cystoscopy — a new perspective in superficial bladder tumors diagnosis. *Chirurgia (Bucur).* 2008 Sep–Oct; 103 (5): 559–64.
18. Pankratov AA, Venediktova YuB, Andreeva TA, Yakubovskaya RI, Raikhlin NT. Otsenka obshhetoksicheskikh svoystv preparata geksasens na melkikh laboratornykh zhivotnykh. *Ros. Onkol Zh.* 2010; (3): 19–21. Russian.
19. Yakubovskaya RI, Kazachkina NI, Plyutinskaya AD, Pankratov AA, Andreeva TN, Venediktova YuB, et al. Noviy otechestvennyy preparat «Geksasens» dlya fluorestsennoy diagnostiki i fotodinamicheskoy terapii zlokachestvennykh novoobrazovaniy. *Ros. onkol. zhurn.* 2009; (2): 17–22.
20. Dunnett CW, Gent M. Significance testing to establish equivalence between treatments, with special reference to data in the form of 2X2 tables. *Biometrics.* 1977 Dec; 33 (4): 593–602.
21. Lyashenko AA, Svisheva MS. Metodologiya rascheta obyoma vyborki v sravnitel'nykh kontroliruemyykh klinicheskikh issledovaniyakh s "nemen'shey effektivnost'yu": sravnenie dvukh proporciy v parallel'nykh gruppakh. *Kach Klin Prakt.* 2014; (3): 24–8. Russian.

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ И ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЙ ДЕТЕКТОР ВОСПАЛЕНИЯ

В. Ю. Титов✉, М. В. Крейнаина, В. А. Петров, А. Н. Осипов, П. Р. Камчатнов, Р. И. Шалина

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Воспаление является ведущим звеном патогенеза многих заболеваний. Ранняя диагностика воспаления может рассматриваться как важный способ предотвращения развития заболеваний и их осложнений. Очень остро эта проблема стоит при контроле состояния больных в стационарах, особенно неврологического, психиатрического, реанимационного профиля, когда больные часто не могут сами сообщить врачу о своем состоянии. Очевидно, что необходим высокочувствительный, высокоспецифичный и в то же время высокопроизводительный, дешевый и легкий в освоении диагностический метод. В статье представлен метод ранней диагностики воспаления, разработанный на кафедре биофизики РНИМУ им. Н. И. Пирогова и испытанный на кафедрах хирургии, неврологии, акушерства и гинекологии университета. Метод основан на оценке состава нитрозосоединений плазмы крови. Содержание в плазме крови человека нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в концентрации свыше 100 нМ — однозначный признак воспаления. Разработанный высокоспецифичный ферментный детектор, имеющий чувствительность 50 нМ, позволяет производить определение в течение нескольких минут. Для анализа требуется не более 1 мл крови. Основное внимание уделено эффективности данной разработки, возможности ее внедрения в практическое здравоохранение.

Ключевые слова: оксид азота, нитрит, нитрат, динитрозильные комплексы железа, N-нитрозосоединения, активные формы кислорода, нейтрофилы, воспаление

✉ Для корреспонденции: Владимир Юрьевич Титов
117997, Москва, ул. Островитянова, 1; vtitov43@yandex.ru
Статья поступила: 13.09.2015 Статья принята в печать: 20.11.2015

HIGH SENSITIVITY AND HIGH SPECIFICITY INFLAMMATION DETECTOR

Titov VY✉, Kreynina MV, Petrov VA, Osipov AN, Kamchatnov PR, Shalina RI

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Inflammation is a major component in the pathogenesis of many diseases. Early inflammation diagnosis can be seen as an important means of preventing the development of a disease and its complications. This issue is pressing when considering control over inpatients condition, especially in neurological, psychiatric, and intensive care facilities where patients are often unable to inform the doctor about their state. Obviously, a high sensitivity and high specificity diagnostic tool is essential that at the same time would be high performing, cost effective and easy to use. This article introduces a method for early detection of inflammation designed by the Department of Biophysics of Pirogov Russian National Research Medical University and tested by the Departments of Surgery, Neurology, Obstetrics and Gynecology. The method is based on the evaluation of nitroso compounds constituents in blood plasma. Elevated levels of nitrite and non-thiolate compounds in blood plasma (over 100 nM) are a definite sign of inflammation. A high specificity enzyme detector with a sensitivity of 50 nM allows to perform the test within a few minutes. No more than 1 ml of blood is required for the assay. The article focuses on the effectiveness of this invention and the possibility of its implementation into practical healthcare.

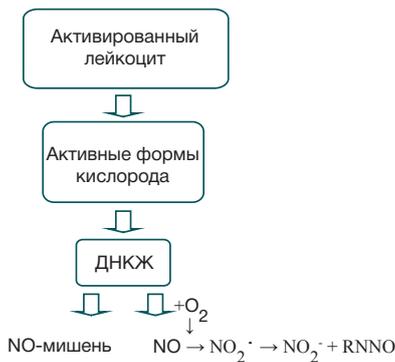
Keywords: nitric oxide, nitrite, nitrate, dinitrosyl iron complexes, N-nitroso compounds, active oxygen forms, neutrophils, inflammation

✉ Correspondence should be addressed: Vladimir Titov
1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997; vtitov43@yandex.ru
Received: 13.09.2015 Accepted: 20.11.2015

Содержание нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме крови человека как индикатор воспаления

Одним из общих признаков воспаления является активация нейтрофилов и макрофагов [1, 2]. Последние при активации продуцируют активные формы кислорода (АФК). В отсутствие активации лейкоцитов АФК практически не продуцируются [1, 2]. Таким образом, продукция лейкоцитами АФК — высокоспецифичный признак воспаления. Но как использовать этот феномен для диагностики? Регистрация продуктов перекисного окисления липидов, индуцируемого АФК, едва ли пригодна для экспресс-диагностики в практическом здравоохранении, как и регистрация хемилюминесценции лейкоцитов, продуцирующих АФК. В работах А. Ф. Ванина и

соавт. [3, 4] установлено, что оксид азота (NO), а также динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) — физиологическое депо NO, являются эффективными ловушками супероксидного анион-радикала: константа скорости взаимодействия порядка $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Таким образом, для диагностики вполне возможно использовать этот феномен, при условии что в случае взаимодействия NO или ДНКЖ с супероксидным радикалом образуется продукт, которого в норме в живых тканях нет или он присутствует в следовых количествах. Нами показано, что при инкубации ДНКЖ с плазмой крови, содержащей активированные лейкоциты, последние трансформируются в соединения, определяемые как нитрит (NO_2^-) и N-нитрозосоединения (RNNO), при этом в норме NO_2^- и RNNO регистрируются в плазме крови в следовых количествах (рисунок)



Предполагаемый механизм появления нитрита и RNNO в плазме крови при воспалении (исходя из собственных данных)

Таблица 1. Концентрация нитро- и нитрозосоединений в плазме крови здоровых доноров и пациентов, страдающих различными воспалительными заболеваниями (мкМ)

| Группа обследуемых | ДНКЖ/SH | NO ₂ ⁻ + RNNO |
|--|---------|-------------------------------------|
| Здоровые лица (n = 10) | 3–20 | Следы |
| ЛОП-больные (n = 6) | 6–20 | 1–2,5 |
| Острый панкреатит (n = 8) | 6–15 | 0,8–3 |
| Острый холецистит (n = 1) | 5,5 | 0,9 |
| Абсцесс печени (n = 1) | 8 | 0,6 |
| Острый аппендицит (n = 2) | 4–10 | 2,5–10 |
| Острая кишечная непроходимость (n = 1) | 5,5 | 4,5 |
| ОРЗ (n = 4) | 7,5–15 | 0,3–1,2 |

Примечание: RSNO и RNO₂ во всех образцах присутствовали в следовых количествах. Концентрация нитрата у здоровых и больных варьировала от 10 до 150 мкМ.

Таблица 2. Концентрация нитро- и нитрозосоединений в плазме крови больных, страдающих воспалительными заболеваниями, при поступлении в стационар и при выписке (мкМ)

| Пациент, № | Диагноз | ДНКЖ/SH | | NO ₂ ⁻ + RNNO | | NO ₃ ⁻ | |
|------------|-------------------|-------------|------------|-------------------------------------|---------|------------------------------|--------------|
| | | Поступление | Выписка | Поступление | Выписка | Поступление | Выписка |
| 1 | Острый гайморит | 15,0 ± 0,9 | 7,0 ± 0,5 | 1,5 ± 0,08 | Следы | 150,0 ± 13,0 | 120,0 ± 12,0 |
| 2 | То же | 25,0 ± 2,0 | 20,0 ± 2,0 | 1,0 ± 0,05 | Следы | 45,0 ± 5,0 | 20,0 ± 1,8 |
| 3 | То же | 12,5 ± 1,0 | 7,0 ± 0,8 | 1,2 ± 0,07 | Следы | 84,0 ± 7,8 | 60,0 ± 5,5 |
| 4 | Острый холецистит | 5,5 ± 0,45 | 4,0 ± 0,3 | 0,9 ± 0,05 | Следы | 38,0 ± 2,8 | 55,0 ± 2,5 |
| 5 | ОРЗ | 10,0 ± 0,75 | 7,5 ± 0,3 | 1,2 ± 0,08 | Следы | 32,0 ± 1,6 | 54,0 ± 3,0 |

Примечание: данные представлены как M ± m, n = 4.

[5, 6]. Для определения состава нитро- и нитрозосоединений крови использовался разработанный и запатентованный нами ферментный сенсор, позволяющий с высокой точностью (до 50 нМ) и с высокой специфичностью определить основные группы метаболитов NO в биологических объектах без предварительной очистки. Метод основан на уникальном свойстве нитрита, N-нитрозосоединений, S-нитрозотиолов (RSNO) и ДНКЖ ингибировать каталазу в присутствии галогид-ионов и на утрате ими этого свойства под действием определенных химических агентов, различных для каждой группы соединений [5, 7–10]. Так, ДНКЖ разрушаются хелаторами железа (ЭДТА, о-фенантролин), а высвобождающийся NO связывается оксигемоглобином — ловушкой NO, в связи с чем ингибирующий эффект утрачивается. RSNO можно трансформировать в ДНКЖ в присутствии закисного железа. Нитрит и RNNO не продуцируют в нейтральной среде нитрозильных комплексов железа и не теряют способности ингибировать каталазу в среде, содержащей хелатор железа и ловушку NO ни до, ни после добавления закисного железа и тиолов. Других эффективных ингибиторов каталазы биологические объекты в норме не содержат [10, 11]. Высокомолекулярные нитраты (RNO₂), в отличие от неорганического нитрата, могут приобретать ингибирующие свойства ДНКЖ в присутствии закисного железа и тиолов [12]. Под действием треххлористого ванадия все нитрозосоединения восстанавливаются до нитрозосостояния и приобретают способность ингибировать каталазу [11].

При помощи ферментного сенсора установлено, что в норме концентрация нитрита и RNNO в плазме крови составляет менее 50 нМ. Однако при воспалении, в связи с трансформацией содержащихся в плазме ДНКЖ под действием продуцируемых активированными лейкоцитами АФК, содержание нитрита и RNNO резко возрастает при пропорциональном снижении содержания ДНКЖ, которые в норме в плазме крови регистрируются в микромолярных концентрациях [6, 10, 11, 13]. Концентрация в плазме крови нитрита и RNNO, превышающая 100 нМ, — однозначный признак воспаления, поскольку у всех исследованных нами больных с выраженными симптомами воспаления суммарное содержание нитрита и RNNO (NO₂⁻ + RNNO) в плазме было значительно выше 100 нМ. При

купировании воспалительного процесса содержание этих соединений возвращалось к норме. В то же время повышение концентрации NO₂⁻ + RNNO в плазме крови наблюдалось задолго до наступления клинических симптомов [14–16].

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что суммарная концентрация NO₂⁻ + RNNO в плазме крови больных с воспалительными заболеваниями варьировала от 0,3 мкМ (больной с ОРЗ) до 10 мкМ (больной с острым аппендицитом). По мере выздоровления концентрация NO₂⁻ + RNNO снижалась до следовой (табл. 2, 3). В содержании других нитро- и нитрозосоединений каких-либо достоверных изменений не отмечено (табл. 2). Концентрация нитрата в плазме крови здоровых лиц и больных колебалась от 10 до 150 мкМ [10]. Каких-либо достоверных изменений его содержания при выздоровлении больных с воспалительными заболеваниями также не выявлено (табл. 2). Таким образом, установлено, что содержание нитрита и нитролатных нитрозосоединений (NO₂⁻ + RNNO) в плазме крови человека, превышающее 100 нМ, — однозначный признак воспаления.

Таблица 3. Концентрация NO₂⁻ + RNNO в плазме крови пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, при поступлении в стационар и при выписке (мкМ)

| Пациент, № | Диагноз | NO ₂ ⁻ + RNNO при поступлении | NO ₂ ⁻ + RNNO при выписке |
|------------|-------------------|---|---|
| 1 | Острый гайморит | 1,5 ± 0,15 | Следы |
| 2 | Острый гайморит | 1,1 ± 0,09 | Следы |
| 3 | Острый гайморит | 0,9 ± 0,05 | Следы |
| 4 | Острый холецистит | 0,9 ± 0,05 | Следы |
| 5 | Абсцесс печени | 0,6 ± 0,05 | Следы |
| 6 | Острый аппендицит | 10,0 ± 0,9 | 0,8 ± 0,08 |
| 7 | Острый аппендицит | 2,5 ± 0,2 | Следы |
| 8 | Панкреонекроз | 0,85 ± 0,07 | Следы |
| 9 | Панкреонекроз | 2,7 ± 0,3 | 0,5 ± 0,03 |
| 10 | Панкреонекроз | 1,25 ± 0,15 | 0,45 ± 0,03 |
| 11 | ОРЗ | 0,3 ± 0,08 | Следы |
| 12 | ОРЗ | 1,2 ± 0,08 | Следы |
| 13 | ОРЗ | 1,7 ± 0,1 | Следы |

Примечание: данные представлены как M ± m, n = 4.

Применение ферментного сенсора для контроля состояния больных в неврологическом стационаре

Под наблюдением находились 29 больных с острым ишемическим инсультом (ИИ) (15 мужчин и 14 женщин, средний возраст — 71,9 ± 10,8 года), госпитализированных в течение первых суток от момента развития заболевания в клинику кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Диагноз ИИ, локализацию и объем поражения устанавливали на основании клинической картины и подтверждали результатами компьютерной томографии или магнитно-резонансной томографии головного мозга. В исследование не включали больных с геморрагическим или смешанным характером инсульта, локализацией очага в вертебрально-базиллярной системе, со сроком ИИ более 24 ч с момента развития, с онкологическими заболеваниями.

Для диагностики воспалительного процесса в бронхолегочной или мочевыделительной системе использовали стандартные критерии клинического осмотра: повышение температуры тела до 37–39 °С, кашель со слизисто-гнойной мокротой; поллакиурия (учащенное мочеиспускание), изменение цвета и состава мочи (мутная, зловонная), увеличение количества лейкоцитов в периферической крови, повышение СОЭ, лейкоцитурия и протеинурия. Для подтверждения диагноза также использовали рентгенографию легких, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, бактерио-

логическое исследование биологических сред (мокрота, моча, кровь). Определение концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ проводили на 1, 5 и 21-е сутки с момента поступления в стационар.

При поступлении в стационар концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$, превышающая 0,1 мкМ, была зарегистрирована у 9 больных — № 1, 3, 8, 11, 14, 17, 19, 20, 24 (табл. 4). Клинические симптомы воспаления были отмечены у 3 из них — № 14, 17, 24. У этих же больных были также зафиксированы повышенные показатели количества лейкоцитов и СОЭ. Однако эти показатели были повышенными еще у 6 больных, у которых не было клинических симптомов воспаления; концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ у них была менее 0,1 мкМ (№ 4, 5, 6, 16, 27, 28).

На 5-е сутки клинические симптомы воспаления проявились еще у 4 больных из числа тех, у кого при поступлении содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ было повышенным. В 2 случаях было выявлено обострение хронического пиелонефрита (№ 8, 19), в 1 случае — обострение хронического бронхита (№ 1) и в 1 — пневмония (№ 20). Повышенная концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ была зафиксирована еще у 5 больных, у которых при поступлении этот показатель был в норме (№ 2, 6, 12, 22, 23). Во всех случаях отмечены симптомы воспаления (табл. 5).

Как видно из табл. 6, к 21-м суткам вследствие проведенной антибактериальной и противовоспалительной терапии симптомы воспаления сохранились только у 4 больных — № 7, 17, 22, 23. Им соответствовало повышенное содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови. У остальных больных

Таблица 4. Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови, клинические и лабораторные показатели у больных с ИИ при поступлении в стационар

| Номер наблюдения | Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$, мкМ | Наличие клинических симптомов воспаления | Проводимая антибактериальная и противовоспалительная терапия | Лейкоциты, тыс/мм ³ (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма: 2–15) |
|------------------|--|--|--|---|-------------------------|
| 1 | 0,4 | Нет | – | 6,7 | 8 |
| 2 | <0,1 | Нет | – | 7,9 | 10 |
| 3 | 0,5 | Нет | – | 8,8 | 9 |
| 4 | <0,1 | Нет | – | 9,7 | 10 |
| 5 | <0,1 | Нет | – | 15,7 | 11 |
| 6 | <0,1 | Нет | – | 10,5 | 20 |
| 7 | <0,1 | Нет | – | 7,0 | 9 |
| 8 | 0,8 | Нет | – | 8,9 | 8 |
| 9 | <0,1 | Нет | – | 7,8 | 8 |
| 10 | <0,1 | Нет | – | 5,8 | 11 |
| 11 | 1,0 | Нет | – | 17,0 | 9 |
| 12 | <0,1 | Нет | – | 7,2 | 4 |
| 13 | <0,1 | Нет | – | 6,6 | 9 |
| 14 | 2,5 | Госпитальная двусторонняя пневмония | Цефтриаксон, тиамфениколаглицинат ацетилцистеинат | 4,7 | 18 |
| 15 | <0,1 | Нет | – | 9,4 | 3 |
| 16 | <0,1 | Нет | – | 10,5 | 17 |
| 17 | 1,2 | Левосторонняя нижнедолевая пневмония | Цефтриаксон | 12,1 | 22 |
| 18 | <0,1 | Нет | – | 4,5 | 3 |
| 19 | 0,5 | Нет | – | 9,4 | 15 |
| 20 | 0,6 | Нет | – | 5,2 | 9 |
| 21 | <0,1 | Нет | – | 9,2 | 10 |
| 22 | <0,1 | Нет | – | 10,9 | 10 |
| 23 | <0,1 | Нет | – | 7,0 | 11 |
| 24 | 1,2 | Острый пиелонефрит | – | 11,7 | 25 |
| 25 | <0,1 | Нет | – | 6,5 | 8 |
| 26 | <0,1 | Нет | – | 9,1 | 7 |
| 27 | <0,1 | Нет | – | 15,7 | 10 |
| 28 | <0,1 | Нет | – | 11,1 | 8 |
| 29 | <0,1 | Нет | – | 7,0 | 13 |

Таблица 5. Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови, клинические и лабораторные показатели у пациентов с ИИ на 5-е сутки после поступления в стационар

| Номер наблюдения | Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$, мкМ | Наличие клинических симптомов воспаления | Проводимая антибактериальная и противовоспалительная терапия | Лейкоциты, тыс/мм ³ (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма: 2–15) |
|------------------|--|--|--|---|-------------------------|
| 1 | 0,3 | Обострение хронического бронхита | – | 7,7 | 23 |
| 2 | 1 | Тромбоз глубоких вен левой голени, тромбофлебит левой голени | – | 7,9 | 10 |
| 3 | 0,4 | Нет | – | 7,4 | 30 |
| 4 | <0,1 | Нет | – | 13,8 | 4 |
| 5 | <0,1 | Нет | – | 11,3 | 8 |
| 6 | 0,9 | Обострение хронического пиелонефрита | Цефтриаксон, цiproфлоксацин, нитроксолин | 11,3 | 10 |
| 7 | <0,1 | Нет | – | 8,8 | 12 |
| 8 | 0,8 | Обострение хронического пиелонефрита, тромбоз вен правой голени | Цiproфлоксацин, нитроксолин | 7 | 20 |
| 9 | <0,1 | Нет | – | 7,7 | 6 |
| 10 | <0,1 | Нет | – | 4,7 | 10 |
| 11 | 1,2 | Нет | – | 10 | 14 |
| 12 | 0,45 | Обострение хронического пиелонефрита, обострение хронического простатита | Индометацин, цiproфлоксацин | 8,1 | 22 |
| 13 | <0,1 | Нет | – | 6,5 | 30 |
| 14 | 0,25 | Нет | Цефтриаксон, тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат | 6,5 | 18 |
| 15 | <0,1 | Нет | – | 9,9 | 5 |
| 16 | <0,1 | Нет | – | 9,2 | 20 |
| 17 | 1,0 | Левосторонняя нижнедолевая пневмония | Дексаметазон, кларитромицин, цiproфлоксацин | 13,3 | 27 |
| 18 | <0,1 | Нет | – | 6,4 | 8 |
| 19 | 0,25 | Обострение хронического пиелонефрита | Цiproфлоксацин, тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат, нитроксолин | 14,8 | 20 |
| 20 | 0,7 | Правосторонняя нижнедолевая пневмония | Цефтриаксон | 4,1 | 19 |
| 21 | <0,1 | Нет | – | 4,7 | 25 |
| 22 | 0,6 | Двусторонняя нижнедолевая пневмония | Тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат, цефтриаксон | 11,3 | 12 |
| 23 | 0,7 | Двусторонняя полисегментарная пневмония | Офлоксацин, кларитромицин | 9,5 | 40 |
| 24 | 0,4 | Острый цистит, тромбоз суральных и малоберцовых вен левой голени | Цiproфлоксацин | 9,7 | 38 |
| 25 | <0,1 | Нет | – | 6,2 | 30 |
| 26 | <0,1 | Нет | – | 6,4 | 15 |
| 27 | <0,1 | Нет | – | 12,3 | 25 |
| 28 | <0,1 | Нет | – | 11,2 | 18 |
| 29 | <0,1 | Нет | – | 7,9 | 25 |

воспалительных симптомов не отмечалось и содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ было менее 0,1 мкМ. Показательно, что при общей нормализации как клинических показателей, так и содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в большинстве случаев регистрируются повышенные значения СОЭ, а в ряде случаев и повышенное количество лейкоцитов. В то же время не зафиксировано ни одного случая, когда при наличии симптомов воспаления показатель $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ оставался в пределах нормы, — как в данном исследовании, так и в других [14–16].

Таким образом, концентрация в плазме крови $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ более 100 нМ — высокочувствительный и высокоспецифичный показатель наличия воспалительного процесса, превосходящий используемые в настоящее время лабораторные показатели. Нитрит и RNNO появляются в крови до возникновения клинических признаков и исчезают позже нормализации клинической картины. На примере 29 больных с острым ИИ показано, что использование показателя суммарного содержания нитрита и N-нитрозосоединений в плазме крови в качестве теста на наличие генерализованного воспалительного процесса позволяет своевременно и однозначно опреде-

лять его начало до появления клинических признаков воспаления, а также осуществлять оперативный контроль за ходом лечения. Последнее особенно важно в связи с ограниченной коммуникабельностью неврологических больных.

Применение ферментного сенсора для диагностики хориоамнионита при преждевременном излитии околоплодных вод

Актуальной проблемой современного акушерства являются преждевременные роды, при которых перинатальная смертность и заболеваемость в 2–3 раза выше, чем при своевременных родах. Досрочные роды в 25–54 % случаев начинаются с преждевременного излития околоплодных вод (ПИОВ) [17, 18]. Хориоамнионит и внутриутробное инфицирование могут быть как следствием, так и причиной ПИОВ. В связи с этим важна своевременная диагностика воспаления и внутриутробного инфицирования. Такие показатели, как СОЭ и число лейкоцитов в периферической крови, не всегда являются достаточно информативными критериями [19]. Широко

Таблица 6. Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови, клинические и лабораторные показатели у пациентов с ИИ на 21-е сутки после поступления в стационар

| Номер наблюдения | Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$, мкМ | Наличие клинических симптомов воспаления | Проводимая антибактериальная и противовоспалительная терапия | Лейкоциты, тыс/мм ³ (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма: 2–15) |
|------------------|--|---|--|---|-------------------------|
| 1 | <0,1 | Нет | – | 7,7 | 23 |
| 2 | <0,1 | Нет | – | 7,6 | 13 |
| 3 | <0,1 | Нет | – | 7,5 | 27 |
| 4 | <0,1 | Нет | – | 6,5 | 5 |
| 5 | <0,1 | Нет | – | 13,9 | 32 |
| 6 | <0,1 | Нет | Цефтриаксон, цiproфлоксацин, нитроксолин | 7,5 | 20 |
| 7 | 0,2 | Обострение хронического цистита | – | 5,4 | 32 |
| 8 | <0,1 | Нет | Цiproфлоксацин, нитроксолин | 7,6 | 26 |
| 9 | <0,1 | Нет | – | 8,1 | 8 |
| 10 | <0,1 | Нет | – | 6,0 | 12 |
| 11 | <0,1 | Нет | – | 9,4 | 18 |
| 12 | <0,1 | Нет | Индометацин, цiproфлоксацин | 7,2 | 21 |
| 13 | <0,1 | Нет | – | 8,0 | 36 |
| 14 | <0,1 | Нет | – | 4,5 | 11 |
| 15 | <0,1 | Нет | – | – | – |
| 16 | <0,1 | Нет | – | – | – |
| 17 | 0,7 | Левосторонняя нижнедолевая пневмония, стадия разрешения | Дексаметазон, кларитромицин, цiproфлоксацин | 4,7 | 20 |
| 18 | <0,1 | Нет | – | 5,6 | 6 |
| 19 | <0,1 | Нет | Цiproфлоксацин, тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат, нитроксолин | 6,4 | 10 |
| 20 | <0,1 | Нет | Цефтриаксон | 6,4 | 30 |
| 21 | <0,1 | Нет | – | 4,0 | 31 |
| 22 | 0,8 | Двусторонняя нижнедолевая пневмония | Тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат, цефтриаксон | 13,8 | 64 |
| 23 | 1,25 | Полисегментарная двусторонняя пневмония, тромбоз глубоких вен правой голени, обострение хронического пиелонефрита | Офлоксацин, кларитромицин | 7,7 | 40 |
| 24 | <0,1 | Нет | Цiproфлоксацин | 21,1 | 45 |
| 25 | <0,1 | Нет | – | 7,1 | 25 |
| 26 | <0,1 | Нет | – | 7,1 | 18 |
| 27 | <0,1 | Нет | – | 8,7 | 32 |
| 28 | <0,1 | Нет | – | 9,8 | 13 |
| 29 | <0,1 | Нет | – | 7,6 | 20 |

используемый сегодня показатель содержания С-реактивного белка (СРБ) имеет большой разброс значений у здоровых людей [19]. Таким образом, существует большая потребность в разработке метода ранней диагностики воспаления, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью.

Согласно полученным данным, при нормально протекающей беременности без диагностированных воспалительных осложнений концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови находится в пределах нормы и составляет менее 0,1 мкМ. В то же время у всех пациенток с ПИОВ концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ была существенно выше и составляла от 0,4 до 2,5 мкМ (табл. 7). Повышенное содержание $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ однозначно свидетельствует о наличии неспецифического воспаления [14–16]. Увеличение концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ отмечено и у некоторых пациенток, у которых не было диагностировано ПИОВ, что может быть связано с воспалительными процессами, непосредственно не связанными с беременностью (табл. 7). Важно отметить, что у всех беременных с ПИОВ зарегистрировано значительное увеличение концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови — до 2,5 мкМ; ранее такие концентрации фиксировались нами только при остром аппенди-

ците или остром панкреатите [14]. При этом такие показатели, как количество лейкоцитов в крови и СРБ у обследованных пациенток были либо в норме, либо слегка ее превышали (табл. 8 и 9). Заметим, что у беременных показатель СОЭ в норме может быть умеренно повышен — до 20–30 мм/ч. Тот факт, что во всех 33 наблюдениях ПИОВ выявлено увеличение содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови, позволяет предполагать, что оно связано именно с внутриутробным инфицированием и воспалением. В табл. 9 представлены данные об изменении концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови под действием противовоспалительных и антибактериальных препаратов. Назначенная терапия способствовала снижению содержания $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ до 0,1 мкМ и менее.

Таблица 7. Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови беременных

| Группа обследуемых | $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$, мкМ |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Здоровые беременные (n = 6) | <0,1 |
| ПИОВ (n = 33) | 0,4–2,5 |
| Угроза преждевременных родов (n = 4) | <0,1–0,8 |

Таблица 8. Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови и лабораторные показатели у беременных с ПИОВ

| Номер наблюдения | Возраст, лет | Срок беременности, нед | $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$, мкМ | Лейкоциты, тыс/мм ³ (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма — 2–15, при беременности до 30) | СРБ, мг/л (норма: 0,068–8,2) |
|------------------|--------------|------------------------|-------------------------------------|---|--|------------------------------|
| 1 | 39 | 30–31 | 0,6 | 5,8 | 27 | – |
| 2 | 39 | 35–36 | 1,6 | 10,7 | – | – |
| 3 | 29 | 27–28 | 0,45 | 7,3 | 25 | 1,2 |
| 4 | 36 | 36 | 1,2 | 8,3 | – | – |
| 5 | 28 | 29 | 2,5 | 9,7 | – | 3,1 |
| 6 | 33 | 28–29 | 1,25 | 13 | 24 | 1,8 |
| 7 | 26 | 30–31 | 0,8 | 11 | – | 1,0 |

Таблица 9. Изменение концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ в плазме крови и лабораторных показателей у беременных с ПИОВ на фоне антибактериальной и противовоспалительной терапии

| Номер наблюдения, срок исследования | Срок беременности, нед | Антибактериальная и противовоспалительная терапия | $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$, мкМ | Лейкоциты, тыс/мм ³ (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма: 2–15, при беременности до 30) | СРБ, мг/л (норма: 0,068–8,2) |
|-------------------------------------|------------------------|---|-------------------------------------|---|---|------------------------------|
| 1: исходные показатели | 29–30 | Фортум (1,0 г, 3 раза в день, в/м), клафобрин (1,0 г, 3 раза в день, в/м) | 2,5 | 9,7 | 28 | 3,1 |
| 1: через 4 дня лечения | | | 0,8 | 8,4 | 26 | 1,2 |
| 2: исходные показатели | 28–29 | Цефазолин (1,0 г, 3 раза в день, в/м) | 1,25 | 13,2 | 25 | 1,8 |
| 2: через 4 дня лечения | | | <0,1 | 9,6 | 24 | 2,0 |
| 3: исходные показатели | 30–31 | Амоксиклав (1,2 г, 3 раза в день, в/м) | 0,8 | 11,7 | 23 | 1,0 |
| 3: через 4 дня лечения | | | <0,1 | 15,6 | 27 | 3,2 |

Возможности использования показателя концентрации метаболитов оксида азота в плазме крови в клинической диагностике

Вследствие высокой чувствительности метода (возможность определения концентрации $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ до 50 нМ) для проведения анализа достаточно 1,0 мл крови. Производительность зависит исключительно от используемого метода определения активности каталазы. Оптимальным представляется калориметрический метод, основанный на регистрации кинетики теплопродукции, сопровождающей разложение перекиси водорода каталазой [5, 20, 21].

В этом случае ни мутность, ни окраска образца не являются помехой в определении, а потому нет необходимости в предварительной подготовке образца, отсутствует также потребность в использовании дорогостоящих реактивов. Необходимы следующие реактивы: физиологический рас-

твор (0,15 М NaCl, 20 мМ фосфатный буфер, pH 6,0); раствор нитрита для калибровки; гемолизированные эритроциты (полученные от того же больного, чья плазма исследуется [14]), являющиеся источником и каталазы, и оксигемоглобина — ловушки NO; перекись водорода (3 % раствор); ЭДТА (для разрушения ДНКЖ), раствор железа (II) — для перевода RSNO в ДНКЖ [9, 12, 21]. На исследование одного образца уходит от 1 до 3 мин, вследствие чего один оператор за 1 ч может измерять до 15 образцов. Указанные параметры анализа позволяют осуществлять непрерывный контроль больных, находящихся в стационаре. Особенно ценным такой мониторинг может быть в неврологических, психиатрических, реанимационных стационарах — в случаях больных с ограниченной коммуникабельностью, когда применение рассматриваемого метода представляется единственным эффективным способом вовремя диагностировать больничную пневмонию и прочие воспалительные заболевания.

Литература

- Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994; 341 (1): 65–8.
- McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RM, Whittle BJ, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J.* 1989; 261 (1): 293–6.
- Gudkov LL, Shumaev KB, Kalenikova EI, Gubkina SA, Vanin AF, Ruuge EK. Antioxidant and prooxidant action of nitric oxide donors and metabolites. *Biofizika.* 2007; 52 (3): 503–9.
- Shumaev KB, Gubkin AA, Gubkina SA. Interaction between albumin-bound dinitrosyl iron complexes and reactive oxygen species. *Biofizika.* 2007; 52 (3): 534–8.
- Титов В. Ю., Осипов А. Н., Крейнина М. В., Ванин А. Ф. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при воспалении. *Биофизика.* 2013; 58 (5): 857–70.
- Титов В. Ю., Болдырихин В. С., Иванова А. В., Осипов А. Н. Возможный механизм образования нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме крови при воспалительных процессах. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2014; 155 (4): 479–82.
- Titov VY, Petrenko YM. Nitrite-catalase interaction as an important element of nitrite toxicity. *Biochemistry (Mosc).* 2003; 68 (6): 627–33.
- Titov VY. Interaction of nitrite with hydrogen peroxide-destroying enzymes as an important element of nitrite toxicity. *Curr Enzym Inhib.* 2006; 2 (1): 1–17.
- Titov VY, Petrenko YM, Vanin AF. Mechanism of inhibition of catalase by nitro and nitroso compounds. *Biochemistry (Mosc).* 2008; 73 (1): 92–6.
- Титов В. Ю., Петренко Ю. М., Ванин А. Ф. Ферментативный сенсор для определения содержания нитро- и нитрозосоединений в биологических объектах. *Клин. лаб. диагностика.* 2009; 9: 6–14.
- Titov V. The enzymatic technologies open new possibilities for studying nitric oxide (NO) metabolism in living systems. *Curr Enzym Inhib.* 2011; 7: 56–70.

12. Titov VY. Mechanisms of interaction of nitric oxide (NO) and its metabolites with enzymes responsible for the physiological effects of NO. *Curr Enzym Inhib.* 2008; 4 (2): 73–81.
13. Титов В. Ю., Иванова А. В., Петров В. А., Сerezhenkov В. А., Микоян В. Д., Ванин А. Ф. и др. Может ли суммарное содержание нитрита и нитрата служить показателем интенсивности синтеза оксида азота (NO) в тканях организма? *Бюл. exper. биол. и мед.* 2012; 153 (6): 816–9.
14. Титов В. Ю., Иванова А. В., Агапов М. А., Петров В. А. Содержание нитрита и N-нитрозосоединений плазмы как важный диагностический показатель. *Клин. лаб. диагностика.* 2011; 11: 13–9.
15. Титов В. Ю., Иванова А. В., Петров В. А., Балякин Ю. В., Осипов А. Н., Камчатнов П. Р. и др. Ранняя диагностика воспалительных заболеваний у больных с острым ишемическим инсультом. *Журн. неврол. и психиатр.* 2012; 7: 4–9.
16. Титов В. Ю., Осипов А. Н., Балицкий С. П., Шалина Р. И. Ранняя диагностика хориоамнионита и внутриутробного инфицирования при преждевременном излитии околоплодных вод по содержанию нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме. *Клин. лаб. диагностика.* 2013; 12: 7–10.
17. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371 (9606): 75–84.
18. Mathew TJ, MacDorman MF. Infant mortality statistics from the 2003 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep.* 2006; 54 (16): 1–29.
19. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000; 342 (20): 1500–7.
20. Титов В. Ю., Осипов А. Н., Горский В. А., Агапов М. А., Иванова А. В., Балякин Ю. В., Камчатнов П. Р., Жданова С. Г., авторы; ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», патентообладатель. Способ диагностики острого неспецифического воспалительного процесса. Патент РФ № 2461831. 20.09.2012.
21. Титов В. Ю., Петренко Ю. М., Петров В. А. Калориметрическое исследование окисления аскорбиновой кислоты пероксидазой хрена. *Биофизика.* 1992; 37 (1): 17–22.

References

1. Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994; 341 (1): 65–8.
2. McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RM, Whittle BJ, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J.* 1989; 261 (1): 293–6.
3. Gudkov LL, Shumaev KB, Kalenikova EI, Gubkina SA, Vanin AF, Ruuge EK. Antioxidant and prooxidant action of nitric oxide donors and metabolites. *Биофизика.* 2007; 52 (3): 503–9.
4. Shumaev KB, Gubkin AA, Gubkina SA. Interaction between albumin-bound dinitrosyl iron complexes and reactive oxygen species. *Биофизика.* 2007; 52 (3): 534–8.
5. Titov VY, Osipov AN, Kreynina MV, Vanin AF. Osobennosti metabolizma oksida azota v norme i pri vospalenii. *Биофизика.* 2013; 58 (5): 857–70. Russian.
6. Titov VY, Boldyrikhin VS, Ivanova AV, Osipov AN. Vozmozhnyj mekhanizm obrazovaniya nitrita i netiolatnykh nitrozosoedineniy v plazme krovi pri vospalitel'nykh protsessakh. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2014; 155 (4): 479–82. Russian.
7. Titov VY, Petrenko YM. Nitrite-catalase interaction as an important element of nitrite toxicity. *Biochemistry (Mosc).* 2003; 68 (6): 627–33.
8. Titov VY. Interaction of nitrite with hydrogen peroxide-destroying enzymes as an important element of nitrite toxicity. *Curr Enzym Inhib.* 2006; 2 (1): 1–17.
9. Titov VY, Petrenko YM, Vanin AF. Mechanism of inhibition of catalase by nitro and nitroso compounds. *Biochemistry (Mosc).* 2008; 73 (1): 92–6.
10. Titov VY, Petrenko YM, Vanin AF. Fermentativnyj sensor dlya opredeleniya sodержaniya nitro- i nitrozosoedinenij v bioob'ektakh. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2009; 9: 6–14. Russian.
11. Titov V. The enzymatic technologies open new possibilities for studying nitric oxide (NO) metabolism in living systems. *Curr Enzym Inhib.* 2011; 7: 56–70.
12. Titov VY. Mechanisms of interaction of nitric oxide (NO) and its metabolites with enzymes responsible for the physiological effects of NO. *Curr Enzym Inhib.* 2008; 4 (2): 73–81.
13. Titov VY, Ivanova AV, Petrov VA, Serezhenkov VA, Mikoyan VD, Vanin AF. et al. Mozhet li summarnoe sodержanie nitrita i nitrata sluzhit' pokazatelem intensivnosti sinteza oksida azota (NO) v tkanyakh organizma? *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2012; 153 (6): 816–9. Russian.
14. Titov VY, Ivanova AV, Agapov MA, Petrov VA. Soderzhanie nitrita i N-nitrozosoedinenij plazmy kak vazhnyj diagnosticheskij pokazatel'. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2011; 11: 13–9. Russian.
15. Titov VY, Ivanova AV, Petrov VA, Balyakin YV, Osipov AN, Kamchatnov PR et al. Rannaya diagnostika vospalitel'nykh zabolevanij u bol'nykh s ostrym ishemicheskim insul'tom. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S. S. Korsakova.* 2012; 7: 4–9. (In Russian).
16. Titov VY, Osipov AN, Balitskij SP, Shalina RI. Rannaya diagnostika khorioamniionita i vnutriutrobnogo infitsirovaniya pri prezhdevremennom izlitiu okolooplodnykh vod po sodержaniyu nitrita i netiolatnykh nitrozosoedinenij v plazme. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2013; 12: 7–10. Russian.
17. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371 (9606): 75–84.
18. Mathew TJ, MacDorman MF. Infant mortality statistics from the 2003 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep.* 2006; 54 (16): 1–29.
19. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000; 342 (20): 1500–7.
20. Titov VY, Osipov AN, Gorskij VA., Agapov MA., Ivanova AV., Balyakin YV, Kamchatnov PR, Zhdanova SG, inventors; Russian State Medical University of Federal Agency for Health and Social Development, assignee. Sposob diagnostiki ostrogo nespetsificheskogo vospalitel'nogo protsessa. Russian Federation patent RF 2461831. 2012 Sep 20.
21. Titov VY, Petrenko YM, Petrov VA. Kalorimetriceskoe issledovanie okisleniya askorbinovoj kisloty peroksidazoj khrena. *Биофизика.* 1992; 37 (1): 17–22. Russian.

ПОЛУЧЕНИЕ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА КОНЬЮГАТОВ ДОКСОРУБИЦИНА С БИОСОВМЕСТИМЫМИ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА

К. М. Старостин¹✉, А. Ю. Оленин², Т. А. Федотчева¹, К. Е. Широких¹, Г. В. Лисичкин², Н. Л. Шимановский¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Супермагнитные наночастицы магнетита могут быть эффективными магнитно-резонансными контрастными веществами и платформой для направленного транспорта цитостатиков к опухоли. В статье представлено описание нового модифицированного метода синтеза золь суперпарамагнитных наночастиц магнетита (Fe_3O_4) размером менее 10 нм, послойно поверхностно стабилизированных олеиновой кислотой и неионогенным поверхностно-активным веществом полисорбатом 80. Релаксивность полученной субстанции составила $r_1 = 9,8$, $r_2 = 94 \text{ mM}^{-1} \times \text{с}^{-1}$. Проведена эффективная конъюгация наночастиц Fe_3O_4 и доксорубина (эффективность конъюгации — 90 %). Оцененное высвобождение доксорубина не превышало 5 %, тогда как воздействие ультразвукового излучения увеличивало высвобождение доксорубина до 21 %. Конъюгация доксорубина обеспечивала повышение цитотоксичности лекарственного вещества *in vitro*. Полученные наночастицы магнетита обладают диагностическим потенциалом в качестве контрастного вещества для магнитно-резонансной томографии и могут служить основой для систем адресной доставки и контролируемого высвобождения химиотерапевтических средств, в частности доксорубина.

Ключевые слова: супермагнитные наночастицы оксида железа, СНОЖ, наночастицы магнетита, доксорубин, антипролиферативные свойства конъюгатов, ультразвуковое триггер-зависимое высвобождение лекарственного вещества, наноконтейнеры, терапевтическая субстанция

✉ Для корреспонденции: Кирилл Максимович Старостин
117997, Москва, ул. Островитянова, 1; kirill_ms@yahoo.com

Статья поступила: 16.09.2015 Статья принята в печать: 09.11.2015

BIOCOMPATIBLE DOXORUBICIN-LOADED SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES: SYNTHESIS AND ANTINEOPLASTIC ACTIVITY

Starostin KM¹✉, Olenin AY², Fedotcheva TA¹, Shirokikh KE¹, Lisichkin GV², Shimanovsky NL¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Lomonosov Moscow State University, Moscow

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) can be an effective magnetic resonance contrast agent and a platform for targeted delivery of antineoplastic agent into tumor tissue. This research is dedicated to a new synthesis modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) $d < 10 \text{ nm}$ layer-by-layer stabilized with oleic acid and nonionic surfactant, Tween-80. Relaxivity of the substance was $r_1 = 9,8$, $r_2 = 94 \text{ mM}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$. An effective conjugation with doxorubicin was performed (estimated conjugation efficacy: 90 %). Evaluated doxorubicin release from conjugate was not higher than 5 %, whereas ultrasound radiation enhanced drug release up to 21 %. Doxorubicin conjugated with nanoparticles shown higher antineoplastic activity than free doxorubicin molecules while investigating cytotoxicity *in vitro*. Obtained magnetite nanoparticles bear a diagnostic potential as a magnetic resonance contrast agent and also, it can serve as a platform for designing targeted drug delivery systems as well as providing antineoplastic agents controlled release, in particular, doxorubicin.

Keywords: superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION, magnetite nanoparticles, doxorubicin, antineoplastic properties of nanocomplexes, ultrasound-triggered drug release, nanocarriers, theranostic approach

✉ Correspondence should be addressed: Kirill Starostin
1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997; kirill_ms@yahoo.com

Received: 16.09.2015 Accepted: 09.11.2015

Важнейшими задачами современной онкологии являются разработка высокоточных методов диагностики опухолевых заболеваний и визуализации патологических очагов до, во время и после проведения курса терапии (для оценки ее эффективности), а также повышение эффективности и избирательности химиотерапии опухолей. Для решения этих задач в последнее время все шире используются нанотехнологии. Достаточно хорошие перспективы в данной области имеют наночастицы оксидов железа [1, 2]. Эти частицы, как прави-

ло, представляют собой структуру «ядро–оболочка», где ядро состоит непосредственно из оксида железа, а оболочка — из функционального слоя, включающего стабилизатор поверхности и вещество-вектор адресной доставки, лекарственное средство. Биосовместимые химически модифицированные наночастицы магнетита, обладающие суперпарамагнитными свойствами, являются эффективными магнитно-резонансными контрастными веществами [3], однако, несмотря на интенсивные исследования в данной области [4–6], до сих пор

ни одна субстанция не достигла стадии регистрации и клинического применения, что связано с трудностью их воспроизводимого синтеза, сложностью обратимой конъюгации с цитостатиками, получения стабильных и однородных лекарственных форм, готовых для клинического применения. В данной статье показан потенциал нового модифицированного метода синтеза наночастиц, конъюгированных с доксорубицином через гидрофобные взаимодействия, исследованы физико-химические свойства полученных наноконструктов. Для стабилизации наночастиц магнетита использовали олеиновую кислоту и поверхностно-активное вещество (ПАВ) на основе этиленгликоля (Tween-80, полисорбат 80).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение золь наночастиц магнетита

Синтез наночастиц проводили с использованием модифицированной методики, описанной К. Т. Jain и соавт. [7]. Навески 0,488 г хлорида железа (III) (хлорид железа (III) 6-водный 98 % (Ч), «Химмед Синтез», Россия) и 0,417 г сульфата железа (II) (железо (II) сернокислое 7-водное (ХЧ), «Химмед Синтез», Россия) растворяли в 30 и 15 мл дистиллированной воды соответственно (рН $\leq 0,1$, температура 20 °С). Полученные растворы смешивали, нагревали до 60 °С, а затем в поле ультразвуковой ванны (35 кГц, ПСБ-2835-05, Россия) в течение 10 мин вводили 0,315 мл олеиновой кислоты (олеиновая кислота (Ч), «Химмед Синтез»), после чего дополнительно озвучивали в течение 10 мин. Затем в полученную реакционную массу при непрерывной ультразвуковой обработке в течение 5 мин вводили 4,5 мл раствора, содержавшего 1,5 мл аммиачной воды (аммиак водный 25 % (ОСЧ), «Химмед Синтез»).

После введения аммиака система приобретала характерный черный цвет магнетита. Полученную таким образом реакционную массу дополнительно озвучивали при той же температуре в течение 30 мин. После формирования золь наночастиц, стабилизированных олеиновой кислотой, в него вводили 3 мл водного раствора, содержавшего 0,225 мл неионогенного ПАВ Tween-80 (полисорбат 80, Sharlau, Испания), и дополнительно выдерживали в ультразвуковом поле при той же температуре 30 мин. По окончании синтеза полученный золь поверхностно модифицированных наночастиц магнетита охлаждали до комнатной температуры, подвергали центрифугированию при 10 000 об./мин в течение 15 мин (при 20 °С), а надосадочную жидкость (50 мл) помещали в диализный мешок диаметром 46 мм с размерами пор 3,5 кДа (Membrane Filtration Products, Inc., США) и выдерживали во внешней дистиллированной воде (100 мл) при периодической ее замене (2 раза в сутки) в течение 10 сут (при 20 °С). Полученный таким образом золь дополнительно подвергали центрифугированию при 10 000 об./мин в течение 15 мин (при 20 °С). В дальнейших исследованиях в течение 2 мес (рассмотрено подробнее далее) использовали надосадочную жидкость золь наночастиц магнетита.

Определение концентрации железа и рН в полученном золе

Концентрацию железа в полученном золе определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием прибора «Х-арт М» (Россия) [8]. На основе предварительно приготовленных растворов сульфата железа (II) с концентрациями железа 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 7,5 и 10 мг/мл была построена калибровочная кривая для оценки концентрации железа в ис-

следуемом золе. Измерение рН проводили при температуре 20 °С с помощью рН-метра Hanna Checker 1 (Германия).

Измерение размеров, гидродинамического радиуса и дзета-потенциала наночастиц

Микрофотографии образцов золь получали на просвечивающем электронном микроскопе LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия) с рабочим ускоряющим напряжением 100 кВ. Образцы готовили путем нанесения 1–2 мкл золь на покрытую формваром медную сетку ($d = 3,05$ мм), которую затем высушивали на воздухе. Анализ электронных микрофотографий проводили с помощью программы NIH Image J. Гистограммы распределения частиц по размерам были построены на основе анализа пяти микрофотографий, каждая из которых содержала не менее 100 индивидуальных наночастиц.

Дзета-потенциалы, кривые распределения частиц по размерам регистрировали с помощью анализатора Malvern ZETASIZER nano-ZS (Великобритания) по стандартным методикам с использованием программного обеспечения прибора.

Конъюгация наночастиц магнетита с доксорубицином

Непосредственно перед конъюгацией проводили гидрофобизацию фармацевтического препарата доксорубицина гидрохлорида (порошок лиофилизированный для инъекций 50 мг «Доксорубин-Тева», Голландия) при незначительном изменении метода, описанного S. Yolles и соавт. [9]. Для этого 20,1 мг доксорубицина гидрохлорида растворяли в смеси, содержавшей 0,2 мл метанола (метанол 99 %, Sigma-Aldrich, США) и 1,4 мл хлороформа (хлороформ (ХЧ), «Химмед Синтез»), после чего в полученный раствор вносили 5 мкл этилдиизопропиламина (этилдиизопропиламин 98 %, Fluka, Голландия). После выпадения осадка полученный раствор отфильтровывали, осадок дважды промывали 1 мл хлороформа, а полученные прозрачные органические растворы объединяли. Объединенный раствор упаривали на роторном испарителе досуха, после чего к полученному сухому остатку добавляли 5,5 мл золь наночастиц магнетита. Конъюгацию проводили при непрерывном перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 16 ч при температуре 20 °С.

Оценка эффективности конъюгации наночастиц магнетита с доксорубицином

Эффективность конъюгации доксорубицина с наночастицами магнетита оценивали по интенсивности флуоресценции свободного доксорубицина в растворе с использованием спектрофлуориметра «Флюорат-02 Панорама» (Россия). Концентрацию доксорубицина измеряли по сигналу флуоресценции при 587 нм, возбуждаемому излучением с длиной волны 360 нм, с использованием предварительно построенных калибровочных кривых растворов доксорубицина в диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-4} М. Для получения растворов, содержавших свободный доксорубин, аликвоту 0,2 мл конъюгированного золь наночастиц магнетита подвергали ультрацентрифугированию с использованием ультрацентрифуги Beckman Coulter Airfuge (США) со скоростью 95 000 об./мин в течение 30 мин. Для того чтобы убедиться в отсутствии наночастиц в супернатанте, применяли ядерно-магнитно-резонансную релаксометрию (ЯМР-релаксометрию). Было продемонстрировано, что значения времени релаксации T_1 и T_2 супернатанта (3,0 и 2,6 с) соответствовали таковым в дистиллированной воде. Полученную надосадочную жидкость раз-

бавляли в 30 раз дистиллированной водой, после чего для нее определяли интенсивность сигнала флуоресценции при 587 нм. Концентрацию доксорубицина в исследуемой субстанции определяли как (модифицированный метод S. Nigam и соавт. [10]). Анализ доли конъюгированного доксорубицина проводили на основе зависимости: $Dox_{кон} = Dox_{св} / Dox_{общ}$, где $Dox_{кон}$ — доля конъюгированного доксорубицина, $Dox_{св}$ — доля свободного доксорубицина, а $Dox_{общ}$ — общее количество доксорубицина, введенное в систему.

Исследование антипролиферативной активности конъюгированных наночастиц магнетита

Антипролиферативную активность конъюгата наночастиц и доксорубицина по сравнению с несвязанным доксорубицином оценивали на культуре клеток HeLa (рак шейки матки человека). Клетки культуры HeLa, полученные из банка клеток Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения (Москва), инкубировали в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в среде DMEM (GIBCO, США) с 20 % термоинaktivированной эмбриональной телячьей сывороткой (SIGMA, США) с 2 мМ L-глутамин («Панэко», Россия). Жизнеспособность и метаболическую активность опухолевых клеток оценивали методом теллурических токов (МТТ) [11], основанным на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразола (МТТ-реагента) до голубого кристаллического фармазана, который растворим в диметилсульфоксиде. Инкубацию клеточных культур с исследуемой субстанцией (наночастицы оксида железа, свободный доксорубин, доксорубин в составе конъюгата с наночастицами оксида железа) проводили в течение 48 ч в питательной среде в 96-луночном планшете. После этого в систему добавляли МТТ-реагент, с которым проводили инкубацию в течение 1,5 ч. Затем жидкую среду удаляли и вводили в лунки диметилсульфоксид. Анализ интенсивности окраски проводили спектрофотометрически планшетным сканером Униплан-2000 со светофильтром с длиной волны $\lambda = 530$ нм (PICON, Россия).

Изучение релаксационных свойств полученной субстанции

Измерение значений времени релаксации T_1 и T_2 проводили с помощью ЯМР-релаксометра Minispec mq20 с напряженностью магнитного поля 0,47 Тл (Bruker Optik GmbH, Германия) в дистиллированной воде. Релаксивность r_1 и r_2 (парамагнитную эффективность) определяли согласно соотношению:

$$1/T_{1,2} = 1/T_{1,2d} + r_{1,2} \times [Fe],$$

где $1/T_{1,2}$ — обратное значение времени продольной (1) и поперечной (2) релаксации протонов в измеряемой субстанции, $1/T_{1,2d}$ — обратное значение времени продольной (1) и поперечной (2) релаксации протонов в дистиллированной воде, $r_{1,2}$ — продольная (1) и поперечная (2) релаксивность измеряемой субстанции ($мМ^{-1} \times с^{-1}$), $[Fe]$ — молярная концентрация железа ($мМ$).

Исследование кинетики высвобождения доксорубицина из конъюгата

Оценку кинетики высвобождения доксорубицина из конъюгата проводили с помощью двухкамерной системы, разделенной диализной мембраной, с размером пор, соответствующим

3,5 кДа. Во внутреннюю камеру объемом 3 мл помещали исследуемый образец, а во внешнюю объемом 100 мл — натрий-фосфатный буфер (Amresco, США) при pH = 7,4 и температуре 20 °C. Для изучения влияния триггерного стимула (ультразвукового излучения) исследуемую систему подвергали ультразвуковому воздействию продолжительностью 15 мин с интервалом 2 ч 5 раз в день в течение первых 5 сут с помощью ультразвукового гомогенизатора (Cole Parmer (Sonics Material, США) 130 Вт, частота импульса 20 кГц). Титановый зонд размещали во внешней камере таким образом, чтобы обеспечить максимальную интенсивность акустической волны не более 3 Вт/см² (интенсивность подаваемой акустической волны рассчитывали, исходя из регулируемой мощности установки и площади рабочей поверхности). Через 1, 2, 6 и 10 сут из внешней камеры отбирали 3 мл образца, определяли в нем концентрацию свободного доксорубицина по методике, описанной ранее, после чего образец возвращали во внешнюю камеру. На основе полученных таким способом данных строили кривую концентрации доксорубицина во внешней камере.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета SPSS STATISTICA. Для значений размеров наночастиц, определенных методом электронной микроскопии, а также доли высвобожденного доксорубицина определены средние и средние квадратичные отклонения, для значений дзета-потенциала, pH определены средние квадратичные отклонения. Размерная характеристика частиц, определенная методом динамического светорассеяния, охарактеризована средним взвешенным. Для вычисления значений релаксивности применен регрессионный анализ, а именно метод наименьших квадратов с вычислением коэффициента аргумента линейной функции типа $y = kx + b$. Для коэффициента аргумента определен доверительный интервал при уровне значимости 0,95. Сравнение выборочных коэффициентов аргумента для двух субстанций проводили по оценке пересечения доверительных интервалов. Достоверность отличия образцов в МТТ-анализе от контрольных образцов и друг от друга оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (исходя из предположения о нормальном распределении изучаемой переменной). Сначала оценивали достоверность отличия оптической плотности в экспериментальных лунках от контрольных лунок, затем рассчитывали долю выживших клеток в каждой ячейке планшета путем деления значений оптической плотности на среднее арифметическое значение оптической плотности контрольных образцов. Все полученные количественные результаты представлены в виде: $X = M \pm m$, где X — изучаемый показатель, M — его среднее значение в исследуемой статистической выборке, m — стандартное отклонение. Тем же способом рассчитывали 95 % доверительный интервал для МТТ-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обработка стабилизированного олеиновой кислотой золя наночастиц магнетита неионогенным ПАВ (Tween-80, полисорбат 80) приводила к существенному понижению дзета-потенциала поверхности наночастиц. Если в зольях, стабилизированных олеиновой кислотой, он составляет 32–38 мВ, то для этих же частиц, обработанных раствором Tween-80, снижается до –3–8 мВ. В целях изучения старения системы проанализированы данные для зольей, полученных 2 сутками (далее — новый золь) и 2 месяцами ранее (далее — старый золь): $-8,42 \pm 1,2$ мВ и $-3,26 \pm 0,45$ мВ соответственно.

Определение размеров синтезированных наночастиц оксида железа с доксорубицином с использованием просвечивающей электронной микроскопии показало, что в образце содержатся ассоциаты размером 25–30 нм, сформированные индивидуальными частицами размером менее 10 нм (рис. 1). Размерные характеристики наночастиц магнетита остаются практически неизменными в течение 2 мес (при температуре 20 °С в месте, недоступном для воздействия прямого солнечного света), в то время как размер ассоциатов за этот период увеличивается до 40–50 нм. Данные динамического лазерного светорассеяния дают аналогичный тренд (рис. 2). Методом рентгенофлуоресцентного анализа на основе калибровочных зависимостей, полученных с известной концентрацией искомого элемента, проведена оценка содержания железа в синтезированных золях. Она составила $0,54 \pm 0,03$ мг/мл. Эти данные необходимы не только для общего аттестационного профиля продукта синтеза, но и для оценки релаксационных свойств субстанции.

Полученные концентрационные кривые значений времен спин-решетчатой (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации (рис. 3) показали, что значения релаксивности золя биосовместимых наночастиц магнетита составили $r_1 = 10,57 \pm 2,0$, $r_2 = 93,83 \pm 2,6$ $\text{мМ}^{-1} \times \text{с}^{-1}$, $r_1/r_2 = 0,11$. Эти же параметры для конъюгата наночастиц с доксорубицином составили $r_1 = 9,4 \pm 0,1$, $r_2 = 119,9 \pm 1,2$ $\text{мМ}^{-1} \times \text{с}^{-1}$, а $r_1/r_2 = 0,08$. pH полученного золя составил $6,5 \pm 0,2$. Не отмечено значимых изменений параметров релаксации синтезированных наночастиц через 2 мес.

Выявлено статистически значимое (доверительные интервалы коэффициентов аргумента не пересекаются при уровне значимости 0,95) усиление эффективности ускорения процессов T_2 -релаксации после конъюгации наночастиц с доксорубицином, что может объясняться изменением размеров агрегатов наночастиц в результате функционализации по-

верхности наночастиц.

Метод флуоресцентного анализа использован для количественного определения доксорубицина в растворе. Исходная концентрация доксорубицина в водной среде, содержащей наночастицы магнетита, равна $9,4 \times 10^{-4}$ мМ. Аналогичный параметр в супернатанте, полученном после ультрацентрифугирования наночастиц магнетита, — $9,5 \times 10^{-5}$ мМ. Это дает основание заключить, что доля конъюгированного доксорубицина находится на уровне 90 %.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение дзета-потенциала поверхности наночастиц может свидетельствовать об эффективном повышении инертности (биосовместимости) наночастиц магнетита поверхностно-активным веществом.

Проведенный анализ стабильности золя имеет особое значение. Любой коллоидный раствор по определению должен рассматриваться как относительно нестабильная система, стремящаяся достичь более стабильного состояния с точки зрения присущей ей термодинамической энергии. В этой связи при рассмотрении золей как субстанции для дальнейшего биомедицинского применения следует уделить особое внимание их стабильности. Мониторинг публикаций показал, что, к сожалению, научные группы редко приводят детальные данные об анализе стабильности наночастиц оксида железа, синтезированных *de novo* в биомедицинских целях. Поскольку было обнаружено изменение свойств золя со временем с точки зрения размера наночастиц, необходимы дальнейшие исследования для оценки стабильности коллоидной системы как одной из важнейших характеристик субстанций, которые планируется использовать в перспективе для введения в человеческий организм.

Наночастицы оксида железа обладают более выраженным воздействием на спин-спиновое время релаксации, что определяет их как преимущественно T_2 -контрастные вещества. Механизм влияния на поперечную релаксацию определяется способностью наночастиц оксида железа создавать локальную магнитную неоднородность вблизи протонов воды, упрощая тем самым расфазировку магнитных спинов протонов. Отношение релаксивности r_1/r_2 у полученной субстанции (0,1) меньше, чем у Resovist и VSOP-C184 (r_1/r_2 0,14 и 0,42 соответственно) [12], что может рассматриваться как преимущество магнитных свойств синтезированного золя при его использовании для получения искусственно контрастированных T_2 -взвешенных изображений. Объяснить такое различие можно тем, что для получения Resovist и VSOP-C184 авторы использовали соответственно декстран и цитрат, которые отличаются более высокой гидрофильностью, чем система олеиновой кислоты и полисорбата 80, и, возможно, обеспечивают более высокую вероятность контакта молекул воды с поверхностью наночастиц оксида железа. Это облегчает спин-решетчатые энергетические процессы, что в свою очередь определяет более высокое значение T_1 , отражающееся на отношении r_1/r_2 .

Вместе с тем важно отметить, что размер кристаллического ядра наночастицы может вносить вклад в различия значений T_2 , в то время как немагнитная оболочка не влияет на процесс релаксации T_2 [13]. Это также может оказывать воздействие на изменение отношения r_1/r_2 .

В процессе синтеза наночастиц формируется структура «ядро-оболочка». Гидрофобные углеводородные радикалы олеиновой кислоты составляют внутренний, а гидрофильные полиоксиэтиленовые группы — внешний слой оболочки наночастиц магнетита (ядра). Предполагается, что гидрофобизированный (свободный от хлорид-иона) доксорубицин

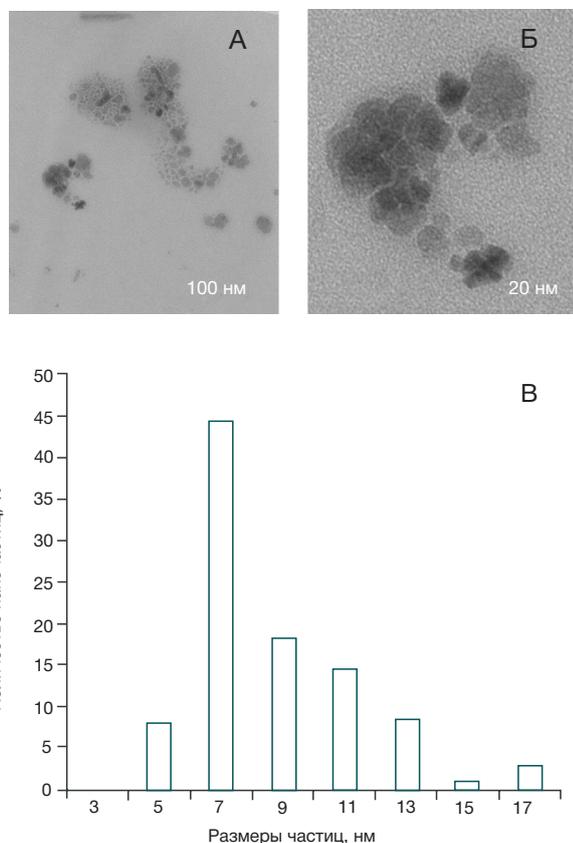


Рис. 1. Электронные микрофотографии наночастиц магнетита (А) и их ассоциатов (Б), гистограмма распределения наночастиц магнетита по размерам (В). Аттестация проведена через 2 сут после синтеза.

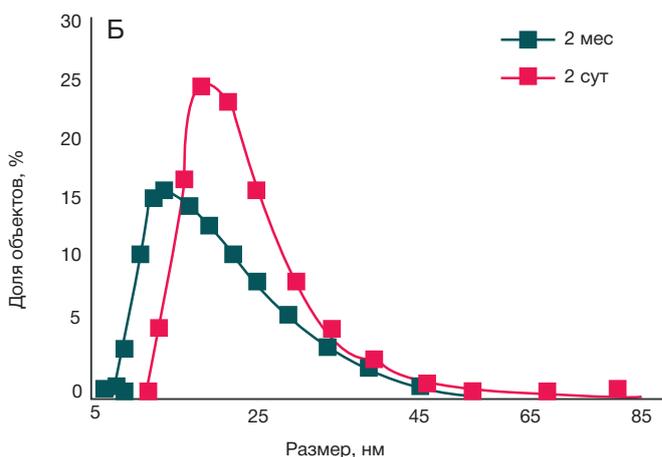
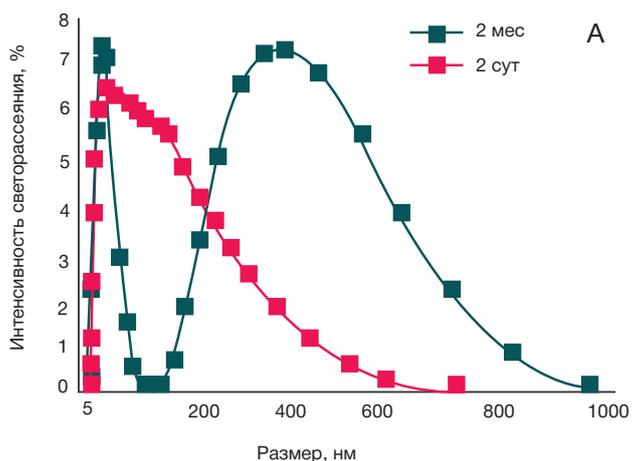


Рис. 2. Данные динамического лазерного светорассеяния золя магнетита через 2 сут и 2 мес после синтеза. (А) Результаты, полученные по интенсивности светорассеяния, (Б) результаты, полученные по числу объектов.

абсорбируется во внутреннем слое благодаря гидрофобным взаимодействиям углеводородных цепей олеиновой кислоты и тетраценовой ароматической структуры молекул доксорубина (рис. 4).

Немаловажным свойством синтезированных зелей наночастиц является их биосовместимость. Одно из необходимых условий ее достижения — удаление из реакционной массы неорганических катионов (NH_4^+) и анионов (Cl^- , SO_4^{2-}). В литературе описаны три основных подхода к очистке: магнитная декантация [7], осаждение избытком этанола с последующим центрифугированием [14], а также гель-фильтрационная хроматография [15]. Первый метод требует многократного повторения, что ведет к существенным потерям, второй вызывает разрушение коллоидной системы, а третий приводит к необратимому изменению химического состава поверхностного слоя. В этой связи для очистки золя от низкомолекулярных

с доксорубином обладают более выраженным цитостатическим эффектом ($p < 0,05$), чем доксорубин и наночастицы магнетита по отдельности. В таблице приведены значения полумаксимальных ингибирующих концентраций для свободных наночастиц Fe_3O_4 , наночастиц, конъюгированных с Dox, и их неконъюгированной смеси в сравнении со свободным доксорубином. Важно, что цитотоксичность увеличивалась в ряду Fe_3O_4 , Dox, $\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{Dox}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Dox}$, причем свободные наночастицы характеризуются сравнительно низкой цитотоксичностью и лишь в составе конъюгата статистически достоверно превышают цитотоксичность свободного доксорубина и смеси наночастиц с доксорубином.

Механизм обнаруженного феномена может быть отчасти связан с фармакологическим синергизмом цитостатических эффектов наночастиц и доксорубина в составе конъюгата. Известно, что цитотоксическое действие доксорубина

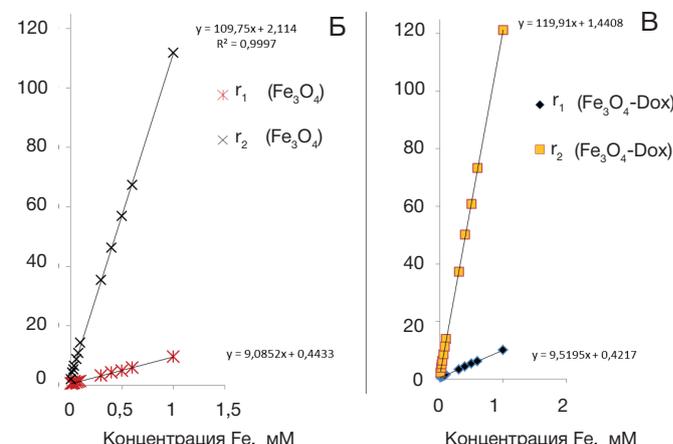
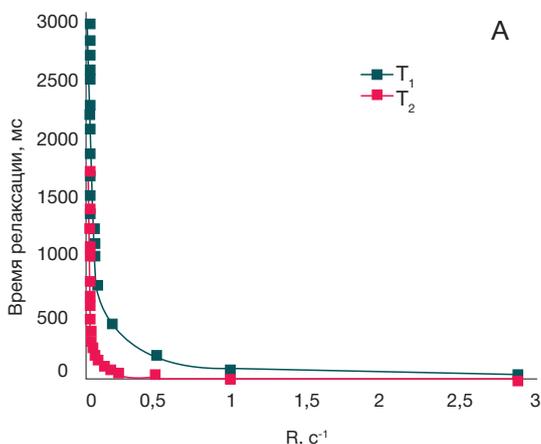


Рис. 3. (А) Концентрационные зависимости времени релаксации T_1 и T_2 ; (Б) концентрационные зависимости обратных значений спин-решетчатой ($r_1 = 1/T_1$) и спин-спиновой ($r_2 = 1/T_2$) релаксации золя наночастиц магнетита и (В) конъюгата наночастиц магнетита с доксорубином.

загрязнителей мы использовали метод диализа. Низкомолекулярные компоненты реакционной массы свободно проходят сквозь поры мембраны размером 3,5 кДа. В случае возникновения градиента концентраций компонента по разные стороны мембраны самопроизвольно происходит их выравнивание. Многократной заменой внешней жидкости на чистый растворитель (дистиллированную воду) можно добиться снижения концентрации неорганических соединений до фоновых значений.

При исследовании антипролиферативной активности доксорубина (Dox), наночастиц магнетита (Fe_3O_4) и конъюгата наночастиц магнетита с доксорубином ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Dox}$) в отношении клеток HeLa было показано, что конъюгаты наночастиц

Значения полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC_{50}) для образцов Fe_3O_4 , Dox, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Dox}$ и смеси Fe_3O_4 и Dox, полученные на культуре клеток HeLa

| Состав образца | IC_{50} , М | 95 % доверительный интервал IC_{50} , М |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--|
| $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Dox}$ | $(7,4 \pm 0,09) \times 10^{-8}$ * | $5,5 \times 10^{-8}; 9,9 \times 10^{-8}$ |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{Dox}$ | $(3,7 \pm 0,08) \times 10^{-7}$ * | $3,2 \times 10^{-7}; 4,7 \times 10^{-7}$ |
| Fe_3O_4 | $(1,0 \pm 0,09) \times 10^{-6}$ * | $0,1 \times 10^{-6}; 1,8 \times 10^{-6}$ |
| Dox | $(2,7 \pm 0,08) \times 10^{-7}$ | $2,4 \times 10^{-7}; 3,0 \times 10^{-7}$ |

Примечание: * — статистически достоверное отличие выявлено при сравнении IC_{50} образца со значением IC_{50} Dox ($p < 0,05$). Значения IC_{50} сравнивали на основе концентраций доксорубина, кроме образца свободных наночастиц оксида железа (Fe_3O_4), для которого оценивали концентрацию железа.

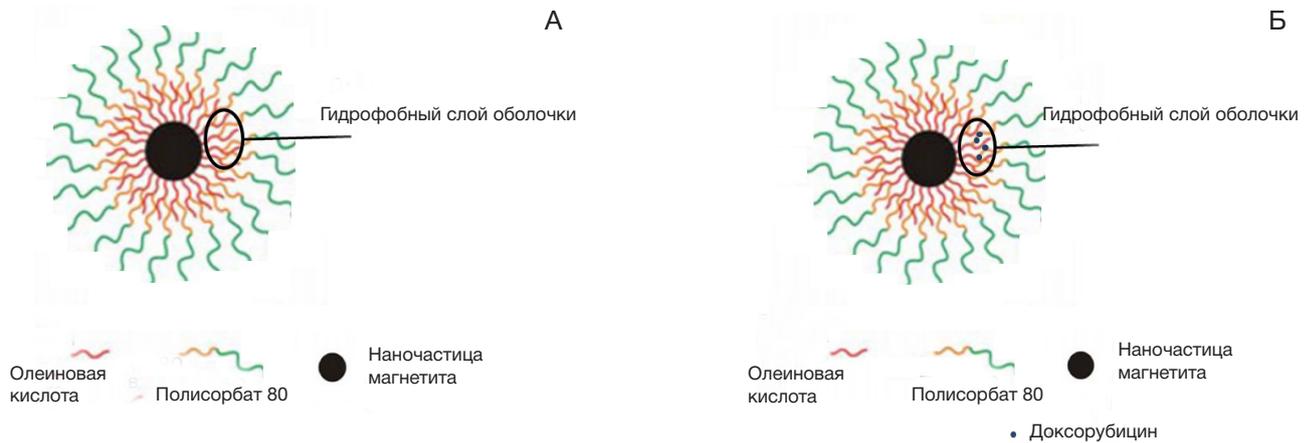


Рис. 4. (А) Строение наночастиц оксида железа, модифицированных олеиновой кислотой и стабилизированных полисорбатом 80, (Б) и тех же частиц, конъюгированных с молекулами доксорубицина (схема).

может усиливаться в составе комплекса с наночастицами оксида металла [16]. Вместе с тем весьма интересным объяснением наблюдаемого различия выживаемости клеточной культуры может быть облегчение интернализации доксорубицина в составе наночастиц оксида железа внутрь клетки и/или клеточных компартментов (например, внутрь клеточного ядра) без взаимодействия с системой выброса ксенобиотика. В пользу такого объяснения свидетельствует то, что конъюгат обладал значимо более высокой токсичностью по сравнению со смесью при схожих концентрациях наночастиц и доксорубицина. N. Schleich и соавт. [17] показали времязависимое накопление в клетках доксорубицина в составе конъюгата с наночастицами оксида железа. Наконец, возможно прямое ингибирование наночастицами системы выброса доксорубицина из клетки [18]. Эти гипотезы, выдвинутые на основе обнаруженного феномена и представленных в литературе данных, безусловно, требуют тщательной проверки.

С помощью диализа была изучена кинетика высвобождения доксорубицина из поверхностного слоя наночастиц. Кинетические исследования показали, что при pH = 7,4 установление равновесия между свободной и конъюгированной формами доксорубицина происходит в течение суток. Связывание доксорубицина в поверхностном слое наночастиц магнетита довольно прочное. Так, в течение 2–10 сут лишь 5 % конъюгированного доксорубицина оказывается во внешней жидкой среде и со временем, после 2 сут, не изменяется (рис. 5). Полученные данные позволяют говорить о принципиальной возможности отсроченного плавного высвобождения активной субстанции в ткани-мишени, что важно для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Дальнейшие исследования контролируемого высвобождения доксорубицина показали, что применение триггерного стимула (ультразвука) значительно повышало эффективность высвобождения молекул солюбилизованного вещества. Впервые ультразвуковое воздействие для повышения проникновения лекарственного вещества в ткань-мишень применили в 1950-х годах К. Феллингер (K. Fellinger) и Дж. Шмид (J. Schmid), которые таким образом улучшили биодоступность лечебной мази гидрокортизона по отношению к воспаленной ткани при лечении полиартрита [19]. Повышение высвобождения доксорубицина под действием ультразвука можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, часть распространяемой посредством ультразвуковой волны энергии поглощается объектом воздействия, что приводит к его локальному нагреву, а это в свою очередь способствует десорбции. Во-вторых, ультразвуковое излучение может приводить к кавитации, которая существенным образом ускоряет диффузию [20].

Представляет интерес продолжение экспериментов, касающихся применения ультразвука в адекватных режимах в условиях *in vivo*. Это позволит оценить наличие и выраженность эффекта «сонопорации» — временного улучшения проникновения полученных наноносителей в ткань- и клетку-мишень [20]. Требуется проведение дальнейшего поиска условий наилучшего высвобождения, включая изменение pH и применение других внешних триггерных импульсов.

Обнаруженный феномен позволяет говорить о возможности контролируемого высвобождения связанного гидрофобными связями доксорубицина при использовании ультразвука в качестве внешнего триггерного стимула. Преимуществами такого стимула являются неинвазивность ультразвукового излучения, а также потенциал локального воздействия с модификацией фармакокинетического профиля лекарственного вещества.

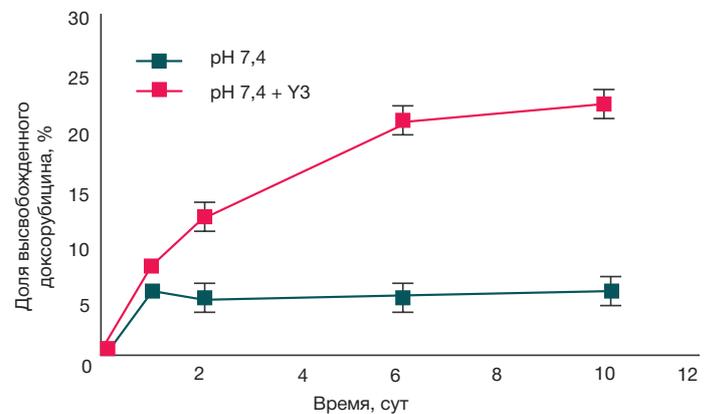


Рис. 5. Кинетика высвобождения доксорубицина из связи с наночастицами оксида железа в натрий-фосфатном буфере, pH = 7,4 (37 °C), без воздействия ультразвука и при дополнительном воздействии ультразвуком. Исходные концентрации железа и доксорубицина во внутренней камере системы: [Fe] = 9,7 mM, [Dox] = 0,94 mM.

ВЫВОДЫ

Полученная субстанция наночастиц оксида железа с доксорубицином может выполнять диагностическую (в сочетании с МРТ) и терапевтическую функции, что обеспечит дополнительные преимущества в условиях клинического применения, в частности позволит выявлять опухолевые очаги, проводить мониторинг биораспределения доксорубицина в режиме реального времени и оценивать ответ на химиотерапию.

Литература

1. Шимановский Н. Л. Направленный транспорт лекарственных веществ с помощью наночастиц оксида железа. Рос. хим. журн. 2012; LVI (3–4): 126–45.
2. Федотчева Т. А., Оленин А. Ю., Старостин К. М. и др. Перспективы применения наночастиц золота, серебра и оксида железа для повышения эффективности химиотерапии опухолевых новообразований. Хим.-фарм. журн. 2015; 49 (4): 11–22.
3. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF). *Kidney Int.* 2009; 75: 465–74.
4. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR, et al. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. *J Control Release.* 2011; 152: 76–83.
5. Ragab DM, Rohani S, Consta S. Controlled release of 5-fluorouracil and progesterone from magnetic nanoaggregates. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 3167–89.
6. Ling Y, Wei K, Zou F, Zhong S. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *Int J Pharm.* 2012; 430: 266–75.
7. Jain KT, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhassetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm.* 2005; 2 (3): 194–205.
8. Beckhoff B, Kanngießer B, Langhoff N, Wedell R, Wolff H, editors. *Handbook of practical X-Ray fluorescence analysis.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.; 2006.
9. Yolles S, Aslund B, Morton J, Olson AT, Rosenberg B. Timed-released depot for anticancer agents. II. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15: 382–8.
10. Nigam S, Barick K, Bahadur D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J Magn Magn Mater.* 2011; 323: 237–43.
11. Nogueira DR, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2011; 420 (1): 51–8.
12. Kaufels N, Korn R, Wagner S. Magnetic resonance imaging of liver metastases: experimental comparison of anionic and conventional superparamagnetic iron oxide particles with a hepatobiliary contrast medium during dynamic and uptake phases. *Invest Radiol.* 2008; 43 (7): 496–503.
13. Lawaczeck R, Menzel M, Pietsch H. Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. *Appl Organomet Chem.* 2004; 18: 506.
14. Yue-Jian C, Juan T, Fei X, Jia-Bi Z, Ning G, Yi-Hua Z, et al. Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010; 36 (10): 1235–44.
15. Hsieh WJ, Liang CJ, Chieh JJ, Wang SH, Lai IR, Chen JH, et al. In vivo tumor targeting and imaging with anti-vascular endothelial growth factor antibody-conjugated dextran-coated iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 2833–42.
16. Deng Y, Zhang H. The synergistic effect and mechanism of doxorubicin-ZnO nanocomplexes as a multimodal agent integrating diverse anticancer therapeutics. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 1835–41.
17. Schleich N, Sibret P, Danhier P, Ucakar B, Laurent S, Muller RN, et al. Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging. *Int J Pharm.* 2013; 447: 94–101.
18. Padwal P, Bandyopadhyaya R, Mehra S. Polyacrylic acid-coated iron oxide nanoparticles for targeting drug resistance in mycobacteria. *Langmuir.* 2014; 30 (50): 15266–76.
19. Ky Ng, Liu Y. Therapeutic ultrasound: Its application in drug delivery. *Med Res Rev.* 2002; 22 (2): 204–23.
20. Iwanaga K, Tominaga K, Yamamoto K, Habu M, Maeda H, Akifusa S, et al. Local delivery system of cytotoxic agents to tumors by focused sonoporation. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14 (4): 354–63.

References

1. Shimanovskiy NL. Napravleniy transport lekarstvennykh veshchestv s pomoshch'yu nanochastits oksida zheleza. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal.* 2012; LVI (3–4): 126–45. Russian.
2. Fedotcheva TA, Olenin AY, Starostin KM, et al. Perspektivy primeneniya nanochastits zolota, srebra i oksida zheleza dlya povysheniya effektivnosti khimioterapii opukholevykh novoobrazovaniy. *Khimiko-pharmatsevticheskiy zhurnal.* 2015; 49 (4): 11–22. Russian
3. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF). *Kidney Int.* 2009; 75: 465–74.
4. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR, et al. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. *J Control Release.* 2011; 152: 76–83.
5. Ragab DM, Rohani S, Consta S. Controlled release of 5-fluorouracil and progesterone from magnetic nanoaggregates. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 3167–89.
6. Ling Y, Wei K, Zou F, Zhong S. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *Int J Pharm.* 2012; 430: 266–75.
7. Jain KT, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhassetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm.* 2005; 2 (3): 194–205.
8. Beckhoff B, Kanngießer B, Langhoff N, Wedell R, Wolff H, editors. *Handbook of practical X-Ray fluorescence analysis.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.; 2006.
9. Yolles S, Aslund B, Morton J, Olson AT, Rosenberg B. Timed-released depot for anticancer agents. II. *Acta Pharm Suec.* 1978; 15: 382–8.
10. Nigam S, Barick K, Bahadur D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J Magn Magn Mater.* 2011; 323: 237–43.
11. Nogueira DR, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2011; 420 (1): 51–8.
12. Kaufels N, Korn R, Wagner S. Magnetic resonance imaging of liver metastases: experimental comparison of anionic and conventional superparamagnetic iron oxide particles with a hepatobiliary contrast medium during dynamic and uptake phases. *Invest Radiol.* 2008; 43 (7): 496–503.
13. Lawaczeck R, Menzel M, Pietsch H. Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. *Appl Organomet Chem.* 2004; 18: 506.
14. Chen Y-J, Tao J, Xiong F et al. Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010; 36 (10): 1235–44.
15. Hsieh WJ, Liang CJ, Chieh JJ, Wang SH, Lai IR, Chen JH, et al. In vivo tumor targeting and imaging with anti-vascular endothelial growth factor antibody-conjugated dextran-coated iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 2833–42.
16. Deng Y, Zhang H. The synergistic effect and mechanism of doxorubicin-ZnO nanocomplexes as a multimodal agent integrating diverse anticancer therapeutics. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 1835–41.
17. Schleich N, Sibret P, Danhier P, Ucakar B, Laurent S, Muller RN, et al. Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging. *Int J Pharm.* 2013; 447: 94–101.
18. Padwal P, Bandyopadhyaya R, Mehra S. Polyacrylic acid-coated iron oxide nanoparticles for targeting drug resistance in mycobacteria. *Langmuir.* 2014; 30 (50): 15266–76.
19. Ky Ng, Liu Y. Therapeutic ultrasound: Its application in drug delivery. *Med Res Rev.* 2002; 22 (2): 204–23.
20. Iwanaga K, Tominaga K, Yamamoto K, Habu M, Maeda H, Akifusa S, et al. Local delivery system of cytotoxic agents to tumors by focused sonoporation. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14 (4): 354–63.

УВАЖАЕМЫЕ АВТОРЫ!

Журнал «Вестник РГМУ» — рецензируемый научный медицинский журнал Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (Москва). Издаётся с 1994 г. и публикует статьи по клинической медицине и медико-биологическим наукам. Журнал учреждён университетом в интересах медицины: к рассмотрению принимаются статьи исследователей независимо от географии, и интеллектуальный потенциал университета — только один из инструментов журнала для оценки их качества. Хорошая статья интересна, информативна, доказательна и понятна исследователям любой специализации.

Журнал рассматривает только оригинальные статьи, поданные их авторами, при этом авторы гарантируют, что статья не была опубликована ранее, в том числе на других языках, и не находится на рассмотрении в других научных журналах.

Публикации в журнале бесплатны.

Журнал выходит раз в два месяца и распространяется по лицензии CC BY (свободное использование материалов в некоммерческих и коммерческих целях с обязательным указанием авторства). Свободное распространение научного

знания — приоритет журнала. Благодаря этому мы можем размещать «Вестник» в популярных поисковых системах, например Google Scholar, а это увеличивает вероятность цитирования вашей статьи.

Журнал придерживается международных стандартов подготовки, оформления и опубликования научных статей в медицинских журналах (Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals of the International Committee of Medical Journal Editors), в том числе этических принципов (Committee on Publication Ethics). Пожалуйста, прежде чем вы решите подготовить для нас статью, изучите нашу Редакционную политику (размещена на сайте vestnikrgmu.ru).

Для удобства авторов мы составили шаблон статьи, использование которого позволит не думать о форматировании. Шаблон также содержит рекомендации по написанию хорошей научной статьи. Скачать его можно с сайта vestnikrgmu.ru.

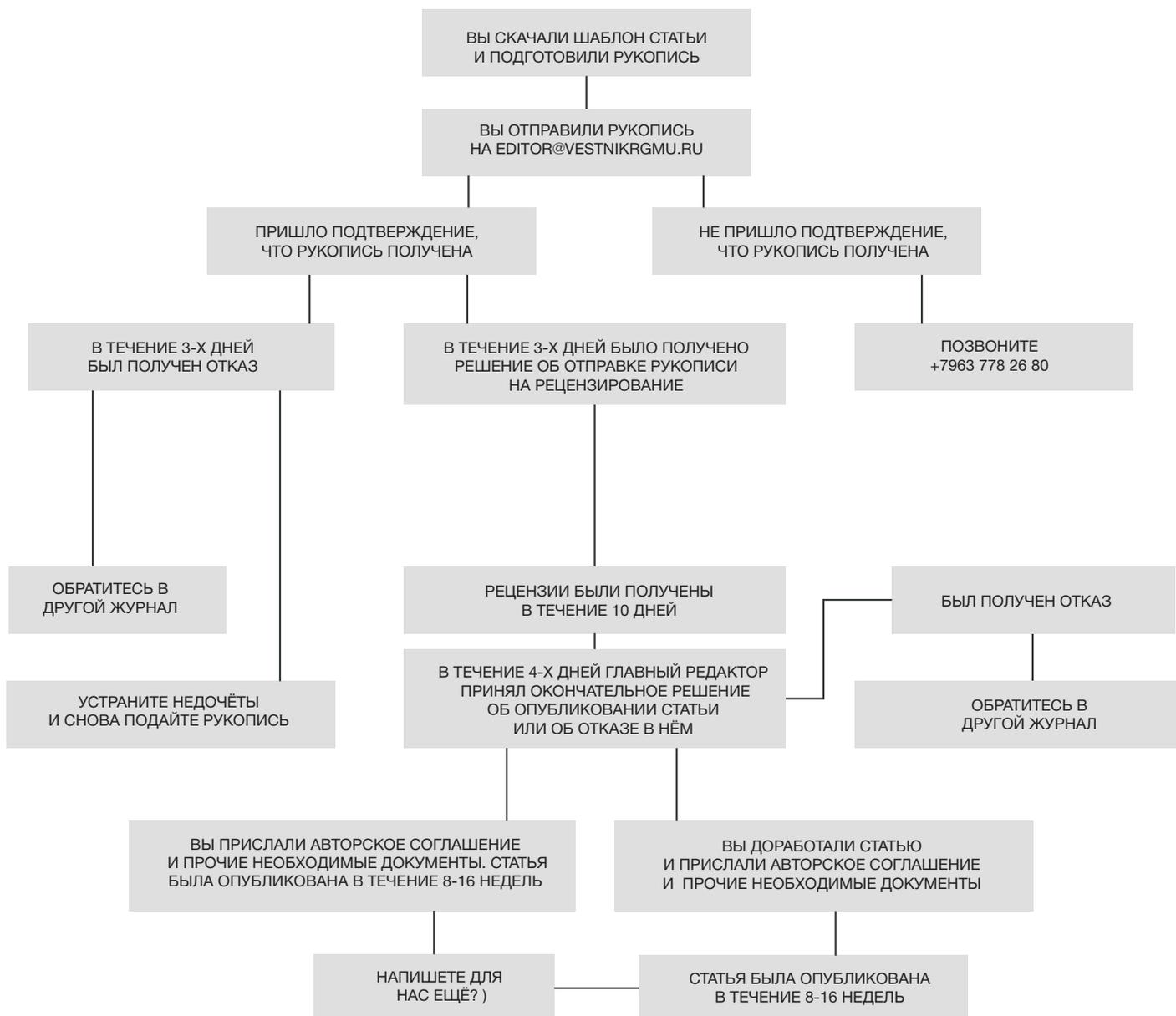
Будем рады рассмотреть ваши рукописи!

Требования к статьям

| Тип статьи | Разделы | Объём статьи (без титульного листа и ссылок), зн. без проб. | Объём реферата, зн. без проб. | Число таблиц и рисунков | Число ссылок |
|--|---|---|-------------------------------|-------------------------|--------------|
| Обзор (в том числе ретроспективный) | Титульный лист Разделы (свободно) Выводы Литература (References) | 30-32 тыс. | до 1000 | не более 4 | 25-50 |
| Исследовательская статья | Титульный лист Введение Пациенты (материалы) и методы Результаты исследования Обсуждение результатов Выводы Литература (References) | 25-30 тыс. | до 1200 | не более 6 | 15-40 |
| Аналитическая статья (анализ чужих данных) | Титульный лист Введение Материалы и методы Результаты исследования Обсуждение результатов Выводы Литература (References) | 20-25 тыс. | до 1200 | не более 6 | 15-40 |
| Метод (технический доклад) | Титульный лист Разделы (свободно) Выводы Литература (References) | 20-25 тыс. | до 1200 | не более 4 | 15-25 |
| Клинический случай | Титульный лист Основной текст Литература (References) | 10-12 тыс. | до 1000 | не более 2 | 10-15 |
| Комментарий | Титульный лист (без реферата и КС) Основной текст Литература (References) | 5-7 тыс. | - | не более 2 | 5-10 |
| Мнение | Титульный лист (без реферата и КС) Основной текст Литература (References) | 5-7 тыс. | - | не более 2 | 5-10 |
| Письмо в редакцию | Титульный лист (без реферата и КС) Основной текст Литература (References) | 5-7 тыс. | - | - | 5-10 |
| Обзор книги | Титульный лист (без реферата и КС) Основной текст | 1,5-2 тыс. | - | - | - |

РЕДАКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

Ниже представлена схема работы журнала с рукописями.



УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Мы будем рады, если опубликованные статьи найдут отклик. Присылайте мнения и комментарии на editor@vestnikrgmu.ru. Мы предложим авторам публикации ответить на ваши вопросы или замечания, а наиболее содержательные дискуссии — опубликуем.



www.rsmu.ru

117997, Москва, ул, Островитянова, 1