



БЮЛЛЕТЕНЬ

ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова

№ 1 (18)

Февраль 2013

Экспериментальная медицина

Сонин Д.Л., Галагудза М.М.

Роль рецепторов первого типа, активируемых протеиназами в ремоделировании миокарда

Киселев А.М., Реут Л.И., Ключина А.А. и др.

Аутоантитела в патогенезе дилатационных кардиомиопатий

Худяков А.А., Курапеев Д.И., Костарева А.А., Малашичева А.Б.

Получение предшественников кардиомиоцитов человека из ткани миокарда

Шпаков А.О., Мойсеюк И.В., Чистякова О.В. и др.

Лечение интраназальным инсулином и серотином восстанавливает чувствительность аденилатциклазы к гормонам в мозге крыс с длительным неонатальным диабетом

Карпушев А.В., Ревитцер А.В., Рябинкина И.В., Тыщук Е.В.

Методика пэтч-кламп в электрофизиологических исследованиях кардиомиоцитов и характеристика ионных каналов миоцитов сердца млекопитающих

Зухурова М.А., Дайнеко А.С., Лупан Д.С. и др.

Оценка нейропротективных свойств L-теанина с помощью неврологических и поведенческих тестов на разных сроках постинсультного периода

Гематология и клеточная терапия

Стадник Е.А.

Волосато — клеточный лейкоз. Рекомендации по диагностике и лечению

Жебрун Д.А., Маслянский А.Л., Джавадова Э.А., Пругло О.С.

Использование мезенхимных стволовых клеток в лечении артропатий

Кардиология

Ситникова М.Ю., Лясникова Е.А., Трукшина М.А.

Хроническая сердечная недостаточность: как оценить объем проблем и оптимизировать терапию пациентов с ее тяжелыми формами

Эндокринология

Цой Ю.С., Гринева Е.Н.

Современные принципы лечения акромегалии

Демина А.Г., Бреговский В.Б., Карпова И.А.

Неврологическая и морфологическая характеристика стоп при диабетической нейроостеоартропатии (артропатии Шарко).

Страницы из истории медицины

Щербак С.Г., Попов А.Е., Докиш Ю.М., Журавлев Д.А.

К истории медицинских учреждений Сестрорецка



БЮЛЛЕТЕНЬ

ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова

Санкт-Петербург
2013

Главный редактор
Е.В. Шляхто

Editor-in-Chief
E. Shlyakhto

Зам. главного редактора
А.О. Конради
М.А. Карпенко

Vice-editors
A. Konradi
M. Karpenko

Секретарь
Н.Г. Авдонина

Secretary
N. Avdonina

Члены редакционной коллегии
Е.И. Баранова (Санкт-Петербург)
Е.Р. Баранцевич (Санкт-Петербург)
В.А. Барт (Санкт-Петербург)
О.А. Беркович (Санкт-Петербург)
В.Н. Вавилов (Санкт-Петербург)
М.М. Галагудза (Санкт-Петербург)
Е.Н. Гринева (Санкт-Петербург)
М.Л. Гордеев (Санкт-Петербург)
И.Е. Зазерская (Санкт-Петербург)
А.Ю. Зарицкий (Санкт-Петербург)
Э.В. Земцовский (Санкт-Петербург)
Д.О. Иванов (Санкт-Петербург)
Т.Л. Каронова (Санкт-Петербург)
М.А. Карпенко (Санкт-Петербург)
А.А. Костарева (Санкт-Петербург)
Д.И. Курапеев (Санкт-Петербург)
О.М. Моисеева (Санкт-Петербург)
А.О. Недошивин (Санкт-Петербург)
А.В. Рудакова (Санкт-Петербург)
Г.Н. Салогуб (Санкт-Петербург)
В.Н. Солнцев (Санкт-Петербург)
Л.А. Сорокина (Санкт-Петербург)
В.А. Цырлин (Санкт-Петербург)

Editorial board
E. Baranova (St. Petersburg)
E. Barancevich (St. Petersburg)
V. Bart (St. Petersburg)
O. Berkovich (St. Petersburg)
V. Vavilov (St. Petersburg)
M. Galagudza (St. Petersburg)
E. Grineva (St. Petersburg)
M. Gordeev (St. Petersburg)
I. Zazerskaya (St. Petersburg)
A. Zaritskii (St. Petersburg)
E. Zemtsovskiy (St. Petersburg)
D. Ivanov (St. Petersburg)
T. Karonova (St. Petersburg)
M. Karpenko (St. Petersburg)
A. Kostareva (St. Petersburg)
D. Kurapeev (St. Petersburg)
O. Moiseeva (St. Petersburg)
A. Nedoshivin (St. Petersburg)
A. Rudakova (St. Petersburg)
G. Salogub (St. Petersburg)
V. Solntsev (St. Petersburg)
L. Sorokina (St. Petersburg)
V. Tsirlin (St. Petersburg)



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

**Министерства здравоохранения
Российской Федерации**

Подача рукописей и переписка с авторами,
размещение рекламы и подписка
e-mail: bulleten@almazovcentre.ru

Издательство
«ФОНД ВЫСОКИХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

Адрес: 194156, Санкт-Петербург,
пр. Пархоменко, д. 15, лит.Б.

Телефоны издательства: (812) 702 37 16

Бюллетень зарегистрирован
в Государственном комитете РФ по печати.
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77-38713 от 22.01.2010 г.

Тираж 1100 экз.

Тематическая рассылка по специалистам.

***Подписка по каталогу агентства «Роспечать»
подписной индекс 57992***

Все права защищены. Полное или частичное воспроизведе-
ние материалов, опубликованных в бюллетене, допускается
только с письменного разрешения редакции.

Редакция не несет ответственности за содержание реклам-
ных материалов.

ISSN 2078-8150

Верстка П.В. Морозов

СОДЕРЖАНИЕ

КОЛОНКА РЕДАКТОРА	4
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА	
<i>Сонин Д.Л., Галагудза М.М.</i> Роль рецепторов первого типа, активируемых протеиназами в ремоделировании миокарда	5
<i>Киселев А.М., Реут Л.И., Ключина А.А., Рогова Н.Л., Бондаренко Л.А., Костарева А.А., Лобов И.Б., Малашичева А.Б.</i> Аутоантитела в патогенезе дилатационных кардиомиопатий	12
<i>Худяков А.А., Курапеев Д.И., Костарева А.А., Малашичева А.Б.</i> Получение предшественников кардиомиоцитов человека из ткани миокарда	17
<i>Шпаков А.О., Мойсейюк И.В., Чистякова О.В., Деркач К.В., Сухов И.Б., Бондарева В.М.</i> Лечение интраназальным инсулином и серотонином восстанавливает чувствительность аденилатциклазы к гормонам в мозге крыс с длительным неонатальным диабетом	21
<i>Карпушев А.В., Ревитцер А.В., Рябинкина И.В., Тыщук Е.В.</i> Методика пэтч-кламп в электрофизиологических исследованиях кардиомиоцитов и характеристика ионных каналов миоцитов сердца млекопитающих	28
<i>Зухурова М.А., Дайнеко А.С., Лупан Д.С., Просвирнина М.С., Пискун А.В., Барковская А.А., Власов Т.Д.</i> Оценка нейропротективных свойств L-теанина с помощью неврологических и поведенческих тестов на разных сроках постишемического периода	39
ГЕМАТОЛОГИЯ И КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ	
<i>Стадник Е.А.</i> Волосато — клеточный лейкоз. Рекомендации по диагностике и лечению	52
<i>Жебрун Д.А., Маслянский А.Л., Джавадова Э.А., Пругло О.С.</i> Использование мезенхимных стволовых клеток в лечении артропатий	59
КАРДИОЛОГИЯ	
<i>Ситникова М.Ю., Лясникова Е.А., Трушкина М.А.</i> Хроническая сердечная недостаточность: как оценить объём проблем и оптимизировать терапию пациентов с её тяжелыми формами	67
ЭНДОКРИНОЛОГИЯ	
<i>Цой Ю.С., Гринева Е.Н.</i> Современные принципы лечения акромегалии	75
<i>Демина А.Г., Бреговский В.Б., Карпова И.А.</i> Неврологическая и морфологическая характеристика стоп при диабетической нейроостеоартропатии (артропатии Шарко)	86
СТРАНИЦЫ ИЗ ИСТОРИИ МЕДИЦИНЫ	
<i>Щербак С.Г., Попов А.Е., Докиш Ю.М., Журавлев Д.А.</i> К истории медицинских учреждений Сестрорецка	93



Глубокоуважаемые читатели!

Перед Вами первый номер журнала нового 2013 года, который посвящен смежным проблемам кардиологии, эндокринологии, гематологии и регенеративной медицины. Подобное объединение теоретических вопросов, результатов экспериментальных исследований и практических рекомендаций позволяет наиболее глубоко осветить проблемы разработки и внедрения новых методов и технологий профилактики, диагностики и лечения с позиций трансляционной медицины. Реализация трансляционных исследований — от экспериментальной лаборатории до внедрения в практическое здравоохранение, станет основной идеологией журнала на ближайшие годы по решению редакционной коллегии. Объединение фундаментальных и прикладных работ общей идеологией, нацеленной на практическое использование результатов науки, является сегодня основным трендом современной биомедицинской науки. Публикация подобного рода работ будет в равной степени интересна исследовательской и практической аудитории и поможет преодолеть барьеры, существующие на пути внедрения научных достижений в практику.

Практикующим врачам будут интересны обзорная статья, посвященная ведению пациентов с тяжелыми формами хронической сердечной недостаточности, рекомендации по диагностике и лечению волосато-клеточного лейкоза, а также статьи, освещающие современные подходы к лечению акромегалии и диабетической нейроостеоартропатии.

Традиционно номер завершает рубрика, посвященная истории медицины.

Редакция выражает свою благодарность своим читателям за внимание и поддержку, и надеется, что опубликованные в этом номере материалы вызовут интерес и резонанс среди врачей различных специальностей и ученых.

Главный редактор,
директор ФГБУ «ФЦСКЭ
им.В.А.Алмазова» Минздрава России,
академик РАН *Е.В. Шляхто*

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ПЕРВОГО ТИПА, АКТИВИРУЕМЫХ ПРОТЕИНАЗАМИ В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ МИОКАРДА

Д.Л. Сонин¹, М.М. Галагудза^{1,2}

¹ ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Сонин Дмитрий Леонидович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ Метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, профессор кафедры патофизиологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, 197341. E-mail: sonin_d@mail.ru (Сонин Дмитрий Леонидович).

Резюме

Активация тромбинового рецептора (protease-activated receptor 1, PAR-1), представленного на фибробластах, стимулирует трансформацию последних в миофибробласты. Появление миофибробластов является важным этапом заживления и фиброза тканей, что также лежит в основе заместительного склерозирования при ишемической кардиомиопатии. Цель данного обзора рассмотреть участие PAR1 рецепторов в ишемически-реперфузионном повреждении и ремоделировании миокарда и проанализировать литературные данные об эффектах блокады PAR1 рецепторов на эти патофизиологические процессы.

Ключевые слова: рецепторы первого типа, активируемые протеиназами, инфаркт миокарда, ремоделирование.

THE ROLE OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTORS IN MYOCARDIAL REMODELING

D.L. Sonin¹, M.M. Galagudza^{1,2}

¹ Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: sonin_d@mail.ru (Dmitry L. Sonin — PhD, senior researcher of Research laboratory of myocardium metabolism of the Institute of Experimental Medicine, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

The activation of thrombin receptor (protease-activated receptor 1, PAR1), expressed by fibroblasts, promotes transformation of fibroblasts into myofibroblasts. This process is an important step in healing and tissue fibrosis, which underlies replacement sclerosis in ischemic cardiomyopathy. The aim of this review is to discuss the involvement of PAR1 receptor in ischemia-reperfusion injury and remodeling of the myocardium and highlight recent investigations that describe the effects of inhibition of PAR1 receptor on these pathophysiological processes.

Key words: protease-activated receptor 1, myocardial infarction, remodeling.

Статья поступила в редакцию 02.09.12, принята к печати 01.10.12.

Введение

Открытые вначале 90-х тромбиновые рецепторы (protease-activated receptors, PARs), относятся к семейству интегральных мембранных белков — семидоменных рецепторов, сопряжённых с G-белками [1, 2]. Описаны четыре члена семейства PAR, которые разделяются на рецепторы, активируемые тромбином (PAR1, PAR3 и PAR4) и активируемые сериновыми протеиназами, трипсином, триптазами тучных клеток, факторами свертывания крови (PAR2) [2]. PARs представлены на различных клетках, включая кардиомиоциты, гладкомышечные клетки, сосудистый эндотелий и макрофаги [3]. Фибробласты экспрессируют только PAR1 рецепторы [3]. Стимуляция PARs происходит путём расщепления тромбином внеклеточного участка рецептора (Рис. 1). Укороченный новый N-концевой фрагмент активирует рецептор, участвуя во взаимодействии с участками его второй внеклеточной цепи (самоактивация) [4, 5]. Активированные рецепторы опосредуют процессы репарации и ремоделирования тканей, являясь связующим звеном между коагуляцией, воспалением и фиброзом [4, 6].

Активация PAR1 тромбином и другими сериновыми протеиназами в эксперименте ведёт к фиброзу лёгких, печени и почек [7–11], и наоборот, уменьшение фиброза в этих тканях наблюдается при генетически обусловленной недостаточности или фармакологической блокаде PAR1 [7, 10]. На возможное участие PAR1 в ремоделировании сердца указывают результаты исследований миокарда пациентов с ишемической и дилатационной кардиомиопатией [12, 13]. Экспериментальным подтверждением участия PAR1 рецепторов в ремоделировании миокарда стали результаты трансгенной гиперэкспрессии PAR1 на кардиомиоцитах мыши,

что привело к формированию эксцентрической гипертрофии сердца [14]. Кроме этого, недавно Jaffre et al, используя модель неишемической сердечной недостаточности, наблюдал развитие PAR-1 и MMP-13 опосредованной гипертрофии кардиомиоцитов [15]. Эти исследования указывают на участие PAR-1 в развитии гипертрофии миокарда, в то же время, прямое исследование вклада активации PAR1 в фиброз миокарда в этих работах не проводилось.

Внутриклеточный путь передачи сигнала, следующего за активацией PAR1 рецептора, впервые был исследован Sabri и соавт. (2002) в культурах миокардиальных фибробластов и кардиомиоцитов [16]. Авторами установлено, что вслед за активацией PAR1 рецепторов повышается количество внутриклеточного кальция и активируются ERK1/2, p38-MAPK и Akt сигнальные пути. В итоге повышается синтез ДНК, ведущий у фибробластов к пролиферации, причём увеличение количества синтезируемой ДНК следующее за активацией PAR1 рецепторов превышает эффект других агонистов G-протеин связанных рецепторов (AT II и ET-1) [16].

В настоящее время проявляется большой интерес к роли PARs в сердечно-сосудистой системе, что в некоторой мере обусловлено проводящимися клиническими исследованиями пероральных форм антагонистов PAR1. Цель этого обзора рассмотреть участие PAR-1 в ишемически-реперфузионном повреждении миокарда, ремоделировании миокарда и эффектах блокады PAR-1 рецепторов на миокард.

Роль PAR1 в ишемически-реперфузионном повреждении миокарда

Благодаря современному эффективному лечению снижается смертность от острого инфаркта

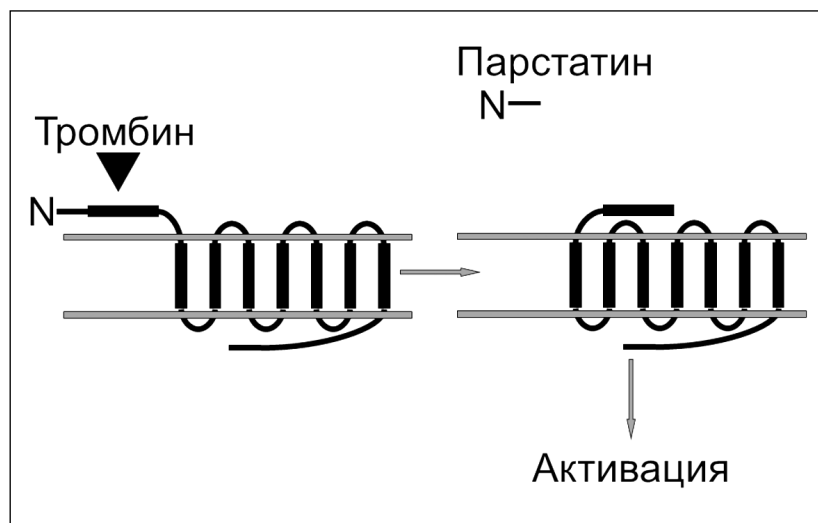


Рисунок 1. Активация PAR1 тромбином

миокарда [17, 18]. Но по-прежнему сохраняется плохой долгосрочный прогноз у пациентов, перенёвших острую сердечную недостаточность [19–21], что связано с развитием у этой группы пациентов застойной сердечной недостаточности и присоединением тяжёлых форм аритмий [22]. В экспериментальных исследованиях было показано, что если «выключается» больше 16–20 % массы левого желудочка, то оставшийся миокард не в состоянии полностью компенсировать потерю, вследствие чего развивается ремоделирование левого желудочка и прогрессирует сердечная недостаточность [23]. В связи с этим важной задачей является создание эффективных способов уменьшения, как тяжести ишемического повреждения, так и раннего постинфарктного ремоделирования миокарда [24, 25].

Ишемия с последующей реперфузией повреждают сосуды, что ведёт к просачиванию тромбина и других факторов свёртывания в миокард. Блокада тромбина или тканевого фактора антителами в модели инфаркта миокарда у кроликов значительно уменьшает размер инфаркта [26]. Авторы предположили, что кардиопротективный эффект блокады тромбина обусловлен подавлением воспалительной реакции, которая развивается в ответ на активацию тромбином PARs на различных типах клеток миокарда.

До недавнего времени роль PAR1 рецепторов в ишемически-реперфузионном повреждении оставалась неисследованной. Strande и соавт. установили, что блокатор тромбиновых PAR1 рецепторов, SCH79797, изначально созданный для профилактики тромбообразования у пациентов с коронарным атеросклерозом, обладает не только антиагрегантными свойствами, но и защищает от ишемически-реперфузионного повреждения [27]. Авторами было показано, что блокада PAR-1 рецепторов у крыс, путём введения SCH79797 за 15 минут до 30-минутной ишемии, повышает устойчивость миокарда к ишемически-реперфузионному повреждению [27]. В противоположность этим данным Pawlinski и соавт. не выявил различий в размере инфаркта миокарда у PAR-1^{-/-} мышей [28]. По мнению авторов, эти различия могут быть обусловлены, с одной стороны, дополнительными фармакологическими свойствами SCH79797 а, с другой стороны, могут быть вызваны компенсацией дефицита PAR-1 за счёт активации PAR-4 рецепторов [14].

Активируя PAR1 рецептор, тромбин отщепляет N-концевой фрагмент (Рис. 1), освобождая во внеклеточную среду 41-аминокислотный пептид. До настоящего времени биологическая активность этого пептида (parstatin) была неизвестна. Strande и соавт. показали, что введение *in vivo* и *in vitro* экзогенного

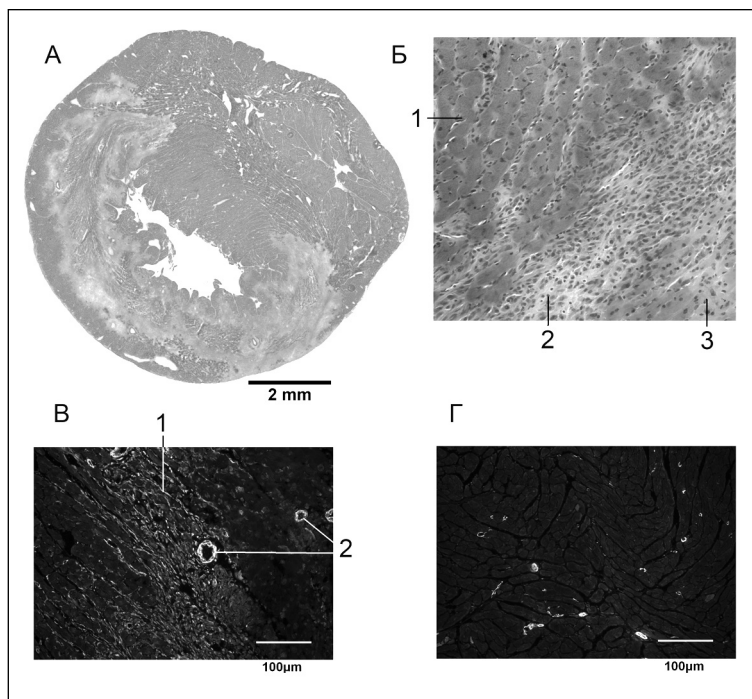
парстатина 1–41, а также короткого фрагмента 1–26 непосредственно перед эпизодом ишемии защищает сердце крысы от ишемически-реперфузионного повреждения миокарда. Защитный эффект проявляется в уменьшении размера инфаркта миокарда, в лучшем восстановлении сократительной функции миокарда и коронарного кровотока [29, 30]. Авторы установили, что кардиопротективный механизм парстатина 1–41 опосредован торможением PAR1 и активацией G_i протеин-связанного сигнального пути, который включает в себя p38, внеклеточную сигнал-регулируемую киназу (ERK1/2), и АТФ-зависимые калиевые каналы [29]. Сокращенный вариант парстатина 1-26 также активировал G_i-протеин зависимые эффекты [30].

Различия результатов фармакологической блокады и генетически обусловленного дефицита PAR1 рецепторов требуют дальнейшего изучения кардиопротективных эффектов блокады PAR1. Хотя, как минимум, первые результаты свидетельствуют о безопасности использования антагониста PAR1 рецепторов при ишемии-реперфузии миокарда.

Участие PAR1 в ремоделировании миокарда

Процесс формирования пост-инфарктного рубца это динамический процесс, который можно разделить на три постепенно меняющие друг друга фазы: воспалительную, пролиферативную и окончательную фазу рубцевания [31]. На вторые сутки после ишемически-реперфузионного повреждения в пограничной зоне инфаркта миокарда происходит накопление макрофагов, которые секретируют TGF-beta и другие факторы, стимулирующие активацию и миграцию фибробластов [32, 33]. Выходящие из сосудов тромбин и другие коагуляционные протеиназы (FVa, FXa) активируют макрофаги [34], кроме того макрофаги сами секретируют тромбин [4]. На третий день начинает накапливаться слой активированных фиброластов — миофибробластов, которые мигрируют, пролиферируют и секретируют компоненты экстрацеллюлярного матрикса (Рис. 2А-Б) [31, 32]. Ранее процесс трансформации фибробластов в миофибробласты связывали в основном с иницирующей ролью TGF-beta, но сегодня известно, что тромбин, активируя PAR1 рецепторы на фибробластах, также инициирует процесс трансформации в миофибробласты [34, 35]. Экспериментальные исследования с изолированными фибробластами показали, что активация PAR1 рецепторов индуцирует пролиферацию фибробластов и продукцию проколлагена [36].

Миофибробласты отсутствуют в нормальном миокарде и появляются в нем при различных заболеваниях и могут быть обнаружены по наличию



Риснок 2. Появление миофибробластов в пограничной зоне на третьи сутки инфаркта миокарда крысы. Инфаркт вызван 30 — минутной окклюзией левой коронарной артерии. А. Сканированное изображение поперечного среза сердца крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Зона ишемического повреждения окружена инфильтрированной пограничной зоной. Б — Увеличенное (x20) изображение пограничной зоны: 1 — жизнеспособный миокард, 2 — инфильтрат, содержащий миофибробласты, 3 — некроз. В, Г — Определение миофибробластов в пограничной зоне инфаркта с использованием флуоресцентного антитела против α -актина гладких мышц (α SMA): 1 — слой миофибробластов, 2 — гладкомышечные клетки сосудов, содержащие α SMA. Изображение Г — интактный миокард, не содержащий миофибробластов. Видны только гладкомышечные клетки сосудов

миофиламентов (alpha smooth muscle actin, α -SMA; Рис. 2В-Г) благодаря которым миофибробласты мигрируют и уплотняют рубцовую ткань [33]. По завершении формирования рубца миофибробласты претерпевают апоптоз, но по не вполне ясным причинам миофибробласты персистируют в миокарде человека месяцы после инфаркта [37]. Длительное присутствие миофибробластов связывают с непрерывным ремоделированием, что может быть причиной избыточного фиброза и постинфарктных аритмий [37].

На участие PAR1 рецепторов в постинфарктном ремоделировании указывают результаты исследования мышей с генетически обусловленным дефицитом PAR1 рецепторов. Моделирование ишемически-реперфузионного повреждения у этих животных сопровождается меньшей постинфарктной дилатацией сердца и лучшим восстановлением функции через две недели после эпизода ишемии [14]. Учитывая то, что у пациентов с ишемической кардиомиопатией выявляется повышение экспрессии и активации PAR1 рецепторов, в сумме эти данные указывают на вовлечённость PAR1 рецепторов в постинфарктное ремоделирование и

могут служить «мишенью» для терапевтического воздействия.

Отдельного внимания заслуживает диастолическая дисфункция и роль PAR1 в развитии реактивного фиброза. Известно, что у большинства пациентов, имеющих хроническую сердечную недостаточность, заболевание вызывается или сопровождается артериальной гипертензией, последствия которой заключается в развитии гипертрофии миокарда и диастолической дисфункции [38]. Нарушения диастолического наполнения левого желудочка вызваны как функциональными изменениями активной фазы расслабления, так и уменьшением пассивной податливости стенок сердца, обусловленной фиброзом [39]. Экспериментальные данные указывают на корреляцию между выраженностью фиброза и повышением жёсткости миокарда [40]. На модели перегрузки давлением Kuwahara и соавт. (2002) установили, что предотвращение активации фибробластов путём нейтрализации TGF- β анти-TGF-антителами предотвращает развитие фиброза и диастолической дисфункции, но не препятствует развитию гипертрофии [41]. На сегодняшний день нет данных о возможности предупреждать развитие

диастолической дисфункции посредством ингибирования PAR1 рецепторов.

Клиническое исследование антагонистов PAR1 рецепторов

До настоящего времени клинических исследований антагониста PAR1 рецепторов SCH79797 не проводилось, однако недавно были опубликованы результаты третьей и второй фаз рандомизированных клинических исследований TRACER и LANCELOT-ACS. В этих исследованиях изучались антагонисты PAR-1 рецепторов SCH 530348 (Vorapaxar) [42] и E5555 (Atorapaxar) [43], которые были разработаны для антиагрегантной терапии пациентов с ишемической болезнью сердца. III фаза испытаний TRACER (SCH 530348) была остановлена до её окончания из-за значимого повышения риска кровотечений, в том числе интракраниальных. Добавление SCH 530348 к стандартной терапии (аспирин и клопидогрель) привело к недостоверному уменьшению случаев инфаркта, инсульта, госпитализаций по поводу рецидива ишемии и экстренной реваскуляризации. Авторы отметили, что в подгруппе пациентов, которые не получали ингибитор рецепторов P₂Y₁₂ при рандомизации, не наблюдалось увеличения числа кровотечений.

Недавно закончился второй этап III фазы исследования эффективности и безопасности SCH 530348 (TRA2°P-TIMI 50) у пациентов с анамнезом сердечно-сосудистых заболеваний, которые чаще принимают только один из антиагрегантов (аспирин или клопидогрель) [44]. Основной целью исследования было оценить эффективность SCH 530348 в предотвращении возникновения инфаркта и инсульта у данной категории пациентов. На второй год исследований было решено прекратить исследование в группе пациентов с инсультом в анамнезе из-за высокого риска интракраниальных кровотечений. В группе больных с анамнезом инфаркта миокарда исследование было завершено, результаты которого свидетельствуют о том, что добавление SCH 530348 к терапии достоверно уменьшает частоту возникновения инфаркта.

Результаты второй фазы рандомизированных исследований ещё одного антагониста PAR1 E5555 (Atorapaxar) выявили тенденцию к снижению частоты острого коронарного синдрома среди испытуемых без увеличения клинически значимых кровотечений.

Таким образом, текущие результаты исследования свидетельствуют об эффективности SCH 530348 (Vorapaxar) в предотвращении возникновения острых коронарных событий и безопасности

использования E5555, изучение которого ещё продолжается. Однако, использование SCH 530348 сопряжено с повышенным риском геморрагических осложнений в том числе интракраниальных кровотечений.

Заключение

Имеющиеся данные свидетельствуют об участии PAR1 рецепторов как в острых, так и хронических патологических процессах в миокарде. Несмотря на значительный прогресс в понимании сигнальных механизмов и функции PAR1 рецепторов, необходимы дальнейшие исследования, чтобы ответить на вопрос могут ли PAR1 рецепторы стать мишенью фармакологических воздействий для лечения инфаркта, ремоделирования миокарда и сердечной недостаточности.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7)

Литература

1. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I. et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation // Cell. — 1991. — № 64. — P. 1057–1068.
2. Macfarlane S.R., Seatter M.J., Kanke T. et al. Proteinase-activated receptors // Pharmacol. Rev. — 2001. — Vol. 53, № 2. — P. 245–282.
3. Steinberg S.F. The cardiovascular actions of protease-activated receptors // Mol Pharmacol. — 2005. — Vol. 67, № 1. — P. 2–11.
4. Струкова С.М., Дугина Т.Н., Чистов И.В. и др. Тромбин — регулятор репаративных процессов при заживлении ран // Биоорганическая химия. — 1998. — Т. 24, № 4. — С. 288–292.
5. Soh U.J., Doros M.R., Chen B. et al. Signal transduction by protease-activated receptors // Br. J. Pharmacol. — 2010. — Vol. 160, № 2. — P. 191–203.
6. Дугина Т.Н., Куселёва Е.М., Чистов И.В. и др. Рецепторы семейства PAR — связывающее звено процессов свертывания крови и воспаления // Биохимия. — 2002. — Т. 67, № 1. — С. 77–87.
7. Howell D.C.J., Johns R.H., Lasky J.A. et al. Absence of proteinase-activated receptor-1 signaling affords protection from bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis // Am. J. Pathol. — 2005. — № 166. — P. 1353–1365.
8. Chambers R.C., Dabbagh K., McAnulty R.J. et al. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1 // Biochem. J. — 1998. Vol. 333 (Pt 1). — P. 121–127.
9. Chambers R.C., Laurent G.J. Coagulation cascade proteases and tissue fibrosis // Biochem. Soc. Trans. — 2002. — № 30. — P. 194–200.
10. Fiorucci S., Antonelli E., Distrutti E. et al. Par1 antagonism protects against experimental liver fibrosis. Role

of proteinase receptors in stellate cell activation // *Hepatology*. — 2004. — Vol. 39. — P. 365–375.

11. Hewitson T.D., Martic M., Kelynack K.J. *et al.* Thrombin is a pro-fibrotic factor for rat renal fibroblasts in vitro // *Nephron. Exp. Nephrol.* — 2005. — Vol. 101. — P. 42–49.

12. Moshal K.S., Tyagi N., Henderson B. *et al.* Protease-activated receptor and endothelial-myocyte uncoupling in chronic heart failure // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2005. — № 288. — P. 2770–2777.

13. Moshal K.S., Tyagi N., Moss V. *et al.* Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human heart end stage failure // *J. Cell. Mol. Med.* — 2005. — № 9. — P. 704–713.

14. Pawlinski R., Tencati M., Hampton C.R. *et al.* Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy // *Circulation*. — 2007. — № 116. — P. 2298–2306.

15. Jaffre F., Friedman A.E., Hu Z. *et al.* Beta-adrenergic receptor stimulation transactivates protease-activated receptor 1 via mmp-13 in cardiac cells // *Circulation*. — 2012. — Vol. 125, № 24. — P. 2993–3003.

16. Sabri A., Short J., Guo J. *et al.* Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 91, № 6. — P. 532–539.

17. McManus D.D., Gore J., Yarzebski J. *et al.* Recent trends in the incidence, treatment, and outcomes of patients with STEMI and NSTEMI // *Am. J. Med.* — 2011. — Vol. 124, № 1. — P. 40–47.

18. Hellermann J.P., Goraya T.Y., Jacobsen S.J. *et al.* Incidence of heart failure after myocardial infarction: is it changing over time? // *Am. J. Epidemiol.* — 2003. — Vol. 157, № 12. — P. 1101–1107.

19. Roger V.L. The heart failure epidemic // *Int. J. Environ. Res. Public. Health*. — 2010. — Vol. 7, № 4. — P. 1807–1830.

20. Park D., McManus D., Darling C. *et al.* Recent trends in the characteristics and prognosis of patients hospitalized with acute heart failure // *Clin. Epidemiol.* — 2011. — № 3. — P. 295–303.

21. Torabi A., Cleland J.G., Khan N.K. *et al.* The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction // *Eur. Heart. J.* — 2008. — Vol. 29, № 7. — P. 859–870.

22. Bunch T.J., Hohnloser S.H., Gersh B.J. Mechanisms of sudden cardiac death in myocardial infarction survivors: insights from the randomized trials of implantable cardioverter-defibrillators // *Circulation*. — 2007. — Vol. 115, № 18. — P. 2451–2457.

23. Minicucci M.F., Azevedo P.S., Santos D.F. *et al.* Echocardiographic predictors of ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats. // *Arq. Bras. Cardiol.* — 2011. — Vol. 97, № 6. — P. 502–506.

24. Heymans S., Hirsch E., Anker S.D. *et al.* Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of

the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology // *Eur. J. Heart. Fail.* — 2009. — Vol. 11, № 2. P. 119–129.

25. Ishii H., Amano T., Matsubara T. *et al.* Pharmacological intervention for prevention of left ventricular remodeling and improving prognosis in myocardial infarction // *Circulation*. — 2008. — Vol. 118, № 25. — P. 2710–2718.

26. Erlich J.H., Boyle E.M. Jr, Labriola J. *et al.* Inhibition of the tissue factor-thrombin pathway limits infarct size after myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation // *Am. J. Pathol.* — 2000. — № 157. — P. 1849–1862.

27. Strande J.L., Hsu A., Su J. *et al.* SCH 79797 a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts // *Basic. Res. Cardiol.* — 2007. — № 102. — P. 350–358.

28. Pawlinski R., Tencati M., Hampton C.R. *et al.* Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy // *Circulation*. — 2007. — № 116. P. 2298–2306.

29. Strande J.L., Widlansky M.E., Tsopanoglou N.E. *et al.* Parstatin: a cryptic peptide involved in cardioprotection after ischaemia and reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* — 2009. — Vol. 83, № 2. — P. 325–334.

30. Routhu K.V., Tsopanoglou N.E., Strande J.L. Parstatin (1–26): the putative signal peptide of protease-activated receptor 1 confers potent protection from myocardial ischemia-reperfusion injury // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2010. — Vol. 332, № 3. — P. 898–905.

31. Dobaczewski M., Frangogiannis N.G. Chemokines and cardiac fibrosis // *Front. Biosci. (Schol Ed)*. — 2009. — Vol. 1. — P. 391–405.

32. Baum J., Duffy H.S. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* — 2011. Vol. 57, № 4. — P. 376–379.

33. Sun Y., Zhang J.Q., Zhang J. *et al.* Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. — 2000. — Vol. 135. — P. 316–323.

34. Antoniuk S., Pawlinski R., Mackman N. Protease-activated receptors and myocardial infarction // *IUBMB Life*. — 2011. — Vol. 63, № 6. — P. 383–389.

35. Strukova S.M. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues // *Biochemistry (Moscow)*. — 2001. — Vol. 66, № 1. — P. 8–18.

36. Chambers R.C., Dabbagh K., McAnulty R.J. *et al.* Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1 // *Biochem. J.* — 1998. — Vol. — 333(Pt 1). — P. 121–127.

37. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling // *Pharmacol. Ther.* — 2009. — Vol. 123, № 2. — P. 255–278.

38. Сонин Д.Л., Галагудза М.М., Сыренский А.В. и др. Кардио- и вазопротекция в профилактике и лечении хронической сердечной недостаточности. Часть I // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2009. — Т. 8, № 4, № 32). — С. 4–12.

39. Сонин Д.Л., Галагудза М.М., Сыренский А.В. и др. Кардио- и вазопротекция в профилактике и лечении

хроническо й сердечной недостаточности. Часть II // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2010. — Т. 9, № 1(33). — С. 4–12.

40. Matsubara L.S., Matsubara B.B., Okoshi M.P. *et al.* Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 2000. — Vol. — 279, № 4. — P. H1534–1539.

41. Kuwahara F., Kai H., Tokuda K. *et al.* Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats // Circulation. — 2002. — Vol. 106, № 1. — P. 130–135.

42. Tricoci P., Huang Z., Held C. *et al.* Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes // N. Engl. J. Med. — 2012. — Vol. 366, № 1. — P. 20–33.

43. O'Donoghue M.L., Bhatt D.L., Wiviott S.D. *et al.*; LANCELOT-ACS Investigators. Safety and tolerability of atopaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: the lessons from antagonizing the cellular effects of Thrombin-Acute Coronary Syndromes Trail // Circulation. — 2011. — Vol. 123, № 17. — P. 1843–1853.

44. Morrow D.A., Scirica B.M., Fox K.A. *et al.* TRA 2(o)P-TIMI 50 Investigators. Evaluation of a novel anti-platelet agent for secondary prevention in patients with a history of atherosclerotic disease: design and rationale for the Thrombin-Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischemic Events (TRA 2 degrees P)-TIMI 50 trial // Am. Heart. J. — 2009. — Vol. 158, № 3. — P. 335–341.

АУТОАНТИТЕЛА В ПАТОГЕНЕЗЕ ДИЛАТАЦИОННЫХ КАРДИОМИОПАТИЙ

*А.М. Киселев¹, Л.И. Реут¹, А.А. Ключина¹, Н.Л. Рогова³, Л.А. Бондаренко³,
А.А. Костарева¹, И.Б. Лобов², А.Б. Малашичева¹*

¹ ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

² Regeneron Pharmaceuticals, Inc, Нью-Йорк, США

³ ГБОУ высшего профессионального образования

«Кировская государственная медицинская академия» Минздрава РФ

Киселёв Артём Михайлович — научный сотрудник НИЛ клеточных механизмов атеросклероза ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, институт Молекулярной биологии и генетики; *Реут Любовь Игоревна* — аспирант ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Ключина Александра Анатольевна* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ молекулярной кардиологии института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Наталья Леонидовна Рогова* — научный сотрудник Коми филиала ГБОУ высшего профессионального образования «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава РФ; *Любовь Анатольевна Бондаренко* — научный сотрудник Коми филиала ГБОУ высшего профессионального образования «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава РФ; *Костарева Анна Александровна* — директор института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Лобов Иван Борисович* — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Regeneron Pharmaceuticals, Inc, Нью-Йорк, США; *Малашичева Анна Борисовна* — кандидат биологических наук, заведующая НИЛ молекулярной кардиологии института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, институт Молекулярной биологии и генетики, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: malashicheva_ab@almazovcentre.ru (Малашичева Анна Борисовна).

Резюме

Кардиомиопатии — поражения миокарда некоронарогенной и невоспалительной природы. Прогноза при кардиомиопатиях крайне неблагоприятен: сердечная недостаточность неуклонно прогрессирует, велика вероятность аритмических, тромбоэмболических осложнений и внезапной смерти. Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) — заболевание миокарда, характеризующееся развитием дилатации полостей сердца, с возникновением систолической дисфункции, но без увеличения толщины стенок. ДКМП — это третья по частоте причина сердечной недостаточности. После диагностики дилатационной кардиомиопатии 5-летняя выживаемость составляет 30 %.

Под действием экзогенных факторов уменьшается количество полноценно функционирующих кардиомиоцитов, что приводит к расширению камер сердца и нарушению сократительной функции миокарда. Была предложена аутоиммунная теория ДКМП, которая подтверждается обнаружением у 25–30 % больных ДКМП и их бессимптомных родственников циркулирующих антител к миокарду. Одна из ключевых ролей в развитии кардиомиопатии придается антителам к адренорецепторам миокарда. Помимо антител вызывающих или способствующих развитию ДКМП, так же возможно выработка аутоантител, которые могут выполнять защитную функцию, замедляя и препятствуя развитию ДКМП. Однако наличие подобных антител не изучено. В обзоре обсуждается роль аутоантител в патогенезе ДКМП и терапевтическое значение обнаружения аутоантител у пациентов с ДКМП.

Ключевые слова: кардиомиопатии, аутоантитела.

AUTOANTIBODIES IN PATHOGENESIS OF DILATED CARDIOMYOPATHY

*A.M. Kiselev¹, L.I. Reut¹, A.A. Klushina¹, N.L. Rogova, L.A. Bondarenko,
A.A., Kostareva¹, I.B. Lobov², A.B. Malashicheva¹*

¹ *Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia*

² *Regeneron Pharmaceuticals, Inc, New York, USA*

³ *State Medical Academy, Syktyvkar, Russia*

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: malashicheva_ab@almazovcentre.ru (*Anna B. Malashicheva* — MhD, head of molecular cardiology laboratory).

Abstract

Cardiomyopathies are noncoronary and noninflammatory myocardial diseases. Prognosis for cardiomyopathy is extremely poor: cardiac failure, arrhythmia, thromboembolism and sudden death. Dilated cardiomyopathy (DCM) — is characterized by the development of heart dilatation with the occurrence of systolic dysfunction, but without increasing the wall thickness. DCM is the third most common cause of heart failure. After the diagnosis of dilated cardiomyopathy, 5-year survival rate is about 30 %.

Autoimmune theory was proposed for pathogenesis DCM pathogenesis, which is confirmed by the finding of circulating antibodies to the myocardium in 25–30 % of patients with dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives. Myocardial adrenoreceptor autoantibodies are supposed to play one of the key roles in the development of DCM. Some other autoantibodies to myocardial proteins are detected in DCM patients. The review discusses the role of autoantibodies in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy and the therapeutic value of autoantibodies detection in DCN patients.

Key words: cardiomyopathies, autoantibodies.

Статья поступила в редакцию 29.12.12, принята к печати 12.01.13.

Кардиомиопатии — поражения миокарда не-коронарогенной и невоспалительной природы, при которых происходит структурное и функциональное изменение сердечной мышцы, при этом отсутствует патология коронарных артерий, артериальная гипертензия и поражение клапанного аппарата. По происхождению кардиомиопатии подразделяются на первичные (идиопатические) или кардиомиопатии без установленной причины и вторичные с известной этиологией [1].

Дилатационная КМП является болезнью сердца неишемической природы, характеризуется дилатацией и нарушением сокращения левого или обоих желудочков. ДКМП является главной причиной сердечной недостаточности в младшей возрастной группе с заболеваемостью 5–7,5 случая на 100 тыс. населения в год. У мужчин данное заболевание возникает в 2–3 раза чаще. Также данное заболевание может служить причиной хронической сердечной недостаточности в 30 % случаев [2]. Некоторое время назад была предпринята попытка определить и классифицировать эту болезнь на основании патофизиологических, этиологических и патогене-

тических данных [1]. Согласно данной классификации причинами ДКМП могут быть следующие: идиопатические, семейно/генетические [3], вирусные и/или иммунные, алкогольно/токсические [4] или другие факторы, ассоциированные с прочими сердечно сосудистыми заболеваниями при которых степень повреждения миокарда не объясняется ишемическим повреждением.

В большинстве случаев этиология ДКМП неизвестна, однако в развитии первичной ДКМП большое внимание уделяется семейным и генетическим факторам, перенесённому вирусному миокардиту, иммунологическим нарушениям.

Представление об аутоиммунном патогенезе ДКМП в значительной степени формируется из вирусной теории этиологии этого заболевания и получило довольно широкое признание [5, 6]. Некоторые авторы предполагают, что миокардиты и ДКМП могут быть фазами одного заболевания, а механизмы, лежащие в основе причинно-следственных отношений, в основном не известны [7, 8]. Вирусные миокардиты могут переходить в ДКМП даже в отсутствие вирусной персистенции

в миокарде при помощи активации аутоиммунного каскада, который включает гуморальный и клеточный ответы [9]. У пациентов с идиопатической систолической дисфункцией левого желудочка в эндомикардиальных биопсиях часто встречаются вирусные геномы и множественные вирусные инфекции миокарда [10, 11].

При вирусном миокардите, после первоначальной острой активации иммунной системы заболевание может прогрессировать к хроническому аутоиммунному повреждению, которое через некоторое время и вызывает дилатацию [12]. Такое течение заболевания может быть связано со следующими причинами:

1) с активацией аутоантител, направленных против различных белков сарколеммы миоцитов или их мембраны [13, 14].

2) с эффектом накопления вирусных частиц, а также текущих воспалительных процессов миокарда [15]. В пользу данного наблюдения свидетельствует тот факт, что пациенты с ДКМП часто страдают изменениями клеточного и гуморального иммунитета [13, 16–18]. У значительного числа пациентов с ДКМП были найдены перекрестно реагирующие антитела и/или антитела к различным аутоантигенам сердечной мышцы, включающие митохондриальные белки (транслокатор нуклеотидов аденина, липоамид, пируват дегидрогеназа [19, 20], белки сарколеммы (актин, ламин, миозин, тропонин) [21, 22–25] и мембранные белки [26–28]. Некоторые из этих антител могут нанести прямое или косвенное повреждение ткани миокарда. Кроме того, было показано, что для того, чтобы иметь широкое влияние на индивидуальную восприимчивость к аутоиммунным реакциям, и, следовательно, фенотипическое выражение заболевания необходима генетическая предрасположенность пациента [29, 30].

Таким образом, поражение миокарда при вирусной инфекции определяется не столько непосредственным цитопатическим действием возбудителя, сколько вызываемыми им аутоиммунными реакциями. Об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что воспалительная инфильтрация и выраженное изменение мышечных волокон сердца животных, зараженных вирусом Коксаки, развиваются лишь к 8–10-му дню после заражения, когда возбудитель исчезает из миокарда [31, 32]. При этом глубина поражения сердечной мышцы животных в ближайшие и отдаленные сроки после заражения в значительной мере определяется состоянием их иммунной системы.

На значимость органоспецифических аутоиммунных механизмов при вирусном миокардите указывает также экспрессия на мембране кардиомиоцитов адгезивных молекул [33], и обнаружение у таких больных значительно чаще, чем у здоровых

и пациентов с другими сердечно-сосудистыми заболеваниями, циркулирующих антител, более или менее специфичных по отношению к различным антигенам миокарда. Так же создана экспериментальная модель аутоиммунного миокардита у генетически предрасположенных мышей, вызываемая иммунизацией миозином, выделенным из сердца [34], и показана возможность ее переноса здоровым животным путем введения им Т-лимфоцитов из крови больных мышей [35]. Результаты этих исследований дают основание рассматривать острый миокардит как аутоиммунное заболевание, которое в ряде случаев вызывается вирусной инфекцией. Воспроизведение миокардита после введения миозина свидетельствует о возможности инициирования аутоиммунного поражения миокарда у генетически предрасположенных особей неинфекционными провоспалительными стимулами.

Аутоиммунная теория подтверждается обнаружением у больных ДКМП и их бессимптомных родственников циркулирующих антител к миокарду [22]. Следует отметить, что такие антитела часто присутствовали у тех родственников больных ДКМП, у которых в дальнейшем заболевание прогрессировало. Как показало дальнейшее наблюдение, при развитии выраженных клинических признаков ДКМП антитела к миокарду в большинстве случаев уже не определялись. Возможность использования антител к миокарду в качестве ранних маркеров заболевания остается предметом для дискуссии.

У пациентов с дилатационной кардиомиопатией диагностируют циркулирующие в сосудистом русле антитела к адренорецепторам, мускариновым рецепторам, ламинину, виментину, десмину, кератину, актину, тяжелым цепям миозина и митохондриальным белкам. Одна из ключевых ролей в развитии кардиомиопатии приписывается антителам к адренорецепторам миокарда [26, 36]. Они обнаруживаются у 30–40 % больных ДКМП.

Присутствие антител к ткани сердца выявляется у пациентов не только с диагнозом миокардит, дилатационная кардиомиопатия, но и при ишемической болезни сердца и других болезнях сердца. Антитела к сердечной мускулатуре могут обнаруживаться также и после операций на сердце (трансплантация, коронарное шунтирование).

Таким образом, характеристика спектра аутоантител у пациентов, страдающих ДКМП, а также изолирование и характеристика В-клеток из периферической крови могут иметь важное диагностическое и прогностическое значение. Так же возможно наличие ряда аутоантител у пациентов, страдающих ДКМП, которые могут иметь терапевтическое значение.

Работа выполнена при поддержке гранта в форме субсидий для юридических лиц на поддержку научных исследований в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», соглашение № 8655 от 17.09.2012 г. и № 8811 от 14.11.2012 г.

Литература

1. Richardson P.J. Assessment of myocardial damage in dilated cardiomyopathy // *Eur. Heart J.* — 1996. — Vol. 17, № 4. — P. 489–490.
2. Rosamond W., Flegal K., Friday G., Furie K. et al. Heart disease and stroke statistics — 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee // *Circulation.* — 2007. — Vol. 115, № 5. — P. 169–171.
3. Morita H., Seidman J., Seidman C.E. Genetic causes of human heart failure // *J. Clin. Invest.* — 2005. — Vol. 115, № 3. — P. 518–526.
4. Fabrizio L., Regan T.J. Alcoholic cardiomyopathy // *Cardiovasc. Drugs Ther.* — 1994. — Vol. 8, № 1. — P. 89–94.
5. Cetta F., Michels V.V. The autoimmune basis of dilated cardiomyopathy // *Ann. Med.* — 1995. — Vol. 27, № 2. — P. 169–173.
6. Keeling P.J., Goldman J.H., Slade A.K., Elliott P.M. et al. Prognosis of idiopathic dilated cardiomyopathy // *J. Card. Fail.* — 1995. — Vol. 1, № 5. P. 337–345.
7. Calabrese F., Wal A.C. van der, Levi M. Infection and inflammation in the cardiovascular system // *Cardiovasc. Res.* — 2003. — Vol. 60, № 1. — P. 1–4.
8. Figulla H.R. Transformation of myocarditis and inflammatory cardiomyopathy to idiopathic dilated cardiomyopathy: facts and fiction // *Med. Microbiol. Immunol.* — 2004. — Vol. 193, № 2–3. — P. 61–64.
9. Hjalmarson P. Who are the enemies? Inflammation and autoimmune mechanisms // *European Heart Journal Supplements.* — 2002. — Vol. 4. — P. 627–632.
10. Calabrese F., Thiene G. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects // *Cardiovasc. Res.* — 2003. — Vol. 60, № 1. — P. 11–25.
11. Kühl U., Pauschinger M., Noutsias M., Seeberg B. et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with “idiopathic” left ventricular dysfunction // *Circulation.* — 2005. — Vol. 111, № 7. — P. 887–893.
12. MacLellan W.R., Lusis A.J. Dilated cardiomyopathy: learning to live with yourself // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9, № 12. — P. 1455–1456.
13. Freedman N.J., Lefkowitz R.J. Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 113, № 10. — P. 1379–1382.
14. Jahns R., Boivin V., Lohse M.J. beta(1)-Adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy // *Trends Cardiovasc. Med.* — 2006. — Vol. 16, № 1. — P. 20–24.
15. Kühl U., Pauschinger M., Seeberg B., Lassner D. et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction // *Circulation.* — 2005. — Vol. 112, № 13. — P. 1965–1970.
16. Limas C.J. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy: a pathogenetic role? // *Circulation.* — 1997. — Vol. 95, № 8. — P. 1979–1980.
17. Luppi P., Rudert W.A., Zanone M.M., Stassi G. et al. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen-driven autoimmune disease // *Circulation.* — 1998. — Vol. 98, № 8. — P. 777–785.
18. Mahrholdt H., Wagner A., Deluigi C.C., Kispert E. et al. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis // *Circulation.* — 2006. — Vol. 114, № 15. — P. 1581–1590.
19. Schultheiss H.P., Kühl U., Janda I., Melzner B. et al. Antibody-mediated enhancement of calcium permeability in cardiac myocytes // *J. Exp. Med.* — 1988. — Vol. 168, № 6. — P. 2105–2119.
20. Pohlner K., Portig I., Pankuweit S., Lottspeich F. et al. Identification of mitochondrial antigens recognized by antibodies in sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing // *Am. J. Cardiol.* — 1997. — Vol. 80, № 8. — P. 1040–1045.
21. Neumann D.A., Lynne Burek C., Baughman K.L. et al. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 1990. — Vol. 16, № 6. — P. 839–846.
22. Caforio A.L., Mahon N.J., Tona F., McKenna W.J. et al. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance // *Eur. J. Heart Fail.* — 2002. — Vol. 4, № 4. — P. 411–417.
23. Okazaki T., Tanaka Y., Nishio R., Mitsuiye T. et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9, № 12. — P. 1477–1483.
24. Göser S., Andrassy M., Buss S.J., Leuschner F. et al. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium // *Circulation.* — 2006. — Vol. 114, № 16. — P. 1693–1702.
25. Li Y., Heuser J.S., Cunningham L.C., Kossanke S.D. et al. Mimicry and antibody-mediated cell signaling in autoimmune myocarditis // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177, № 11. — P. 8234–8240.
26. Magnusson Y., Wallukat G., Waagstein F., Hjalmarson A. et al. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect // *Circulation.* — 1994. — Vol. 89, № 6. — P. 2760–2767.
27. Jahns R., Boivin V., Siegmund C., Inselmann G. et al. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure // *Circulation.* — 1999. — Vol. 99, № 5. — P. 649–654.
28. Fu L.X., Magnusson Y., Bergh C.H., Liljeqvist J.A. et al. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy // *J. Clin. Invest.* — 1993. — Vol. 91, № 5. — P. 1964–1968.

29. *Limas C.J., Iakovis P., Anyfantakis A., Kroupis C. et al.* Familial clustering of autoimmune diseases in patients with dilated cardiomyopathy // *Am. J. Cardiol.* — 2004. — Vol. 93, № 9. — P. 1189–1191.
30. *Caforio A.L., Mahon N.G., Baig M.K., Tona F. et al.* Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives // *Circulation.* — 2007. — Vol. 115, № 1. — P. 76–83.
31. *Guthrie M., Lodge P.A., Huber S.A.* Cardiac injury in myocarditis induced by Coxsackievirus group B, type 3 in Balb/c mice is mediated by Lyt 2 + cytolytic lymphocytes // *Cell. Immunol.* — 1984. — Vol. 88, № 2. — P. 558–567.
32. *Fairweather D., Rose N.R.* Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity // *Methods.* — 2007. — Vol. 41, № 1. — P. 118–122.
33. *Toyozaki T., Saito T., Takano H., Yorimitsu K. et al.* Expression of intercellular adhesion molecule-1 on cardiac myocytes for myocarditis before and during immunosuppressive therapy // *Am. J. Cardiol.* — 1993. — Vol. 72, № 5. — P. 441–444.
34. *Neu N., Rose N.R., Beisel K.W., Herskowitz A. et al.* Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice // *J. Immunol.* — 1987. — Vol. 139, № 11. — P. 3630–3636.
35. *Smith S.C., Allen P.M.* Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease // *J. Immunol.* — 1991. — Vol. 147, № 7. — P. 2141–2147.
36. *Wallukat G., Müller J., Podlowski S., Nissen E. et al.* Agonist-like beta-adrenoceptor antibodies in heart failure // *Am. J. Cardiol.* — 1999. — Vol. 83, № 12A. — P. 75–79.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КАРДИОМИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ИЗ ТКАНИ МИОКАРДА

А.А. Худяков, Д.И. Курапеев, А.А. Костарева, А.Б. Малашичева

*ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия*

Худяков Александр Александрович — младший научный сотрудник, НИЛ Молекулярной кардиологии; Курапеев Дмитрий Ильич — кандидат медицинских наук, заведующий НИЛ биопротезирования и кардиопротекции; Костарева Анна Александровна — кандидат медицинских наук, директор института Молекулярной биологии и генетики; Малашичева Анна Борисовна — кандидат биологических наук, заведующая НИЛ Молекулярной кардиологии.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, 197341. E-mail: amalashicheva@gmail.com (Малашичева Анна Борисовна).

Резюме

В основе патогенеза многих заболеваний сердца лежит изменение функций клеток, составляющих сердечно-сосудистую систему, поэтому для изучения таких патологий необходимо существование удобной и надёжной системы, на которой было бы возможно моделирование того или иного заболевания. В настоящее время существует множество протоколов получения кардиомиоцитов и кардиомиоцит-подобных клеток, из которых исследователю необходимо выбрать подходящий и работающий в условиях данной лаборатории вариант. Целью данной работы являлась разработка метода получения культуры кардиомиоцитов для дальнейшего применения в исследованиях, посвящённых патогенезу некоторых врождённых пороков сердца. В результате были получены клетки-предшественники кардиомиоцитов человека, а также показана возможность их дифференцировки в кардиомиоцит-подобные клетки.

Ключевые слова: культура кардиомиоцитов, клетки-предшественники, дифференцировка.

ISOLATION OF HUMAN CARDIOMYOCYTE PROGENITOR CELLS FROM MYOCARDIAL TISSUE

A.A. Khudiakov, D.I. Kurapev, A.A. Kostareva, A.B. Malashicheva

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: amalashicheva@gmail.com (Anna B. Malashicheva — PhD., head of the molecular cardiology laboratory).

Abstract

The key mechanism of many heart diseases is the functional change of the cells that make up the cardiovascular system, so the study of such pathologies requires the existence of a convenient and reliable cellular system suitable for modeling of a disease. Currently, there are many protocols for obtaining cardiomyocytes and cardiomyocyte-like cells, from which a researcher needs to choose the most appropriate and working one in the conditions of a given laboratory. The aim of this study was to develop a method of obtaining cardiomyocytes culture in vitro for further application in studies of heart diseases. We have set up a working protocol for obtaining cardiomyocyte-like cells from human adult heart. Precursor cells were obtained, characterized and shown to be able to differentiate to cardiomyocyte-like cells with the expression of some markers for functional cardiomyocytes.

Key words: cardiomyocytes culture, progenitor cells, differentiation.

Статья поступила в редакцию 01.09.2012, принята к печати 10.10.2012.

Потребность в получении культуры кардиомиоцитов человека *in vitro* связана с возможностью потенциального использования этих клеток как в научных, так и в терапевтических целях. Такие культуры смогут стать источником кардиомиоцитов для замещения отмершей ткани в очаге повреждения, а также являются моделью изучения нормального и патологического развития сердца на клеточном уровне.

На сегодняшний день наиболее удобной стратегией получения культуры кардиомиоцитов и кардиомиоцит-подобных клеток является дифференцировка эмбриональных стволовых клеток. Эмбриональные стволовые клетки обладают способностью к дифференцировке во все типы клеток — плюрипотентностью, что даёт широкие возможности для изучения процессов раннего развития. Однако поскольку эмбриональные стволовые клетки можно получить только из эмбрионов до имплантации, исследование и возможная пересадка клеток от конкретного пациента исключены.

В настоящее время существование резидентных стволовых клеток сердца (клеток-предшественников кардиомиоцитов, гладкомышечных и эндотелиальных клеток) не вызывает сомнений [1]. Были охарактеризованы различные популяции этих клеток [2], показана возможность их дифференцировки в кардиомиоциты *in vivo*.

Опубликовано несколько методов получения культуры КПКМЦ из миокарда путём его диссоциации и последующей дифференцировки в кардиомиоцитном направлении при помощи химических агентов. Мы выбрали один из них [3], основанный на использовании постоперационного материала. Также данный протокол не требует внесения генетических конструкций, что сильно снижает стоимость его осуществления.

Материалы и методы

Выделение КПКМЦ из ткани миокарда человека.

Полученный в ходе операции фрагмент миокарда содержали на льду в среде DMEM не более трёх часов. Ткань миокарда отмывали от остаточной крови, измельчали и подвергали ферментативной обработке коллагеназой А (2 часа при 37°C). Затем ткань с раствором коллагеназы пропускали через нейлоновый стрейнер с диаметром пор 40 мкм. Полученную клеточную суспензию разводили питательной средой (22.5 % EGM-2, 67.5 % M199, 10 % FBS, 1x аминокислот MEM, 1x гентамицин) до концентрации 5 клеток / мл и переносили в 96-луночный планшет (по 100 мкл в лунку). Лунки планшета предварительно покрывали 0.1 % желатином. 96-луночный планшет помещали в

инкубатор (37°C, 5 % CO₂). Замена питательной среды осуществлялась каждые три дня. Через 3–4 недели появлялись клоны клеток. При достижении клетками 80–90 % конфлюэнтности клоны клеток размножали для дальнейшего анализа. *Индукция дифференцировки.*

Клоны клеток-предшественников растили до 80 % конфлюэнтности на 60 мм чашках Петри, затем высевали в плотности 104 клеток на см². При достижении клетками 80 % конфлюэнтности среду заменяли на дифференцировочную (47 % IMDM, 47 % Ham's F12, 2 % лошадиной сыворотки, 1x аминокислот MEM, 1x инсулин-трансферрин-селен, 1x гентамицин). Через 6–8 часов среду заменяли на дифференцировочную, содержащую 5-азациитидин (5 мМ). В течение следующих двух дней добавляли 5-азациитидин прямо в среду, на четвертый день среду обновляли. На шестой день с момента начала дифференцировки к среде добавляли аскорбиновую кислоту (10–4М) и трансформирующий фактор роста TGF-β1 (1 нг мл⁻¹). Начиная с этого момента, добавляли аскорбиновую кислоту раз в два дня и TGF-β1 дважды в неделю. Среда обновлялась каждые 2–3 дня. Продолжительность дифференцировки составляла 24 дня.

Анализ экспрессии специфических маркеров.

Для анализа специфических маркеров использовали метод обратной ПЦР, либо метод иммуноцитохимии. Фиксированная культура клеток промывалась два раза PBS и обрабатывалась 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение одного часа. Затем следовали обработка первичными антителами к белкам саркомера — альфа-актинину и тропонину I. Далее культуру клеток в течение 45 мин обрабатывали вторичными антителами, содержащими флуорохром (Alexa Fluor). Регистрацию флуоресценции проводили под флуоресцентным микроскопом.

Результаты

Из фрагмента миокарда человека после ферментативной обработки ткани выделили клетки, которые в клональном посеве растили от 3 до 6 недель. Затем были отобраны наиболее активно делящиеся клоны и охарактеризованы. Всего было проанализировано около 20 клонов. На стволовую природу этих клеток указывал тот факт, что они обладали высокой способностью к делению — выдерживали многократный пересев и клональный посев; также эти клетки были позитивными по маркеру c-kit, характерному для стволовых клеток (данные не представлены).

Для подтверждения того, что полученные из миокарда клетки являлись предшественниками

кардиомиоцитов, клоны проверили на способность к дифференцировке под воздействием специфических индукторов. При индукции дифференцировки клетки изменяли свою морфологию и замедляли рост. Для оценки эффективности дифференцировки в кардиомиоцитарном направлении полученные в результате дифференцировки клетки были охарактеризованы на специфические маркеры кардиомиоцитов методами иммуоцитохимии и обратной ПЦР. На рис. 1. представлен анализ типичного клона клеток-предшественников и видно, что при дифференцировке этих клеток специфическими индукторами возрастает экспрессия сердечного актина (ACTC1), тропонина T, Nkx2.5, Mef2C. На рис. 2 видно, что при дифференцировке клеток предшественников иммуоцитохимически можно выявить экспрессию саркомерных белков кардиомиоцитов альфа-актинина и тропонина I.

Полученные данные свидетельствуют о том, что выделенные из миокарда взрослого человека клетки являются клетками-предшественниками, способными к дифференцировке в кардиомиоцитарном направлении.

Обсуждение

Из фрагмента миокарда человека мы выделили клетки, способные к размножению в клональном посеве, а также к дифференцировке под воздействием специфических индукторов. Кроме того, в этих клетках был выявлен маркер стволовых клеток c-kit. Эти данные указывают на то, что выделенные клетки могут являться предшественниками, или стволовыми клетками. Мы показали способность таких клеток к дифференцировке в кардиомиоцитарном направлении. При индукции дифференци-

ровки специфическими индукторами в течение 24 дней в изучаемых клетках выявляли повышение экспрессии специфических для кардиомиоцитов маркеров: сердечного актина (ACTC1), тропонина T, Nkx2.5, Mef2C, а также выявляли саркомерные белки α -актинин и тропонин I. Таким образом, можно говорить о получении из фрагмента миокарда взрослого человека культуры клеток-предшественников, способных к дифференцировке в кардиомиоцитарном направлении.

Однако необходимо отметить, что использованный нами метод имеет ряд существенных ограничений. Во-первых, получающиеся в результате диссоциации миокарда клоны чрезвычайно разнородны по своей способности к дифференцировке, и необходим подробный анализ каждого клона, так как в части клонов, несмотря на видимые морфологические изменения при индукции дифференцировки, не удалось выявить маркеры кардиомиоцитов. Во-вторых, даже при успешной дифференцировке уровень исследованных маркеров в большинстве клонов повышался незначительно, а повышения экспрессии GATA-4 и MEF2C не наблюдали ни в одном из исследованных клонов. Кроме того, из саркомерных белков удалось выявить лишь α -актинин и тропонин I, и не удалось выявить МНС и десмин. По-видимому, при использовании предложенного метода из ткани миокарда могут выделяться различные типы клеток: пролиферативно активные фибробласты, различные популяции клеток-предшественников, кардиомиоциты. В связи с тем, что мы не наблюдали ряда кардиомиоцитарных маркеров при индукции дифференцировки полученных клеток, мы пола-

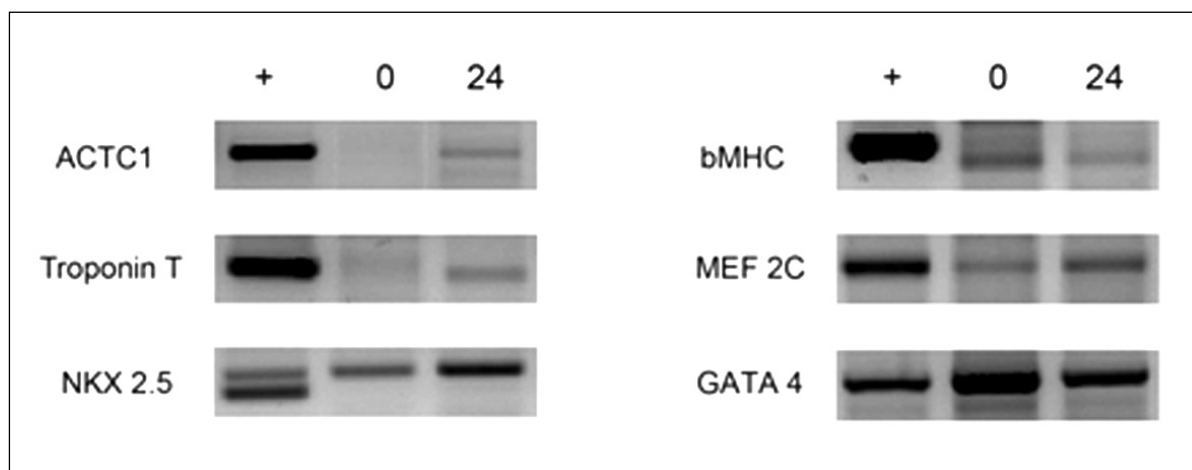


Рисунок 1. Анализ экспрессии маркеров с помощью метода ПЦР после обратной транскрипции. Знаком “+” отмечен положительный контроль (тотальная РНК ткани миокарда), знаками “0” и “24” — экспрессия в недифференцированных (день дифференцировки 0) и дифференцированных (день дифференцировки 24) клетках соответственно

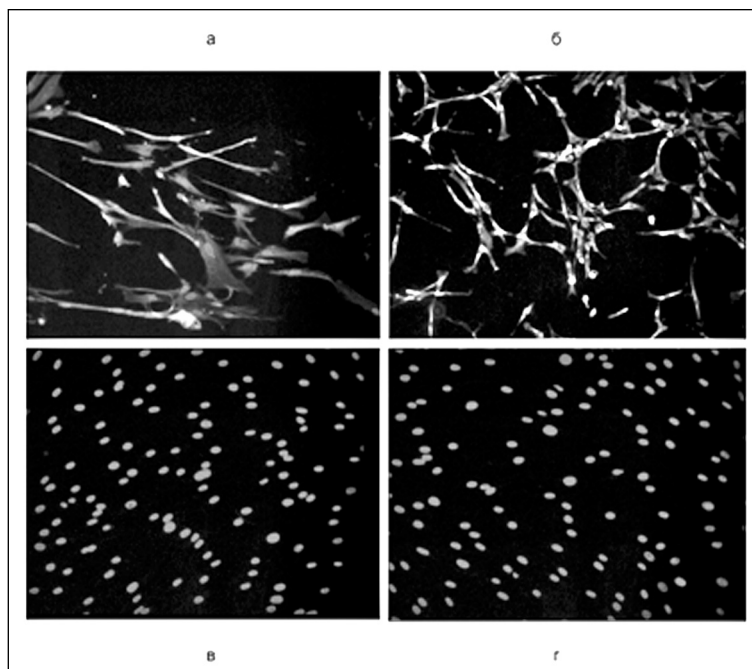


Рисунок 2. Иммунофлюоресцентная окраска клеток-предшественников.

- а** — клетки-предшественники, окрашенные антителами к альфа-актину (24 день дифференцировки),
б — клетки-предшественники, окрашенные антителами к тропонину I (24 день дифференцировки),
в — недифференцированные клетки-предшественники, окрашенные антителами к альфа-актину,
г — недифференцированные клетки-предшественники, окрашенные антителами к тропонину I.

Ядра клеток окрашены красителем DAPI. Ув. 200х

гаем, что в результате дифференцировки клетки становятся лишь кардиомицит-подобными. Кроме того, возможно также, что использованная схема индукции дифференцировки может иметь невысокую эффективность, и необходимы дополнительные индукторы дифференцировки для получения более функциональных кардиомиоцитов.

Таким образом, при применении использованного метода необходим тщательный анализ большого количества клонов на предмет их способности к дифференцировке в кардиомиоцитном направлении, и кроме того следует учитывать, что способность описанных в нашей работе клеток-предшественников к дифференцировке является ограниченной — не все маркеры кардиомиоцитов выявляются при индукции дифференцировки при использовании данного метода. Тем не менее, возможно, что в некоторых исследованиях патогенеза сердечных заболеваний использование данных клеток окажется информативным.

Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации (государственные контракты № 14.740.11.06; № К-32-НИР/111-3; № 11.519.11.2018).

Литература

1. Bearzi C., Rota M., Hosoda T. et al. Human cardiac stem cells // PNAS. — 2007. — Vol. 104, № 5. — P. 14068–14073.
2. Bollini S., Smart N., Riley P. Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. — 2011. — Vol. 50. — P. 296–303.
3. Smits A., van Vliet P., Metz C. et al. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology // Nat Protoc. — 2009. — Vol. 4, № 2. — P. 232–243.

ЛЕЧЕНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНЫМ ИНСУЛИНОМ И СЕРОТОНИНОМ ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ К ГОРМОНАМ В МОЗГЕ КРЫС С ДЛИТЕЛЬНЫМ НЕОНАТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ

А.О. Шпаков, И.В. Мойсеев, О.В. Чистякова, К.В. Деркач, И.Б. Сухов, В.М. Бондарева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Александр Олегович Шпаков — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии ФГБУН «ИЭФБ им. И.М. Сеченова» РАН; *Ирина Викторовна Мойсеев* — аспирант лаборатории молекулярной эндокринологии ФГБУН «ИЭФБ им. И.М. Сеченова» РАН; *Оксана Викторовна Чистякова* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии ФГБУН «ИЭФБ им. И.М. Сеченова» РАН; *Кирилла Викторовна Деркач* — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии ФГБУН «ИЭФБ им. И.М. Сеченова» РАН; *Иван Борисович Сухов* — аспирант лаборатории молекулярной эндокринологии ФГБУН «ИЭФБ им. И.М. Сеченова» РАН; *Вера Михайловна Бондарева* — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии ФГБУН «ИЭФБ им. И.М. Сеченова» РАН.

Контактная информация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, пр. Тореза, д. 44, Санкт-Петербург, Россия, 194223. Раб. тел. (812)552–31–17; факс (812)552–30–12. E-mail: alex_shpakov@list.ru (Шпаков Александр Олегович).

Резюме

Одной из причин развития нейродегенеративных заболеваний при сахарном диабете (СД) являются нарушения в аденилатцикласной сигнальной системе мозга, выраженность которых положительно коррелирует с тяжестью этих заболеваний. Изучение активности аденилатцикласной системы может быть использовано для мониторинга осложнений СД и оценки эффективности их лечения. Целью работы было изучение влияния интраназальных инсулина (ИИ) и серотонина (ИС) на активность аденилатциклазы (АЦ) и ее регуляцию гормонами в мозге крыс с неонатальной моделью СД 2-го типа, который вызывали введением крысам стрептозотоцина (80 мг/кг). Лечение животных интраназальными гормонами начинали в возрасте 4 месяцев и проводили в течение семи недель (суточные дозы 0.48 IU инсулина или 20 мкг серотонина на крысу). Функциональную активность АЦ изучали в синапсомембранных фракциях, выделенных из мозга шестимесячных крыс. При СД были значительно снижены стимулирующие АЦ эффекты агонистов адренергических рецепторов и релаксина и ингибирующие АЦ эффекты биогенных аминов и соматостатина. Лечение интраназальными гормонами диабетических животных восстанавливало чувствительность АЦ к гормонам, причем ИИ был эффективнее ИС. В наибольшей степени восстанавливались ингибирующие АЦ эффекты агонистов серотониновых рецепторов и стимулирующий АЦ эффект релаксина. Таким образом, ИИ и ИС восстанавливали функции гормоночувствительной АЦ системы мозга, нарушенные при неонатальном СД, что указывает на ключевую роль этих гормонов в развитии нейродегенеративных заболеваний и перспективность их применения для лечения осложнений СД.

Ключевые слова: аденилатциклаза, диабет, инсулин, мозг, серотонин.

TREATMENT WITH INTRANASAL INSULIN AND SEROTONIN RESTORES THE SENSITIVITY OF ADENYLATE CYCLASE TO HORMONE IN THE BRAIN OF RATS WITH LONG-TERM NEONATAL DIABETES MELLITUS

A.O. Shpakov, I.V. Moiseyuk, O.V. Chistyakova, K.V. Derkach, I.B. Sukhov, V.M. Bondareva

*I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
Saint-Petersburg, Russia*

Corresponding author: Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 44 Thorez av., Saint-Petersburg, Russia, 194223. Phone +7 (812) 552–31–17; fax +7 (812) 552–30–12; E-mail: alex_shpakov@list.ru (Alexander O. Shpakov — Sc. D., Head of Laboratory of Molecular Endocrinology, I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry).

Abstract

Background. One of the causes of neurodegenerative diseases in diabetes mellitus (DM) are abnormalities of the brain adenylyl cyclase signaling system, the severity of which are positively correlated with the severity of the diseases. The study of activity of the adenylyl cyclase system can be used to monitor the DM complications and to evaluate the efficiency of their treatment. **Objective.** The aim of the work was to study the effect of intranasal insulin (II) and serotonin (IS) on adenylyl cyclase (AC) activity and its regulation by hormones in the brain of rats with the neonatal model of type 2 DM. **Design and methods.** DM is induced by the treatment of newborn rats with streptozotocin (80 mg/kg). Treatment of animals with intranasal hormones starts at the age of 4 months and was continued for seven weeks (daily doses: 0.48 IU of insulin or 20 mg of serotonin per rat). The functional activity of AC was studied in synaptosomal membranes isolated from the brain of six-month rats. **Results.** AC stimulating effects of adrenergic receptor agonists and relaxin and AC inhibitory effects of biogenic amines and somatostatin were significantly reduced in DM. Treatment of diabetic animals with intranasal hormones restored the sensitivity of AC to hormones, and II was more effective than IS. AC inhibitory effects of serotonin receptor agonists and AC stimulating effect of relaxin were restored to the greatest extent. **Conclusion.** Thus, II and IS improved the functions of the brain hormone-sensitive AC system impaired in neonatal DM, indicating the key role of these hormones in the development of neurodegenerative diseases and prospects of their use for the treatment of DM complications.

Key words: adenylyl cyclase, diabetes, insulin, brain, serotonin.

Статья поступила в редакцию 01.10.2012, принята к печати 15.11.2012.

Введение

Уже на ранних этапах развития сахарного диабета (СД) в мозге выявляются нарушения функциональной активности гормональных сигнальных систем, в частности аденилатциклазной (АЦ) системы, что, в конечном итоге, приводит к возникновению и прогрессированию нейродегенеративных изменений и когнитивному дефициту [1, 2]. Выраженность этих нарушений положительно коррелирует с тяжестью диабетической энцефалопатии. В связи с этим, изучение функционального состояния гормональных сигнальных систем мозга и их чувствительности к гормонам может быть использовано для мониторинга осложнений СД со стороны ЦНС и оценки эффективности их лечения.

Установлено, что в мозге пациентов с СД 1-го и 2-го типов и животных с экспериментальными моделями СД снижена активность инсулиновой и серотонинергической систем, что ведет к нарушениям в других, функционально с ними связанных, сигнальных системах [1, 3, 4]. Снижение активности инсулиновой системы связано с дефицитом гормона (СД 1-го типа) или нечувствительностью к нему тканей мозга (СД 2-го типа). Ослабление активности серотонинергической системы обусловлено как снижением уровня серотонина и его предшественников в мозге, так и изменением экспрессии серотонино-

вых рецепторов и сопряженных с ними сигнальных белков, компонентов регулируемых серотином сигнальных каскадов [5]. Лечение интраназальным инсулином (ИИ) и селективными ингибиторами обратного захвата серотонина (СИОЗС), повышающими концентрацию инсулина и серотонина в мозге, приводит к восстановлению нарушенных при СД функций ЦНС [3, 4, 6]. Однако механизмы действия ИИ и СИОЗС на сигнальные системы мозга при СД недостаточно исследованы.

Цель работы состояла в изучении влияния ИИ и интраназального серотонина (ИС) на активность аденилатциклазы (АЦ) и ее регуляцию гормонами в мозге крыс с пролонгированной неонатальной моделью СД 2-го типа. Выбор модели был продиктован следующими обстоятельствами. Во-первых, она наиболее близка СД 2-го типа человека, характеризуется выраженной резистентностью нервной и периферических тканей к инсулину и умеренной гипергликемией, типичных для этой формы заболевания [7]. Во-вторых, ранее нами в мозге крыс с неонатальной моделью СД были выявлены нарушения в АЦ системе, которые могут быть использованы как маркеры функционального состояния ЦНС [8, 9]. В-третьих, именно в случае предложенной нами пролонгированной модели СД 2-го типа успевают развиваться осложнения со стороны ЦНС и других систем организма.

Материалы и методы

Для экспериментов были взяты самки крыс Wistar, которые содержались в стандартных условиях и на стандартном рационе. Неонатальный СД вызывали внутрибрюшинным введением пятидневным крысятам стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в 0.9 % растворе NaCl, подкисленного лимонной кислотой (pH 4.5), в дозе 80 мг на кг веса, как описано в работе [7]. Животные контрольной группы получали подкисленный физиологический раствор в том же объеме. С помощью теста на толерантность к глюкозе было показано, что у обработанных стрептозотоцином крыс в возрасте 3–4 месяцев развивается выраженная резистентность к инсулину, типичная для СД 2-го типа. Через 2 ч после введения глюкозы (2 г/кг веса) ее концентрация в крови диабетических животных была существенно выше нормы, в то время как у контрольных крыс она достигала нормальных значений. Измерение уровня глюкозы проводили в цельной крови, полученной из хвостовой вены, с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания).

Интраназальное введение гормонов проводили согласно методике, ранее описанной для ИИ [10]. Кристаллический инсулин (Lilly, США) в концентрации 24 IU/мл или серотонин (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл растворяли в подкисленном физиологическом растворе (pH 4.5) и вводили диабетическим и контрольным крысам интраназально, один раз в день (в каждую ноздрю по 10 мкл раствора гормона). В общей сложности каждое животное получало 0.48 IU инсулина или 20 мкг серотонина, лечение проводили в течение семи недель. Группам сравнения вместо гормонов интраназально вводили подкисленный физиологический раствор. Таким образом, исследовали 6 групп шестимесячных крыс: контрольные животные, не получавшие гормоны (К, $n = 9$, вес тела 273 ± 16 г, уровень глюкозы 4.8 ± 0.2 mM), получавшие ИИ (КИ, $n = 9$, 258 ± 19 г, 4.4 ± 0.3 mM) или ИС (КС, $n = 9$, 282 ± 14 г, 4.6 ± 0.3 mM), диабетические животные, не получавшие гормоны (Д, $n = 8$, 338 ± 18 г, 7.0 ± 0.5 mM), получавшие ИИ (ДИ, $n = 8$, 292 ± 16 г, 6.1 ± 0.4 mM) или ИС (ДС, $n = 8$, 322 ± 16 г, 6.5 ± 0.4 mM).

Для проведения биохимических исследований использовали норадреналин, изопротеренол, серотонин, дофамин, бромокриптин, 5-нонилокситриптамиин (5-НОТ), 5-метокси-*N,N*-диметилтриптамиин (5-МДМТ), соматостатин, полипептид-38, активирующий АЦ гипофиза (РАСАР-38), форсколин, гуанилилимидодифосфат (ГИДФ), полученные из

фирмы Sigma-Aldrich (США), EMD-386088 — из фирмы Tocris Cookson Ltd. (Великобритания). Релаксин-2 был предоставлен профессором John Wade (Университет Мельбурна, Австралия). Меченый [α - 32 P]-АТФ (4 Ки/ммоль) был получен из ОАО «Реакторные материалы» (Россия).

Взятие тканей мозга у шестимесячных диабетических и контрольных крыс осуществляли через 24 ч после последнего введения им гормона или физиологического раствора. Выделение фракций синаптосомальных мембран проводили, как описано ранее [11]. Кору больших полушарий, стриатум и гиппокамп гомогенизировали при помощи Политрона в охлажденном до 4 °C 50 mM Tris-HCl буфере (pH 7.4), содержащем 5 mM MgCl₂, 10 % (w/v) сахарозы и коктейль ингибиторов протеаз (буфер А). Полученный гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант снова центрифугировали (9000 g, 20 мин). Осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и центрифугировали при 35000 g в течение 10 мин.

Активность АЦ (ЕС 4.6.1.1) определяли, как описано ранее [11]. Реакционная смесь содержала 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM цАМФ, 1 mM АТФ, 1 мкКи [α - 32 P]-АТФ, 20 mM креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 25–50 мкг мембранного белка. Реакцию проводили в течение 10 минут при 37 °C. Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин на мг мембранного белка. Базальную активность АЦ измеряли в отсутствие гормонов и негормональных агентов.

Статистический анализ данных проводили с помощью компьютерной программы ANOVA. Данные представляли в виде $M \pm m$ трех независимых экспериментов. Различия между значениями активности АЦ во фракциях синаптосомальных мембран, выделенных из мозга различных групп животных, оценивали как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты

Базальная активность АЦ в мозге диабетических крыс составила 22.7 ± 1.3 пмоль цАМФ/мин на мг белка, и мало отличалась от таковой в контроле (23.7 ± 1.1 пмоль цАМФ/мин на мг белка). Стимулирующие АЦ эффекты ГИДФ и форсколина (10^{-5} М), негормональных активаторов АЦ, которые у диабетических крыс составили 190 и 302 %, также были близки к их значениям в контроле — 179 и 310 %. Обработка контрольных и диабетических животных с помощью ИИ и ИС не приводила к существенным изменениям базальной и стимулированной негормональными агентами активности АЦ (данные не представлены). Это указывает на сохранение

каталитических функций АЦ и ее полноценное сопряжение с G-белками стимулирующего типа (G_s) в мозге крыс с неонатальным СД и на отсутствие влияния на них обработки ИИ и ИС.

Далее изучали влияние ИИ и ИС на регуляторные эффекты гормонов, действующих на АЦ через сопряженные с G_s -белками рецепторы. Норадреналин, неселективный агонист адренергических рецепторов (АР), β -АР-агонист изопротеренол, дофамин, серотонин, селективный агонист серотониновых рецепторов 6-го типа (СР6) EMD-386088 и пептидные гормоны РАСАР-38 и релаксин стимулировали АЦ в синапсомембранных мозга контрольных и диабетических крыс. При СД стимулирующие АЦ эффекты АР-агонистов и релаксина были снижены, АЦ эффект дофамина повышен, АЦ эффекты СР-агонистов и РАСАР-38 менялись слабо (рис. 1). Обработка контрольных крыс ИИ усиливала АЦ эффекты СР-агонистов и РАСАР-38 и ослабляла АЦ эффект дофамина, который был достоверно ниже, чем в контроле. Лечение диабетических крыс ИИ частично восстанавливало сниженные при СД эффекты АР-агонистов и релаксина, приводило к повышению АЦ эффекта РАСАР-38 и

снижению АЦ эффекта дофамина до их значений в группе КИ. Обработка ИС снижала АЦ эффекты СР-агонистов и повышала АЦ эффект РАСАР-38 как в контроле, так и у диабетических животных. Лечение диабетических крыс ИС также снижало АЦ эффект дофамина и частично восстанавливало сниженный при СД эффект релаксина (рис. 1). АЦ эффекты АР-агонистов при обработке ИС не менялись.

На заключительном этапе изучали влияние ИИ и ИС на эффекты гормонов, действующих на АЦ через G-белки ингибирующего типа (G_i), которые оценивали по снижению гормонами стимулированной форсколином (10^{-5} М) активности АЦ. Ингибирующие АЦ эффекты норадреналина, дофамина, агониста дофаминовых рецепторов 2-го типа (ДР2) бромокриптина, серотонина, селективного СР1В/1D-агониста 5-НОТ, СР1/2-агониста 5-МДМТ и пептидного гормона соматостатина были ослаблены в мозге диабетических животных, в наибольшей степени в случае серотонина и СР1-агонистов (рис. 2). Обработка контрольных животных ИИ усиливала ингибирующие АЦ эффекты соматостатина и бромокриптина. Обработка ИС на ингибирующие АЦ эффекты гормонов влияла

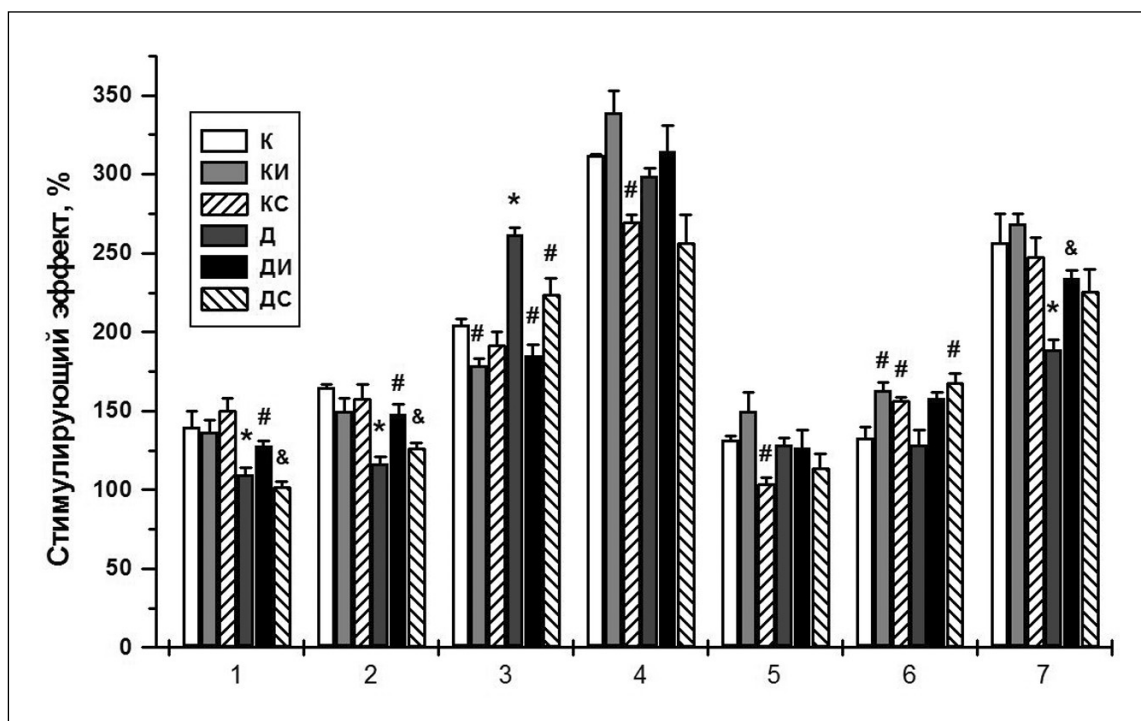


Рисунок 1. Стимулирующие эффекты гормонов на активность аденилатциклазы в синапсомембранных мозга контрольных и диабетических крыс и влияние на них обработки интраназальными гормонами.

1 — норадреналин; 2 — изопротеренол; 3 — дофамин; 4 — серотонин; 5 — EMD-386088 (все — 10^{-5} М); 6 — РАСАР-38 (10^{-7} М); 7 — релаксин (10^{-8} М). К — контроль, КИ и КС — контрольные животные, обработанные ИИ и ИС, Д — диабет, ДИ и ДС — диабетические животные, обработанные ИИ и ИС. * — различия между группами К и Д достоверны при $P < 0.05$, # — различия между группами К и КИ, К и КС, Д и ДИ, Д и ДС достоверны при $P < 0.05$, & — различия между группами КС и ДС, КИ и ДИ достоверны при $P < 0.05$

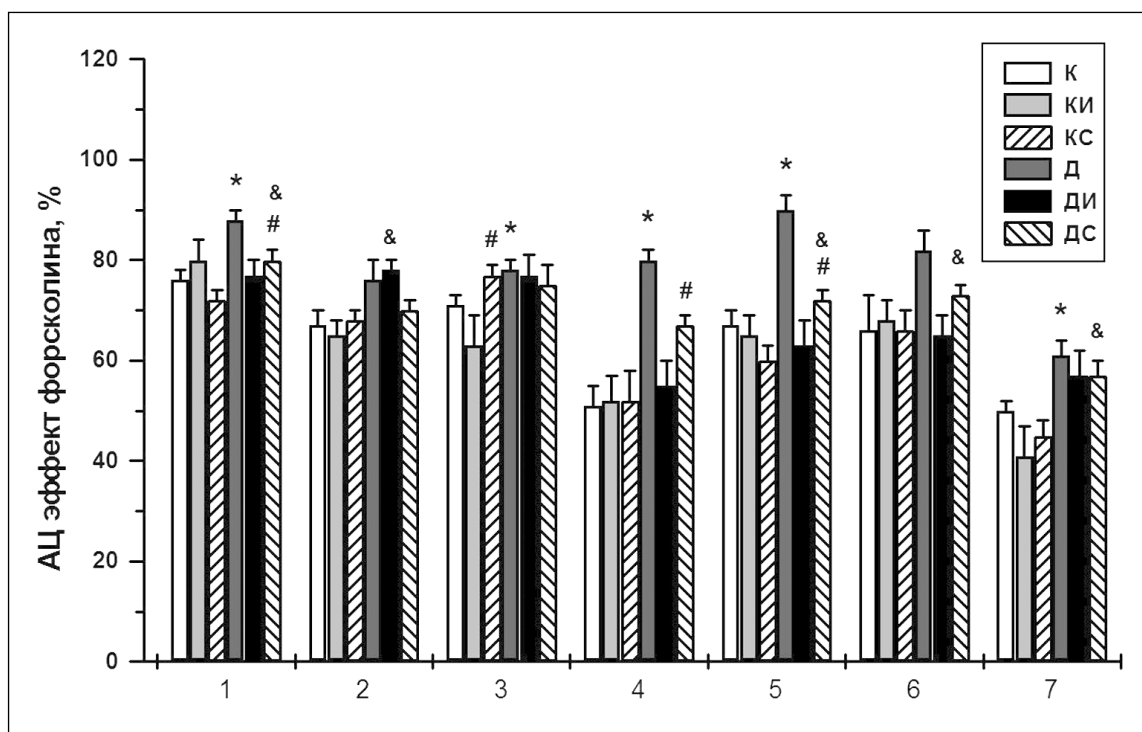


Рисунок 2. Ингибирующий эффект гормонов на стимулированную форсколином активность аденилатциклазы в синапсомембранных мозгах контрольных и диабетических крыс и влияние на них обработки интраназальными гормонами.

1 — норадреналин; 2 — дофамин; 3 — бромокриптин; 4 — серотонин; 5 — 5-нонилокситриптамиин; 6 — 5-метокси-*N,N*-диметилтриптамиин (все — 10^{-5} M); 7 — соматостатин (10^{-6} M).

Стимулирующий аденилатциклазу эффект форсколина (10^{-5} M) на базальную активность фермента принят за 100 %. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

незначительно. Лечение диабетических крыс ИИ восстанавливало ингибирующие АЦ эффекты норадреналина, соматостатина, серотонина и СР1-агонистов, но не влияло на эффекты дофамина и бромокриптина. Лечение диабетических животных ИС также восстанавливало, хотя и в меньшей степени, ингибирующие АЦ эффекты гормонов, в том числе дофамина (рис. 2).

Обсуждение

Обнаруженные нами изменения чувствительности АЦ к биогенным аминам и пептидным гормонам в мозге крыс с неонатальной моделью СД 2-го типа свидетельствуют о нарушениях, возникающих в широком спектре гормональных и нейромедиаторных систем диабетического мозга, что может быть одной из важнейших причин развития нейродегенеративных заболеваний и когнитивного дефицита при СД [1, 2]. В этой связи необходимо отметить, что ранее нами было выявлено снижение способности к обучению и ослабление пространственной памяти у крыс с неонатальным СД [12]. Нами установлено, что изменения гормональной чувствительности АЦ в мозге диабетических крыс характеризуются

гормональной и рецепторной специфичностью и затрагивают, в основном, сигнальные каскады, включающие G_i -белки, через которые осуществляется негативная регуляция цАМФ-зависимых каскадов. Это согласуется с ранее полученными нами и другими авторами данными, что в мозге и периферических тканях крыс со стрептозотоциновым СД 1-го типа также снижена функциональная активность G_i -белков и их регуляция гормонами, причинами чего является снижение экспрессии G_i -белков в условиях длительной гипергликемии [13, 14].

В мозге крыс с неонатальным СД в наибольшей степени ослабляются ингибирующие АЦ сигнальные каскады, реализуемые через сопряженные с G_i -белками СР1, что указывает на значительные изменения в серотонинергической системе, ответственной за ингибирование АЦ. Стимулирующие АЦ эффекты СР-агонистов, действующих через сопряженные с G_s -белками СР4, СР6 и СР7, при этом практически не меняются. Неожиданным является наблюдаемое при СД усиление стимулирующего АЦ эффекта дофамина, который осуществляется через ДР1, и слабо выраженное в сравнении с другими гормонами снижение ингибирующих АЦ

эффектов дофамина и бромокриптина, реализуемых через ДР2. Причиной этого может быть повышение экспрессии ДР1 и ДР2, сопряженных с АЦ соответственно через G_s - и G_i -белки, в пользу чего свидетельствует тот факт, что в мозге крыс со стрептозотоциновым СД 1-го типа повышена экспрессия обоих типов ДР и связывание дофамина с синапсомальными мембранами [15].

Лечение диабетических пациентов ИИ улучшает у них способность к обучению, память, препятствует снижению когнитивных функций и развитию атрофии головного мозга [4]. Мы показали, что длительное лечение ИИ крыс с неонатальным СД приводит к частичному или полному восстановлению чувствительности АЦ мозга к гормонам, причем этот эффект ИИ в наибольшей степени выражен в случае сопряженной с G_i -белками серотонинергической системы, ослабление которой при СД вносит значительный вклад в развитие диабетической энцефалопатии. ИИ полностью восстанавливал ингибирующий АЦ эффект селективного СР1-агониста 5-НОТ, который сильно снижен в диабетическом мозге. В этой связи следует отметить, что в мозге СР1 осуществляет пресинаптическое торможение, контролирует поведенческие реакции, регулирует функции сосудов.

В пользу ключевой роли серотонинергической системы в развитии когнитивных дисфункций в условиях СД, свидетельствуют полученные нами данные о восстановлении чувствительности АЦ в мозге диабетических крыс к действию ряда гормонов при лечении ИС. Так ИС восстанавливал стимулирующий АЦ эффект релаксина, усиливал АЦ эффект РАСАР-38 и повышал чувствительность АЦ к ингибирующему влиянию СР1-агонистов. Это может быть связано как с повышением экспрессии и функциональной активности компонентов АЦ системы, в первую очередь G_i -белков, так и с восстановлением взаимодействий между разбалансированными при СД сигнальными каскадами мозга. Ранее было показано, что лечение флуоксетином (СИОЗС) пациентов с СД 2-го типа с сильно выраженной депрессией приводит не только к ослаблению депрессивного синдрома, но и повышает чувствительность тканей к инсулину и способствует улучшению гликемического контроля [6]. Была выдвинута гипотеза о важной роли центрального серотонина и регулируемых им сигнальных каскадов мозга в патогенезе СД и его осложнений [3]. Полученные нами данные о восстановлении ИС функциональной активности АЦ системы в мозге крыс с неонатальным СД не только подтверждают эту гипотезу, но и указывают на перспективность подходов, направленных на повышение уровня серотонина в мозге, для лечения СД и вызываемых им дисфункций в ЦНС.

Работа поддержана РФФИ (проект № 12-04-00434 и 12-04-32034) и ФЦП № 8486 (заявка 2012-1.5-12-000-1002-001).

Литература

1. Shpakov A., Chistyakova O., Derkach K., Bondareva V. Hormonal signaling systems of the brain in diabetes mellitus // In: Neurodegenerative Diseases (Ed. by R.C. Chang), Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. — 2011. — P. 349–386.
2. Shpakov A.O. Alterations in hormonal signaling systems in diabetes mellitus: origin, causality and specificity // Endocrinol. Metab. Syndrome. — 2012. — [Электронный ресурс] URS: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1017.1000e106>.
3. Zhou L., Sutton G., Rochford J. et al. Serotonin 2C receptor agonists improve type 2 diabetes via melanocortin-4 receptor signaling pathways // Cell. Metab. — 2007. — Vol. 6. — P. 398–405.
4. Stockhorst U., de Fries D., Steingrueber H.J., Scherbaum W.A. Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans // Physiol. Behav. — 2004. — Vol. 83. — P. 47–54.
5. Шпаков А.О. Функциональное состояние регулируемых биогенными аминами и ацетилхолином сигнальных систем мозга при сахарном диабете // Цитология. — 2012. — Т. 54, № 6. — С. 459–468.
6. Lustman P., Freedland K., Griffith L., Clouse R. Fluoxetine for depression in diabetes: a randomized double-blind placebo-controlled trial // Diabetes Care. — 2000. — Vol. 23. — P. 618–623.
7. Hemmings S., Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 2000. — Vol. 32. — P. 905–919.
8. Шпаков А.О., Кузнецова Л.А., Плеснева С.А., Перцева М.Н. Нарушение передачи ингибирующего аденилатциклазу гормонального сигнала в миокарде и мозге крыс с экспериментальным диабетом 2-го типа // Цитология. — 2007. — Т. 49, № 6. — С. 442–450.
9. Шпаков А.О., Деркач К.В., Бондарева В.М. Изменение гормональной чувствительности аденилатциклазной сигнальной системы тестикулярной ткани крыс в условиях неонатального стрептозотоцинового диабета // Бюл. exper. биол. мед. — 2009. — Т. 148, № 9. — С. 282–286.
10. Thorne R., Pronk G., Padmanabhan V., Frey W. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration // Neuroscience. — 2004. — Vol. 127. — P. 481–496.
11. Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I. et al. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system // Int. J. Pept. Res. Ther. — 2010. — Vol. 16. — P. 95–105.

12. Chistyakova O.V., Bondareva V.M., Shipilov V.N. *et al.* A positive effect of intranasal insulin on spatial memory in rats with neonatal diabetes mellitus // *Endocrinol. Studies*. — 2011. — Vol. 1, № 16. — P. 67–75.

13. Шнаков А.О., Кузнецова Л.А., Плеснева С.А. *и соавт.* Идентификация нарушений в гормоночувствительной АЦ-системе в тканях крыс с диабетом 1-го и 2-го типов с использованием функциональных зондов и синтетических наноразмерных пептидов // *Технологии живых систем*. — 2007. — Т. 4, № 5–6. — С. 96–108.

14. Hashim S., Li Y., Nagakura A. *et al.* Modulation of G-protein expression and adenylyl cyclase signaling by high glucose in vascular smooth muscle // *Cardiovasc. Res.* — 2004. — Vol. 63. — P. 709–718.

15. Robinson R., Krishnakumar A., Paulose C. Enhanced dopamine D₁ and D₂ receptor gene expression in the hippocampus of hypoglycaemic and diabetic rats // *Cell. Mol. Neurobiol.* — 2009. — Vol. 29. — P. 365–372.

МЕТОДИКА ПЭТЧ-КЛАМП В ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ КАРДИОМИОЦИТОВ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИОННЫХ КАНАЛОВ МИОЦИТОВ СЕРДЦА МЛЕКОПИТАЮЩИХ.

А.В. Карпушев, А.В. Ревитцер, И.В. Рябинкина, Е.В. Тыщук

*ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия*

Карпушев Алексей Валерьевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ клеточной биологии института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Ревитцер Алла Вафаевна* — студентка ФГБОУ ВПО «СПбГПУ», лаборант-исследователь НИЛ клеточной биологии института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Ирина Витальевна Рябинкина* — научный сотрудник Коми филиала ГБОУ высшего профессионального образования «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, *Елена Вячеславовна Тыщук* — врач ГБУ здравоохранения «Коми республиканский перинатальный центр»

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, институт Молекулярной биологии и генетики, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: akarpushev@yandex.ru +7-963-244-2231 (Карпушев Алексей Валерьевич).

Резюме

К настоящему времени в плазматической мембране кардиомиоцитов известны все основные ионные токи, активирующиеся и последовательно инактивирующиеся при каждой фазе сердечного потенциала действия (ПД), а также соответствующие гены и клонированные субъединицы каналов. В сердечных клетках важными ионными каналами являются: Na^+ и Ca^{2+} каналы, обеспечивающие вход Na^+ и Ca^{2+} в клетку; различного рода K^+ каналы, осуществляющие выход K^+ из клетки. Все названные каналы являются интегральными трансмембранными транспортными белками, катионными ионными каналами, принципиально сходными в структурно-функциональной организации, но имеющими как сходные, так и отличающиеся элементы. В обзоре рассматривается использование метода пэтч кламп для записи ионных токов в кардиомиоцитах и приводятся данные по различным ионным каналам миоцитов сердца млекопитающих.

Ключевые слова: пэтч-кламп, ионные каналы кардиомиоцитов млекопитающих.

PATCH-CLAMP TECHNIQUE IN ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDIES OF CARDIOMYOCYTES AND CHARACTERIZATION OF ION CHANNELS OF THE CARDIAC MUSCLE CELLS OF MAMMALS.

A.V. Karpushev, A.V. Revitzer, I.V. Rjabinkina, E.V. Tyschuk

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: akarpushev@yandex.ru (Alexey V. Karpushev — PhD, researcher of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

At present all major ionic currents in the plasma membrane of cardiomyocytes activated and consequentially inactivated at every phase of cardiac action potential (AP), corresponding genes and cloned channel subunits are

well known. In cardiac cells the most important ion channels are: Na^+ and Ca^{2+} channels, providing input of Na^+ and Ca^{2+} ions into the cell, various types of K^+ channels, providing exit of K^+ ions out of the cell. All of these channels are integral transmembrane transport proteins, cationic ion channels, essentially similar at the structural and functional organization, but having both similar and different elements. This review considers the use of the patch clamp technique for recording of ionic currents in cardiomyocytes and provides information about various ion channels of the cardiac muscle cells of mammals.

Key words: patch-clamp, ion channels of mammalian cardiomyocytes.

Статья поступила в редакцию 20.12.12, принята к печати 10.01.13.

Введение

Знание клеточной электрофизиологии имеет важное значение для понимания сердечной патологии. Микроэлектродная регистрация в при помощи методики патч-кламп в изолированных кардиомиоцитах представляет собой мощный и эффективный способ исследования электрической активности в норме и при патологии сердечной мышцы [1–3]. В данном обзоре мы кратко обсудим использование метода записи ионных токов в кардиомиоцитах и современные данные по различным ионным каналам, участвующим в формировании электрических процессов в миоцитах сердца млекопитающих.

1. Метод пэтч-кламп

Пэтч-кламп или метод локальной фиксации потенциала — электрофизиологическая методика для изучения свойств ионных каналов. Эта методика даёт возможность экспериментатору контролировать разность потенциалов между сторонами мембраны, а также помещать её в среду с определённым химическим составом. В этих хорошо контролируемых условиях измеряют ионные токи, проходящие через мембрану, что, в конечном итоге, позволяет делать выводы о том, как ионные каналы реагируют на электрическое и химическое воздействие. Метод настолько чувствителен, что позволяет наблюдать поведение и химические превращения единичных молекул, взаимодействующих с мембраной [4]. Немецкие исследователи Эрвин Неер и Берт Сакман, разработавшие эту методику, получили Нобелевскую премию в 1991 году. В конце семидесятых годов XXв. Эрвин Неер (E. Neher) и Берт Сакман (B. Sakmann) обнаружили, что конусообразные стеклянные пипетки с диаметром кончика 1–2 микрона могут образовывать контакты с клеточной мембраной с сопротивлением в несколько гигаом — это так называемый гигаомный контакт. Он позволяет изолировать от внешней среды и от остальной части мембраны тот её фрагмент, который находится внутри пипетки. Ограниченный пипеткой фрагмент мембраны и называется пэтч (patch — фрагмент), слово кламп (clamp — фикса-

ция) в названии метода можно интерпретировать и как захват и изоляцию этого фрагмента, так и как фиксацию трансмембранного потенциала или тока в изолированном фрагменте или на целой клетке. В пипетку, заполненную раствором электролита, помещается хлор-серебряный электрод, второй электрод размещается внеклеточно, в омывающей жидкости. Особенностью метода является то что один и тот же электрод используется как для измерения разности потенциалов, так и для подачи тока, что оказывается возможным благодаря сравнительно низкому сопротивлению пипетки.

Запись ионных токов с помощью методики патч-кламп может быть использована в исследованиях на свежесозданных кардиомиоцитах или культуре полученной из стволовых клеток. Патч-кламп метод может быть использован для записи электрической активности, т.е. ионных токов через мембрану целой клетки (фиксация напряжения — voltage clamp) и мембранного потенциала (фиксация тока — current clamp) или записи токов одного или нескольких ионных каналов через ограниченный участок мембраны клетки в режиме cell-attached.

Для изучения электрофизиологических характеристик кардиомиоцитов необходимо получение изолированных клеток сердца. Для изоляции кардиомиоцитов используется метод перфузии сердца такими ферментами как коллагеназа и проназа с помощью аппарата Лангендорфа. Сердце помещают в перфузионную камеру и канюлируют его через аорту. Последующие 5–10 мин сердце отмывают от крови Krebs-Henseleit буфером, содержащим (в mM) 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.25 KH_2PO_4 , 1.3 MgSO_4 , 10 глюкозу, 1.2 CaCl_2 , 10 HEPES, pH 7.4. В течение всей процедуры выделения буфер насыщают чистым кислородом, и поддерживается температура 35°C. Через сердце буфер прокачивают перистальтическим насосом со скоростью 4 мл/мин. После отмывания от крови сердце 5 минут перфузируют Krebs-Henseleit буфером, не содержащим ионы кальция. Затем, в течение 20 минут, сердце перфузируют Krebs-Henseleit буфером с низким содержанием кальция (не более 0.25 mM), pH 7.4, а также

ферментов коллагеназы (1–0.2 мг/мл) и проназы (0.5–0.1 мг/мл). Еще 20 минут сердце обрабатывают буфером, содержащим только проназу (0.5–0.1 мг/мл), pH 7.4. Далее сердце отмывают от ферментов, продолжая перфузию низкокальциевым буфером (pH 7.4) в течение 10 мин. Отмытое сердце снимают с канюли и помещают в Krebs-Хенселейт буфер с концентрацией кальция 0.25–1 мМ. Удалив крупные сосуды, сердце разрезают на кусочки 1–2 мм³ и осторожно ресуспендируют с помощью большой автоматической пипетки в течение 1 минуты. После этой процедуры клетки готовы для использования в исследованиях или хранения.

Другим источником кардиомиоцитов могут быть культуры клеток, полученные при выделении кардиомиоцитов у новорожденных млекопитающих или клеточные линии HL-1 (миоцитов предсердий мыши) или H9c2 (эмбриональных кардиомиоцитов крысы) [5–7].

2. Ионные каналы в кардиомиоцитах млекопитающих

Ионные каналы лежат в основе возбудимости сердца. Каналы представляют собой белковые молекулы, встроенные в клеточную мембрану, через которые осуществляется ионный обмен между вне- и внутриклеточной средой. Основные ионные токи активирующиеся и последовательно инактивирующиеся при каждой фазе сердечного потенциала действия (ПД) и соответствующие клонированные субъединицы каналов и гены уже известны [8]. Ключевые ионные каналы и электрогенный транспортер в сердечной клетке следующие: K⁺ каналы осуществляют выход ионов K⁺ из клетки; Na⁺ и Ca²⁺ каналы осуществляют вход ионов Na⁺ и Ca²⁺ в клетку, соответственно. Na⁺/Ca²⁺ обменщик является электрогенным, так как он транспортирует три иона Na⁺ для каждого иона Ca²⁺ через мембрану [9]. Ток ионов натрия внутрь клетки (активация натриевого канала) обеспечивает деполяризационную фазу ПД в рабочем миокарде. По мере нарастания деполяризации проницаемость для ионов натрия падает (инактивация натриевого канала) и, активируются входящие Ca²⁺ токи, которые формируют фазу плато ПД. Активация различных K⁺ каналов приводит к реполяризации. Таким образом, благодаря K⁺ каналам I_{K1} реполяризация продолжается до значения потенциала покоя.

2.1. Na⁺ каналы.

Во время генерации ПД в миокарде млекопитающих, важную роль играет активация натриевых каналов. Входящие Na⁺ — токи быстро деполяризуют мембрану клетки до +40 мВ. Натриевый канал представляет собой белок, состоящий из

2016 аминокислотных остатков, который находится в клеточной мембране и ассоциируется с β_1 -субъединицей. Na⁺ канал состоит из четырех гомологичных трансмембранных доменов I, II, III и IV. Каждый домен, в свою очередь, состоит из шести трансмембранных сегментов, S1 — S6. Количество трансмембранных сегментов, а также их расположение в клеточной мембране определяется с помощью анализа индекса гидропатии. Белковая молекула канала сконфигурирована таким образом, что сегменты S5 и S6 образуют участок поры. Участки, ответственные за отдельные функции каналов, были установлены при помощи специальных методик, в первую очередь с помощью метода направленного мутагенеза [10, 11]. Было установлено, что сегмент S4 играет роль датчика изменений электрического напряжения. Канал, таким образом, работает как вольтметр, т.к. он во всех четырех доменах представляет собой α -спираль, в которой каждый третий аминокислотный остаток заряжен положительно. Другая очень важная особенность в структуре Na⁺ канала — это линкер между доменами III и IV. Эта цепочка аминокислот критична для нормальной инактивации натриевого канала. Например, удаление (или врожденное отсутствие) всего лишь трех аминокислот с порядковыми номерами 1505–1507 (а именно лизина, пролина и глутамина — delta KRPQ) приводит к развитию синдрома удлиненного QT [12]. Опубликованные данные показывают, что ионный транспорт через Na⁺ каналы критически зависит от аминокислотной последовательности трансмембранного сегмента. Недавно были обнаружены две мутации, R1644H в сегменте S4 и N1325S в линкере между сегментами S4 и S5, которые являются причиной синдрома удлиненного QT [13]. Известно, что механизм действия антиаритмических веществ класса I, т.е. блокаторов натриевых каналов, опосредован связыванием этих лекарств с аминокислотными остатками сегмента S6 домена IV. Натриевые каналы можно разделить на несколько типов, имеющих различные функциональные и фармакологические свойства. В сердце идентифицированы так называемые быстрые натриевые каналы (быстро активирующиеся и быстро инактивирующиеся), которых можно селективно блокировать тетродотоксином (ТТХ), поэтому их еще называют ТТХ-чувствительными Na⁺ каналами. Существуют и Na⁺ каналы, которые нечувствительны к тетродотоксину и инактивируются значительно медленнее и поэтому дольше остаются в открытом состоянии. Выше упомянутые Na⁺ каналы являются потенциалзависимыми и недавно были идентифицированы новые каналы активация которых не зависит от значения МП [14]. Обнаружилось, что

тетродотоксин имеет высокое сродство к натриевым каналам мозговой ткани и скелетных мышц и значительно меньшее сродство с каналами миокарда. Оказалось, что ключевым звеном здесь является аминокислотный остаток в положении 373. В миокарде в этой позиции находится цистеин, а в других тканях здесь располагается остаток ароматической аминокислоты (например, гистидина). В возбудимых тканях обнаружены три цитоплазматические β -субъединицы (β_{1-3}), которые ассоциированы с α -субъединицами натриевых каналов ($\text{Na}_v 1.1-1.9$). Выяснена роль этих β -субъединиц в модуляции Na^+ канала во многих тканях [15, 16].

В патологических условиях экспрессия некоторых Na^+ каналов резко увеличивается, и эта аномальная экспрессия натриевых каналов также как при аномалиях с K^+ каналами способствует синдрому LQT. Недавно была обнаружена двойная мутация (R1232W / T1620M) у пациентов с синдромом Бругада [17–19]. Мутация T1620M, играющая ключевую роль при синдроме LQT, присутствует во внеклеточном линкере между сегментами S3 и S4 в домене IV. Мутации R1232W и T1620M $\text{hNa}_v 1.5$ у пациентов с синдромом Бругада обусловлена дефективным перемещением натриевых каналов в сердце [15]. Как было показано последними авторами, выше упомянутая двойная мутация и следовательно дефективное перемещение α -субъединиц $\text{hNa}_v 1.5$ приводят к уменьшению натриевого тока. Более того, полученные ими данные предполагают, что задержка мутированного канала в эндоплазматическом ретикулеуме происходит из-за отсутствия позитивного заряда в аминокислотной позиции 1232.

2.2. Ca^{2+} каналы.

Существуют несколько типов Ca^{2+} каналов в сердечно-сосудистой системе млекопитающих и в их числе потенциалзависимые кальциевые каналы L- и T-типа, активирующиеся при деполяризации МП. Они различаются по своим свойствам, функциям и распространенности в сердечно-сосудистой системе. Кальциевые каналы типа L (long-lasting) активируются при более деполяризованных МП и инактивируются медленно в противоположность кальциевым каналам типа T (transient), которые активируются при менее деполяризованном МП и инактивируются очень быстро. Кальциевые каналы L-типа в сердечно-сосудистой системе представлены наиболее широко. В синоатриальном узле они способствуют пейсмекерной активности [20], в атриовентрикулярном узле — проведению импульсов через узел [21].

Хорошо известные антагонисты кальциевых каналов, такие как верапамил, дилтиазем и нифедипин, воздействуют преимущественно на Ca^{2+} каналы

L-типа. Они имеют одинаковый механизм действия. Мибеградил, представитель нового класса антагонистов кальция, блокирует не только кальциевые каналы L-типа, но и каналы T-типа [22].

Ca^{2+} каналы L-типа регулируют вход кальция в гладкомышечные клетки и непосредственно влияют на процесс сокращения. Блокада этих каналов такими антагонистами как верапамил, дилтиазем и нифедипин приводит к расслаблению гладких мышц. В гладких мышцах сосудов кальциевые каналы T-типа влияют на процессы сокращения и, таким образом, поддерживают сосудистый тонус.

Ca^{2+} каналы T-типа экспрессируются в эмбриональных клетках [23], а также в кардиомиоцитах синоатриального и атриовентрикулярного узла. Они были обнаружены и в клетках Пуркинье [22]. Таким образом, они участвуют в пейсмекерной активности. В отличие от Ca^{2+} каналов L-типа они не обнаружены в вентрикулярных клетках взрослых и играют незначительную роль в регуляции сократимости миоцитов. Кальциевые каналы T-типа также находятся в быстро пролиферирующих клетках (например, в зародышевом сердце) и гипертрофированных клетках, что делает возможным их участие в клеточном росте и пролиферации. Поэтому их блокада может предотвратить чрезмерную пролиферацию гладкомышечной ткани при повреждении.

Вход ионов кальция в сердечную клетку играет одну из ключевых ролей в модуляции ПД. Во время генерации ПД активируются входящие Ca^{2+} токи L-типа, которые образуют и модулируют фазы плато ПД. Вход кальция в клетку вызывает в свою очередь выход этих же ионов из саркоплазматического ретикулула [24]. Встроенные в мембраны последних органелл Ca^{2+} каналы (рианодиновые рецепторы) и Ca^{2+} -АТФаза обеспечивают быстрое освобождение необходимого для мышечного сокращения ионов Ca^{2+} из внутриретикулярного пространства в цитоплазму и его последующую реаккумуляцию. Благодаря этой комбинации процессов концентрация свободного кальция внутри клетки увеличивается. Затем ионы кальция связываются с тропонином С, и происходит сокращение клетки. Обратный процесс, релаксация, происходит при уменьшении концентрации свободного кальция внутри клетки, что приводит к их диссоциации с тропонином.

Транспорт ионов кальция в клетку осуществляется с помощью четырех путей. Последние включают в себе соответственно саркоплазматическую и сарколеммную Ca^{2+} -АТФ помпы, сарколеммный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник и митохондриальный унипорт Ca^{2+} [25–27]. Излишний вход ионов кальция во время ПД ограничивается инактивацией Ca^{2+} каналов L-типа. Эта инактивация является кальций зависимой, и

вызвана связыванием кальмодулина с COOH терминалями Ca^{2+} каналов [28, 29].

Ca^{2+} каналы L-типа или дигидропиридинчувствительные Ca^{2+} токи являются потенциалзависимыми каналами, изменяя свою конформацию при деполяризации МП. Свое второе название они получили благодаря способности связывать с высоким сродством различные производные 1,4-дигидропиридина, которые активируют или ингибируют их активность. Эти Ca^{2+} каналы открываются при деполяризации МП, обеспечивая поступление ионы Ca^{2+} в цитоплазму мышечных клеток из внеклеточной среды.

α -субъединицы потенциалзависимых Ca^{2+} каналов L- и T-типа имеют сходное строение и взаимосвязаны с вспомогательными субъединицами [30, 31]. Ca^{2+} каналы являются олигомерными белками и состоят из пяти типов субъединиц: α_1 , α_2 , ковалентно связанными S-S-мостиками с δ -субъединицей, β и γ , три из которых гликозилированы. α_1 -субъединица состоит из четырех трансмембранных доменов, каждый из которых сформирован сегментами S1 — S6. Фосфорилирование этих субъединиц протеинкиназами также изменяет свойства каналов [24]; влияние САМКП тоже показаны [32, 33]. В отсутствие ионов Ca^{2+} во внеклеточном растворе кальциевые каналы проводят ионы Ba^{2+} и более того при таких условиях их амплитуда увеличиваются [34].

Изменение в воротных механизмах потенциалзависимых K^+ каналов, например, K^+ каналов задержанного выпрямления, может привести к замедлению фазы реполяризации ПД и тем самым может послужить причиной реактивации кальциевых каналов типа L. Последовательно это приводит к осцилляциям в МП в фазе плато ПД. Последний феномен был идентифицирован как ранняя следовая деполяризация — Early After Depolarisation (EAD) [35].

2.3. K^+ каналы.

Мембранный потенциал покоя определяется соотношением ионов калия вне (K_o) и внутри (K_i) клетки и отдельные K^+ каналы играют при этом особую роль.

2.3.1. Калиевые токи входящего выпрямления (I_{K1}).

Термин выпрямление в биофизике заимствован от электроники, где он означает одностороннюю проводимость некоторых элементов [36]. В клеточной биологии выпрямление калиевых каналов входящего выпрямления модулирует МП покоя [37], т.к. открытие этих каналов держат МП покоя клетки близко к K^+ потенциалу Нернста. Почему происходит выпрямление? Потому, что при МП,

способствующим выходящим токам через IRK (inward rectifier K^+ channels), канал закупоривается непроницаемыми внутриклеточными катионами, в основном Mg^{2+} [38], и полиаминами [39]. Эти ионы способны войти в ворота со стороны цитоплазмы, но не проходят через селективный фильтр канала. Цитоплазматическая сторона ворот IRK содержит кислотные и гидрофобные аминокислоты, создающие благоприятную среду для полиаминов, которые в свою очередь закрывают ворота канала [36]. Цитоплазматическая сторона ворот IRK отличается от тетрамерного домена T1 [40] и β -субъединицы потенциалзависимых (K_v) K^+ каналов [41], которые с внутриклеточной поверхности ассоциированы с α -субъединицей K_v . Благодаря IRK K^+ каналам МП покоя возбудимых клеток имеет постоянное значение [42]. Кроме того, модуляция этих каналов составляет основу для контроля ЧСС [43] и влиянию нейротрансмиттеров на центральные нейроны [44].

При изучении K^+ каналов в сердечных клетках желудочка мышей обнаружено, что активированные деполяризацией МП выходящих K^+ токов, при реполяризации МП, последовали следовые входящие токи, I_{tail} [45]. Транзиторные следовые токи активировались при реполяризации МП до -80 мВ, значению близкому к МП покоя сердечных клеток. Активация I_{K1} в ответ на скачки МП до -120 мВ не последовали I_{tail} при возвращении к поддерживаемому потенциалу [46]. Потенциал реверсии I_{tail} зависел от продолжительности деполяризующих ступенек, при их увеличении было выявлено смещение вправо. Эти токи, как и I_{K1} , были блокированы при аппликации 250 μM Ba^{2+} , но эта концентрация не влияла на амплитуды выходящих токов. Исключение внеклеточного Na^+ и Ca^{2+} не влияло на структуру I_{tail} . Было высказано предположение, что I_{tail} в клетках желудочка мышей является результатом аккумуляции K^+ в таких внеклеточных пространствах (системах) как t-трубочке (transverse tubule system). Эти токи возникают благодаря I_{K1} , который находится в t-трубочке, и они являются входящими из-за транзиторного увеличения концентрации K^+ и более деполяризованного потенциала реверсии для K^+ в t-трубочке. С помощью конфокальной микроскопии и при использовании специфичных антител против Kir2.1 (inward rectifier K^+ channels) было показано, что последние каналы находятся именно в t-трубочке клеток желудочка мышей. Такая локализация Kir2.1 не была выявлена в предсердных клетках [46]. Kir2.2 тоже расположены в t-трубочке [47]. Kir2.1 и Kir2.2 составляют входящие токи I_{K1} , и, по всей видимости, в одинаковой пропорции. Последнее предположение было обосновано открытием, что

при исключении гена кодирующего Kir2.2 было обнаружено 50 % уменьшение тока I_{K1} [48]. Более того, было показано, что изменение в значениях амплитуд I_{K1} коррелирует с числом t-tubulus в кардиомиоцитах желудочка. Обычно сердечные клетки в культуре имеют более сниженную I_{K1} [49], что соответствует параллельному уменьшению количества t-tubulus в клетках. При уменьшении I_{K1} происходило уменьшение в значениях емкости клетки [49]. Эти данные доказывают, что наибольшее количество I_{K1} находятся в t-tubulus. Уменьшение емкости клеток соответствовало исчезновению t-tubulus [50, 51]. У морской свинки величина выходящего компонента I_{K1} больше в левом желудочке чем в правом [52]. С помощью компьютерной симуляции последние авторы показали, что уменьшение амплитуды выходящего компонента I_{K1} ведет к увеличению продолжительности ПД.

Выделение ацетилхолина из блуждающего нерва замедляет ЧСС при активации входящих K^+ токов (I_{KACH}) в пейсмекерных клетках синоатриального узла [53]. Весь процесс протекает следующим образом. Ацетилхолин активирует мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR) M_2 , что в свою очередь катализирует обмена ГДФ на ГТФ в α -субъединице гетеротримерного G-белка (Gi). Димеры β - и γ -субъединицы G-белка отделяются от ГДФ связанной α -субъединицы и активируют непосредственно I_{KACH} [54].

K^+ каналы входящего выпрямления имеют шесть подсемейства [55], которые имеют сходную топологию, включая два трансмембранных сегмента и воротного домена. Последний домен этих каналов гомологичен с таким же у K^+ каналов задержанного выпрямления. Тем не менее этих шесть подсемейства можно различить по строению цитоплазматических N- и C-терминалей, т.к. они по-разному чувствительны к внутриклеточным сигналам. I_{KACH} осуществляются через гетеромерные GIRK1 и GIRK4 (G-activated inward rectifier K^+ channels) белки [56]. Каналы образованные этими протеинами при отсутствии сигнала, исходящего от G-протеина, не показывают активность, но активируются при стимуляции M_2 рецептора [57]. В отличие от них, члены Kir2 подсемейства могут функционировать как гомотетрамеры, которые постоянно в активном состоянии, и это происходит независимо от стимуляции M_2 рецептора. Совсем недавно выявили, что химерная конструкция GR7.1 имела похожую базальную активность как у каналов подсемейства Kir2, которые активировались еще больше при стимуляции M_2 рецептора [58]. Эта химера была получена при вставлении N-терминали и дистальной отрезки C-терминали GIRK1 в воротную и

проксимальную часть C-терминали подсемейства Kir2. K^+ каналы входящего выпрямления, которые кодируют подсемейство Kir не показывают потенциалзависимость, т.к. у них отсутствуют сегмент S4 — сенсор потенциала [24].

2.3.2. АТФ-зависимые калиевые каналы.

АТФ-зависимые калиевые каналы в сердце были открыты в 1983 г [59]. Эти каналы обнаружены в миоцитах многих органов и тканей, включая гладкомышечные клетки сосудов. АТФ-зависимые K^+ каналы как и I_{K1} имеют два трансмембранных сегмента и воротный домен [24]. Классическим блокатором K_{ATP} каналов является глибенкламид. АТФ-зависимые калиевые токи кодирует коэкспрессия Kir6.x (inward rectifier K^+ channels) со специфическими сульфонилмочевинными рецепторами (SUR — sulfonylurea receptor) [60]. Субъединицы Kir6.x и SUR в отдельности не проводят K^+ токи при их экспрессии в клетках. Оба белка имеют определенные элементы, которые, по-видимому, препятствуют экспрессии белков в цитоплазматической мембране. Интересно, что совместная экспрессия Kir6.x и SUR устраняет это препятствие, и способствует перемещению комплекса к поверхности клетки [61]. Разнообразие АТФ-зависимых калиевых токов в тканях обусловлено экспрессией разных субъединиц Kir6.x и SUR. Сердечные K_{ATP} каналы обуславливает совместная экспрессия Kir6.2 и SUR2A. Было показано, что ключевую роль в развитии “прекондиционирования” в сердце играет активация АТФ-зависимых каналов. В экспериментальных и клинических условиях доказано, что блокада АТФ-зависимых каналов высокой внутриклеточной концентрацией АТФ препятствует развитию метаболической адаптации миокарда к ишемии, ухудшает функциональные показатели сердечно-сосудистой системы, способствует расширению зоны ишемических повреждений сердечной мышцы. Аналогично действует антагонист АТФ-зависимых каналов глибенкламид, используемый в клинике. Вещества, которые активируют АТФ-зависимые калиевые токи, например пинацидил и никорандил, видимо уменьшают сродство комплекса Kir6.2 и SUR2A к АТФ [24]. Эти каналы обеспечивают взаимосвязь между метаболическим состоянием клетки и ее электрофизиологическими свойствами. Учитывая уникальность композиции субъединиц K_{ATP} каналов и их селективную экспрессию в отдельных тканях, в том числе в сердце, эти каналы можно использовать как мишень для новых медикаментов при лечении ишемии и аритмии [24].

Недавно впервые было показано активация одиночного K_{ATP} канала на поверхности мембраны

сердечной клетки с помощью новой методики, основанной на сканирование проводимости ионного канала [62]. Последние исследования выявили, что K_{ATP} каналы образуют маленькие скопления около Z-полоски сердечной клетки.

Уменьшение экспрессии I_{K1} каналов и K_{ATP} каналов приводит к уменьшению емкости клетки [49], что коррелирует с уменьшением плотности t-трубочек [50, 51].

2.3.3. K^+ каналы задержанного выпрямления.

K^+ каналы задержанного выпрямления в кардиомиоцитах теплокровных состоят из трех компонент: ультрабыстрой, быстрой и медленной. Биофизические, фармакологические и молекулярнобиологические анализы показали, что каждая из компонент обусловлена активностью соответствующего типа субъединицы [24]. Полноценный функциональный канал состоит по крайней мере из двух субъединиц: α - и β -субъединицы. α -субъединицы HERG (Human Ether-à-go-go-Related Gene) ответственны за быструю составляющую реполяризирующего тока (I_{Kr} , rapid), и они проницаемы в основном к ионам калия. HERG встречается в сердце человека, и был впервые идентифицирован Вармке и Ганетцки [63]. HERG обуславливает быструю компоненту K^+ каналов задержанного выпрямления I_{Kr} в сердечных клетках человека [64, 65]. α -субъединицы KvLQT отвечают за медленную компоненту (I_{Ks} , slow) и характеризуются ярко выраженной медленной активацией. α -субъединицы Kv1.5 отвечают за ультрабыструю компоненту (I_{Kur} , ultra rapid) выходящего тока. Было показано, что эти каналы в отсутствие ионов калия во вне- и внутриклеточных растворах проводят и ионы Na^+ [66].

K^+ каналы задержанного выпрямления обнаружены и в сино-атриальных кардиомиоцитах кролика [67]. Это подсемейство K^+ каналов сформировано из ко-сборки четырех α -субъединиц, и каждая из них содержит шесть трансмембранных сегментов S1 — S6. Блокада каналов HERG вызывает продление ПД [68] и QT интервала, а этот эффект может послужить причиной LQT (Long QT) синдрома. Существуют несколько вариантов проявления этого синдрома в зависимости от аномалии в отдельных каналах [24]. Эти два варианта были названы LQT1 и LQT2. Основное функциональное различие между LQT1 и LQT2 заключается в том, что в первом случае ток уменьшается через каналы I_{Ks} , в то время как во втором ток уменьшается через каналы I_{Kr} . Это происходит соответственно из-за мутации в генах KvLQT1 (другое название KCNQ1) и HERG (KCNH2). Существуют наследственные формы LQT, и те, которые вызваны побочными эффектами различных медикаментов. Что касается мутации

генов, то она является основным детерминантом дефективного перемещения белков. Как было изложено выше, дефективное перемещение и мутация α -субъединиц HERG приводит к уменьшению тока задержанного выпрямления в случае LQT2 синдрома. Селективные блокаторы HERG K^+ канала, E-4031, ибутилид и сисаприд, могут устранить эту аномалию.

Дефектное перемещение белков происходит, возможно, из-за образования гетеромерных ансамблей из различных комбинаций субъединиц в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, и может быть ответственным за возникновение ряда болезней у человека [69]. Данные по физиологическим свойствам каналов предполагают, что нарушение функции каналов HERG в случае LQT2 происходит не только из-за дефективного перемещения белков, но также из-за образования нефункциональных каналов, и изменений в воротных механизмах или ионной проницаемости каналов [70]. В клетках, экспрессирующих мутированные α -субъединицы HERG при 37°C синтезируются неполноценные белки-каналы, которые остаются в цитоплазме и не могут доходить до плазматической мембраны. Снижение температуры до 27°C приводит к образованию и повышению проницаемости мембраны для K^+ [71]. Было показано, что мутированные HERG каналы (N470D) при физиологической температуре перемещаются дефектно [72]. Однако культивирование клеток при 37°C в присутствии E-4031 и сисаприда приводило к образованию функциональных каналов. Это влияние на мутированные каналы сохраняется после устранения агентов из культуральной среды. Дефекты в гене HERG, связанные с продлением QT интервала, в ряде случаев приводят к внезапной смерти, что происходит, возможно, из-за вентрикулярной фибрилляции. Было высказано предположение, что продление ПД могло увеличить размер “уязвимого окна”, в котором преждевременный стимул может вести к многонаправленному блокированию проводимости. Наследственный LQT-синдром является генетической болезнью, в основе которой лежат различные мутации каналов, которые ответственны за фазы реполяризации ПД в сердце [73, 74]. Некоторые из этих мутаций вызывают уменьшение K^+ токов посредством доминантно-негативного механизма [75–77].

Каналы типа ERG имеют своих гомологов у разных видов животных в различных клетках, в том числе в микроглии, культуральных клетках GH3/B6 и др. [78, 79]. Они были охарактеризованы с помощью гетерологичной экспрессии HERG [70, 80] и ERG крысы в ооцитах *Xenopus* [81]. Было обнару-

жено, что структура токов в гетерологичной системе при отдельной трансфекции α -субъединицы HERG не приводит к увеличению амплитуды входящего K^+ тока и похожа на нативные токи. Это указывает на то, что нативные каналы I_{Kr} , по-видимому, являются каналами гетеромерной структуры, причем вспомогательная субъединица является обязательным компонентом. При низкой или физиологической концентрации внеклеточного K^+ амплитуда HERG-подобного тока при деполяризации небольшая.

У HERG уникальные свойства среди всех потенциалзависимых K^+ каналов. Уникальность этого канала проявляется в выпрямлении выходящего тока при деполяризации мембраны [64], которое происходит из-за быстрой инактивации типа C [82, 83]. Это привело к предположению, что HERG-каналы могут играть особую роль при аритмиях, вызванных преждевременными систолами — экстрасистолами [82]. При использовании импульсов, форма которых имитировала ПД, максимальная активация токов совпадала с регионом, близким к окончанию фазы реполяризации ПД [84]. Эти авторы пришли к заключению, что антиаритмические свойства HERG обусловлены по крайней мере двумя причинами. Первая — максимальная активация канала происходит в диапазоне потенциалов — (40–45) мВ, в котором кальциевые каналы типа L показывают окно-подобную зависимость (window current). Поэтому HERG-токи будут противодействовать реактивации кальциевых каналов типа L, которая является основной причиной ранней следовой деполяризации (EAD) и аритмий типа torsade de pointes [85]. Наконец, блокирование K^+ каналов задержанного выпрямления I_{Kr} (HERG) может приводить к деполяризации мембраны, и к генерации дополнительных ПД, провоцирующих осцилляции МП. Последние являются кальций-зависимыми осцилляциями в фазу EAD. Вторая причина обусловлена тем, что ранний транзиторный выходящий ток после преждевременной стимуляции может подавлять экстрасистолы [82].

Активатором HERG K^+ токов является внутриклеточный фосфатидил-инозитол-дифосфат (PIP₂). В концентрации 10 μ M он увеличивает амплитуду, и сдвигает потенциалзависимость активации этих токов в сторону гиперполяризации [86]. Кроме того, увеличение концентрации PIP₂ приводит к ускорению кинетики активации и замедляет кинетику инактивации.

Заключение

В заключение следует отметить, что генерация ПД в каждой клетке миокарда, сопровождающаяся быстрой деполяризацией и медленной реполяри-

зацией, в основе которых лежит последовательная активация-инактивация натриевых, кальциевых и калиевых ионных каналов, играет ключевую роль в деятельности сердца. На этом основании можно утверждать, что мутации генов, ответственных за формирование ионных каналов (каналопатии) и/или другие нарушения нормальных соотношений между входящими и выходящими токами, могут оказывать существенное влияние на функции кардиомиоцитов. Идентификация причин нарушений в работе ионных каналов будет способствовать правильному выбору соответствующих терапевтических мероприятий для нормализации работы сердца.

Работа выполнена при поддержке гранта в форме субсидий для юридических лиц на поддержку научных исследований в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» № 8809 от 14 ноября 2012 г.

Литература

1. Neher E., Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres // Nature. — 1976. — Vol. 260. — P. 799–802.
2. Pun R.Y. Voltage clamping with single microelectrodes: comparison of the discontinuous mode and continuous mode using the Axoclamp 2A amplifier // Mol. Cell Biochem. — 1988. — Vol. 80. — P. 109–120.
3. Kornreich B.G. The patch clamp technique: principles and technical considerations // J. Vet. Cardiol. — 2007. — Vol. 9. — P. 25–37.
4. Hamill O.P., Marty A., Neher E. et al. Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches // Pfluegers Arch. — 1981. — Vol. 391. — P. 85–100.
5. Brundel B.J., Shiroshita-Takeshita A., Qi X. et al. Induction of heat shock response protects the heart against atrial fibrillation // Circ. Res. — 2006. — Vol. 99. — P. 1394–1402.
6. Claycomb W.C., Lanson N.A. Jr., Stallworth B.S. et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 2979–2984.
7. Hescheler J., Meyer R., Plant S. et al. Morphological, biochemical and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart // Circ. Res. — 1991. — Vol. 69. — P. 1476–1486.
8. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on // Nature. — 2002. — Vol. 415. — P. 219–226.
9. Sah R., Ramirez R.J., Oudit G.Y. et al. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current I_{to} // J. Physiol. (Lond). — 2003. — Vol. 546. — P. 5–18.

10. Motoike H.K., Liu H., Glaaser I.W. *et al.* The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain // *J. Gen. Physiol.* — 2004. — Vol. 123. — P. 155–165.
11. Tateyama M., Liu H., Yang A.S. *et al.* Structural effects of an LQT-3 mutation on heart Na⁺ channel gating // *Biophys. J.* — 2004. — Vol. 86. — P. 1843–1851.
12. Chandra R., Starmer C.F., Grant A.O. Multiple effects of KPQ deletion mutation on gating of human cardiac Na⁺ channels expressed in mammalian cells // *Am. J. Physiol.* — 1998. — Vol. 274. — P. 1643–1654.
13. Dumaine R., Wang Q., Keating M.T. *et al.* Multiple mechanisms of Na⁺ channel-linked long-QT syndrome // *Circ. Res.* — 1996. — Vol. 78. — P. 916–924.
14. Negulyaev Y.A., Khaitlina S.Y., Hinssen H. *et al.* Sodium channel activity in leukemia cells is directly controlled by actin polymerization // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 40933–40937.
15. Baroudi G., Acharfi S., Larouche C. *et al.* Expression and intracellular localization of an SCN5A double mutant R1232W/T1620M implicated in Brugada syndrome // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 90. — P. 11–16.
16. Zimmer T., Biskup C., Bollensdorff C. *et al.* The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum // *J. Membr. Biol.* — 2002. — Vol. 186. — P. 13–21.
17. Brugada J., Brugada R., Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease // *Circulation.* — 1998. — Vol. 97. — P. 457–460.
18. Chen Q., Kirsch G.E., Zhang D. *et al.* Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation // *Nature.* — 1998. — Vol. 392. — P. 293–296.
19. Benson D.W., Wang D.W., Dymont M. *et al.* Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A) // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 112. — P. 1019–1028.
20. Zhang Z., Xu Y., Song H. *et al.* Functional Roles of Ca_v1.3 (alpha_{1D}) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 90. — P. 981–987.
21. Katz A.M. Calcium channel diversity in the cardiovascular system // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 1996. — Vol. 28. — P. 522–529.
22. Pinto J.M., Sosunov E.A., Gainullin R.Z. *et al.* Effects of mibefradil, a T-type calcium current antagonist, on electrophysiology of Purkinje fibers that survived in the infarcted canine heart // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* — 1999. — Vol. 10. — P. 1224–1235.
23. Lu Z.J., Pereverzev A., Liu H.L. *et al.* Arrhythmia in isolated prenatal hearts after ablation of the Cav2.3 (alpha1E) subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels // *Cell. Physiol. Biochem.* — 2004. — Vol. 14. — P. 11–22.
24. Roden D.M., Balser J.R., George Jr. A.L. *et al.* CARDIAC ION CHANNELS // *Annu. Rev. Physiol.* — 2002. — Vol. 64. — P. 431–475.
25. Bers D.M. Cardiac excitation-contraction coupling // *Nature.* — 2002. — Vol. 415. — P. 198–205.
26. Kang T.M., Hilgemann D.W. Multiple transport modes of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger // *Nature.* — 2004. — Vol. 427. — P. 544–548.
27. Reuter H., Han T., Motter C. *et al.* Mice overexpressing the cardiac sodium-calcium exchanger: defects in excitation-contraction coupling // *J. Physiol.* — 2004. — Vol. 554. — P. 779–789.
28. Peterson B.Z., Demaria C.D., Adelman J.P. *et al.* Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ dependent inactivation of L-type calcium channels // *Neuron.* — 1999. — Vol. 22. — P. 549–558.
29. Zuhlke R.D., Pitt G.S., Deisseroth K. *et al.* Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels // *Nature.* — 1999. — Vol. 399. — P. 159–162.
30. Kamp T.J., Foell J.D. L-type Ca²⁺ channels in atrial fibrillation: wallflowers or a vanishing act // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2003. — Vol. 35. — P. 427–431.
31. Foell J.D., Balijepalli R.C., Delisle B.P. *et al.* Molecular Heterogeneity of Calcium Channel {beta} Subunits in Canine and Human Heart: Evidence for Differential Subcellular Localization // *Physiol. Genomics.* — 2004. — Vol. 17. — P. 183–200.
32. Wolfe J.T., Wang H., Perez-Reyes E. *et al.* Stimulation of recombinant Ca_v3.2, T-type, Ca²⁺ channel currents by CaMKIIgammaC // *J. Physiol. (Lond).* — 2002. — Vol. 538. — P. 343–355.
33. Brette F., Rodriguez P., Komukai K. *et al.* Beta-adrenergic stimulation restores the Ca²⁺ transient of ventricular myocytes lacking t-tubules // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2004. — Vol. 36. — P. 265–275.
34. Bean B.P. Multiple types of calcium channels in heart muscle and neurons. Modulation by drugs and neurotransmitters // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1989. — Vol. 560. — P. 334–345.
35. Fozzard H.A. Afterdepolarizations and triggered activity // *Basic. Res. Cardiol.* — 1992. — Vol. 87. — P. 105–113.
36. Nishida M., Mackinnon R. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution // *Cell.* — 2002. — Vol. 111. — P. 957–965.
37. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sinauer Ltd, Sunderland, MA. 1992. — 814 p.
38. Matsuda H., Saigusa A., Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K⁺ channel and blocking by internal Mg²⁺ // *Nature.* — 1987. — Vol. 325. — P. 156–159.
39. Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols C.G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification // *Nature.* — 1994. — Vol. 372. — P. 366–369.
40. Kreusch A., Pfaffinger P.J., Stevens C.F. *et al.* Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel // *Nature.* — 1998. — Vol. 392. — P. 945–948.
41. Gulbis J.M., Zhou M., Mann S. *et al.* Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-

dependent K⁺ channels // *Science*. — 2000. — Vol. 289. — P. 123–127.

42. Bouchard R.A., Clark R.B., Juhasz A.E. et al. Changes in Extracellular K⁺ Concentration Modulate Contractility of Rat and Rabbit Cardiac Myocytes via the Inward Rectifier K⁺ Current, I_{K1} // *J. Physiol.* — 2004. — Vol. 556 (Pt 3). — P. 773–790.

43. Sakmann B., Noma A., Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart // *Nature*. — 1983. — Vol. 303. — P. 250–253.

44. Pongs O. Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement // *FEBS Lett.* — 1999. — Vol. 452. — P. 31–35.

45. Fiset C., Clark R.B., Larsen T.S. et al. A rapidly activating sustained K⁺ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle // *J. Physiol. (Lond)*. — 1997. — Vol. 504. — P. 557–563.

46. Clark R.B., Tremblay A., Melnyk P. et al. T-tubule localization of the inward-rectifier K⁺ channel in mouse ventricular myocytes: a role in K⁺ accumulation // *J. Physiol.* — 2001. — Vol. 537. — P. 979–992.

47. Leonoudakis D., Mailliard W., Wingerd K. et al. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97 // *J. Cell. Sci.* — 2001. — Vol. 114. — P. 987–998.

48. Zaritsky J.J., Redell J.B., Tempel B.L. et al. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes // *J. Physiol.* — 2001. — Vol. 533. — P. 697–710.

49. Christie G. Localization of K⁺ channels in the tubules of cardiomyocytes as suggested by the parallel decay of membrane capacitance, I_{K1} and I_{KATP} during culture and by delayed I_{K1} response to barium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 1999. — Vol. 31. — P. 2207–2213.

50. Lipp P., Huser J., Pott L. et al. Spatially non-uniform Ca²⁺ signals induced by the reduction of transverse tubules in citrate-loaded guinea-pig ventricular myocytes in culture // *J. Physiol.* — 1996. — Vol. 497 (Pt 3). — P. 589–597.

51. Mitcheson J.S., Hancox J.C., Levi A.J. Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture // *Pflugers. Arch.* — 1996. — Vol. 431. — P. 814–827.

52. Samie F.H., Berenfeld O., Anumonwo J. et al. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation // *Circ. Res.* — 2001. — Vol. 89. — P. 1216–1223.

53. Trautwein W., Dudel J. Zum mechanismus der membranwirkung des acetylcholin an der herzmuskelfaser // *Pflugers. Arch.* — 1958. — Vol. 266, № 3. — P. 324–334.

54. Soejima M., Noma A. Mode of regulation of the ACh-sensitive K⁺-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells // *Pflugers. Arch.* — 1984. — Vol. 400. — P. 424–431.

55. Doupnik C.A., Davidson N., Lester H.A. The inward rectifier potassium channel family // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 1995. — Vol. 5. — P. 268–277.

56. Krapivinsky G., Gordon E.A., Wickman K. et al. The G-protein-gated atrial K⁺ channel I_{K_{ACh}} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins // *Nature*. — 1995. — Vol. 374. — P. 135–141.

57. Lomax A.E., Rose R.A., Giles W.R. Electrophysiological evidence for a gradient of G protein-gated K⁺ current in adult mouse atria // *Br. J. Pharmacol.* — 2003. — Vol. 140. — P. 576–584.

58. Bard J., Kunkel M.T., Peralta E.G. Single Channel Studies of Inward Rectifier Potassium Channel Regulation by Muscarinic Acetylcholine Receptors // *J. Gen. Physiol.* — 2000. — Vol. 116. — P. 645–652.

59. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle // *Nature*. — 1983. — Vol. 305. — P. 147–148.

60. Inagaki N., Gono T., Clement J.P.T. et al. Reconstitution of I_{K_{ATP}}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor // *Science*. — 1995. — Vol. 270. — P. 1166–1170.

61. Zerangue N., Schwappach B., Jan Y.N. et al. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels // *Neuron*. — 1999. — Vol. 22. — P. 537–548.

62. Korchev Y.E., Negulyaev Y.A., Edwards C.R. et al. Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell // *Nat. Cell. Biol.* — 2000. — Vol. 2. — P. 616–619.

63. Warmke J.W., Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1994. — Vol. 91. — P. 3438–3442.

64. Sanguinetti M.C., Jiang C., Curran M.E. et al. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel // *Cell*. — 1995. — Vol. 81. — P. 299–307.

65. Trudeau M.C., Warmke J.W., Ganetzky B. et al. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family // *Science*. — 1995. — Vol. 269. — P. 92–95.

66. Wang Z., Zhang X., Fedida D. Regulation of transient Na⁺ conductance by intra- and extracellular K⁺ in the human delayed rectifier K⁺ channel Kv1.5 // *J. Physiol.* — 2000. — Vol. 523. — P. 575–591.

67. Ho W.K., Earm Y.E., Lee S.H. et al. Voltage- and time-dependent block of delayed rectifier K⁺ current in rabbit sino-atrial node cells by external Ca²⁺ and Mg²⁺ // *J. Physiol.* — 1996. — Vol. 494. — P. 727–742.

68. Ridley J.M., Milnes J.T., Zhang Y.H. et al. Inhibition of HERG K⁺ current and prolongation of the guinea-pig ventricular action potential by 4-aminopyridine // *J. Physiol. (Lond)*. — 2003. — Vol. 549. — P. 667–672.

69. Welch W.J., Brown C.R. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding // *Cell Stress Chaperones*. — 1996. — Vol. 1. — P. 109–115.

70. Zhou Z., Gong Q., Epstein M.L. et al. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 21061–21066.

71. Rajamani S., Anderson C.L., Anson B.D. et al. Pharmacological rescue of human K⁺ channel long-QT2

mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block // *Circulation*. — 2002. — Vol. 105. — P. 2830–2835.

72. Zhou Z., Gong Q., January C.T. Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274. — P. 31123–31126.

73. Splawski I., Shen J., Timothy K.W. et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1 and KCNE2 // *Circulation*. — 2000. — Vol. 102. — P. 1178–1185.

74. Kurokawa J., Motoike H.K., Kass R.S. TEA⁺-sensitive KCNQ1 constructs reveal pore-independent access to KCNE1 in assembled I_{Ks} channels // *J. Gen. Physiol.* — 2001. — Vol. 117. — P. 43–52.

75. Wollnik B., Schroeder B.C., Kubisch C. et al. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K⁺ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias // *Hum. Mol. Genet.* — 1997. — Vol. 6. — P. 1943–1949.

76. Bianchi L., Priori S.G., Napolitano C. et al. Mechanisms of I_{Ks} suppression in LQT1 mutants // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2000. — Vol. 279. — P. H3003–3011.

77. Kagan A., Yu Z., Fishman G.I. et al. The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 11241–11248.

78. Zhou W., Cayabyab F.S., Pennefather P.S. et al. HERG-like K⁺ channels in microglia // *J. Gen. Physiol.* — 1998. — Vol. 111. — P. 781–794.

79. Schwarz J.R., Bauer C.K. Ionic mechanisms underlying TRH-induced prolactin secretion in rat lactotrophs // *Russ. Fiziol. Zh. Im I.M. Sechenova*. — 1999. — Vol. 85. — P. 195–204.

80. Snyders D.J., Chaudhary A. High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line // *Mol. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 49. — P. 949–955.

81. Bauer C.K., Engeland B., Wulfsen I. et al. RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K⁺ current in clonal rat pituitary cells // *Receptors And Channels*. — 1998. — Vol. 6. — P. 19–29.

82. Smith P.L., Baukrowitz T., Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel // *Nature*. — 1996. — Vol. 379. — P. 833–836.

83. Spector P.S., Curran M.E., Zou A. et al. Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel // *J. Gen. Physiol.* — 1996. — Vol. 107. — P. 611–619.

84. Lu Y., Mahaut-Smith M.P., Varghese A. et al. Effects of premature stimulation on HERG K⁺ channels // *J. Physiol.* — 2001. — Vol. 537. — P. 843–851.

85. January C.T., Riddle J.M. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current // *Circ. Res.* — 1989. — Vol. 64. — P. 977–990.

86. Bian J., Cui J., McDonald T.V. HERG K⁺ channel activity is regulated by changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate // *Circ. Res.* — 2001. — Vol. 89. — P. 1168–1176.

ОЦЕНКА НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ L-ТЕАНИНА С ПОМОЩЬЮ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ТЕСТОВ НА РАЗНЫХ СРОКАХ ПОСТИШЕМИЧЕСКОГО ПЕРИОДА

*М.А. Зухурова, А.С. Дайнеко, Д.С. Лупан, М.С. Просвирнина,
А.В. Пискун, А.А. Барковская, Т.Д. Власов*

*ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

Зухурова Мавджуда Ашуровна — кандидат медицинских наук, аспирант кафедры патофизиологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова; *Дайнеко Анастасия Сергеевна* — студентка 6 курса Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова; *Лупан Дарья Степановна* — студентка 6 курса Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова; *Просвирнина Мария Сергеевна* — врач-интерн Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова; *Пискун Альбина Владимировна* — студентка 2 курса Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова; *Барковская Анна Александровна* — студентка 5 курса Санкт-Петербургского государственного университета; *Власов Тимур Дмитриевич* — доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патофизиологии, декан лечебного факультета СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, кафедра патофизиологии, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, 197022. Тел. 8(812)499–70–61. E-mail: tvlasov@yandex.ru (Власов Тимур Дмитриевич).

Резюме

Проведенное исследование направлено на оценку эффективности нейропротективного действия L-теанина (гамма-глутамилэтиламида) при экспериментальном ишемическом инсульте у крыс на сроках до 4 недель постишемического периода с помощью ряда неврологических и поведенческих тестов (шкала Гарсия, адгезивный тест, тест с вытягиванием языка, тест «Открытое поле») и разработку оптимальных критериев оценки постишемического повреждения на разных сроках постишемического периода. Теанин вводился внутривенно в дозах 1 мг/кг за 30 минут до окклюзии левой средней мозговой артерии (ЛСМА). Неврологические и поведенческие тесты проводились до ишемии и на различных сроках постишемического периода. Достоверное снижение показателей неврологического дефицита по шкале Гарсия отмечалось только на второй день постишемического периода. Достоверное снижение соматосенсорной чувствительности правой лапы наблюдалось до 2 недель постишемического периода, а двигательной функции языка — до 3 недель постишемического периода. Развитие поведенческих расстройств достоверно фиксировалось к 4 неделе постишемического периода. Введение L-теанина уменьшало неврологические и поведенческие расстройства у крыс на всех сроках постишемического периода; на ранних сроках постишемического периода из функциональных методов оценки наиболее воспроизводимы тесты, отражающие неврологический статус животных, в то время как поведенческие тесты более достоверны на поздних (2–4 недели) сроках постишемического периода.

Ключевые слова: L-теанин, шкала Garcia J.H., новый адгезивный тест, тест с вытягиванием языка, тест «Открытое поле».

NEUROPROTECTION EFFICIENCY ASSESSMENT OF L-THEANINE WITH THE HELP OF NEUROLOGICAL AND BEHAVIORAL TESTS ON DIFFERENT TERMS OF POSTISCHEMICAL PERIOD

M.A. Zukhurova, A.S. Daineko, D.S. Lupan, M.S. Prosvirina, A.V. Piskun, A.A. Barkovskaya, T.D. Vlasov

I.P. Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: I.P. Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, 6/8 Lev Tolstoy str., Saint-Petersburg, Russia, 197022. Tel. +7(812)499–70–61. E-mail: tvlasov@yandex.ru (*Timur D. Vlasov* — PhD, head of patofiziology laboratory).

Abstract

This study was aimed to evaluate neuroprotection efficiency of L-theanine (gamma-glutamylethylamide) in experimental brain ischemic damage in rats on late terms (till 4 weeks) of postischemical period using the line of neurological and behavioral tests (Garcia Score Test, Modified Sticky-Tape Test, Tongue Protrusion Test, Open Field Test). As well as to compare the efficiency of noticed tests, to produce optimal criteria of postischemical impairment assessment in different periods of time after ischemia. Theanine was administered intraperitoneally 1mg/kg 30 minutes before middle cerebral artery (MCA) occlusion. Neurological and behavioral tests were managed before and different times after ischemia. Significant neurological deficiency reduction according to Garcia Score Test was revealed only on the second day after left MCA occlusion. Significant right paw somatosensory sensitivity reduction was observed on the second week after ischemia. Significant tongue motion activity reduction was observed on the 1, 2 and 3 weeks after operation. L-theanine introduction significantly decrease the neurological deficiency manifestation. Behavioral disorders significantly were fixed since 4 week after ischemia. L-theanine introduction significantly level all disorders in rats. Thereby introduction of L-theanine as neuroprotector decrease an intensity of neurological deficiency and behavioral disorders in rats during the whole observed postischemical period; on the early term after ischemia the most effective tests of different functional disorders evaluation methods are neurological tests, as well as behavioral tests are more significant on the late (3–5 weeks) terms after ischemia.

Key words: L-theanine, Garcia Score Test, Modified Sticky-Tape Test, Tongue Protrusion Test, Open Field Test.

Статья поступила в печать 10.01.2013, принята к печати 15.01.2013.

Введение

В настоящее время цереброваскулярная патология по-прежнему остается одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения [1]. Более того прогнозируется рост смертности от ишемического инсульта до 6,7 млн человек к 2015 году, если не будут предприняты глобальные меры по борьбе с этой эпидемией [2]. Поэтому поиск новых методов защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения является приоритетной задачей.

Одним из наиболее безопасных и дешевых способов лечения инсультов является фармакологическая нейропротекция. Уменьшение участка некроза мозговой ткани является основной целью нейропротективной терапии. В то же время согласно многочисленным исследованиям не всегда размер некроза коррелирует с выраженностью неврологического дефицита. Оценка неврологического статуса с помощью различных неврологических и поведенческих тестов позволяет дифференцировать структуру повреждений нервной системы и их появление в разные сроки после ишемии, а также оценить эффективность нейропротективных свойств исследуемого препарата.

В настоящее время на фармакологическом рынке существует широкий спектр различных нейропротекторов, с различным механизмом и

мишенью действия. В то же время, несмотря на их выраженный нейропротективный эффект в эксперименте, четких доказательств их защитных эффектов у человека пока не получено [3]. В последние годы внимание исследователей стали привлекать не только фармакологические методы защиты от ишемического повреждения, но и факторы природного происхождения, в частности употребление чая [4]. Одним из механизмов защитного действия чая, который может непосредственно оказывать нейропротективное действие является L-теанин (гамма-глутамилэтиламид), аминокислота зеленого чая (*Camellia sinensis*) [4–9].

Есть данные, что L-теанин оказывает значимое защитное действие на головной мозг за счет:

- повышения интрацеребральной концентрации γ -аминобутирата с последующей стимуляцией специфических рецепторов типа а [10, 11];
- действия как конкурентного антагониста глутаматных рецепторов, т.к. L-теанин по структуре похож на возбуждающий нейротрансмиттер — глутаминовую кислоту (Рис. 1.) [12, 13];
- индукции высвобождения тормозных нейромедиаторов, таких как ГАМК и глицин [14];
- антиапоптотического эффекта на нейроны [9].

На ранних стадиях ишемии происходит выраженный подъем концентрации глутамата, в результате чего происходит мобилизация ионов

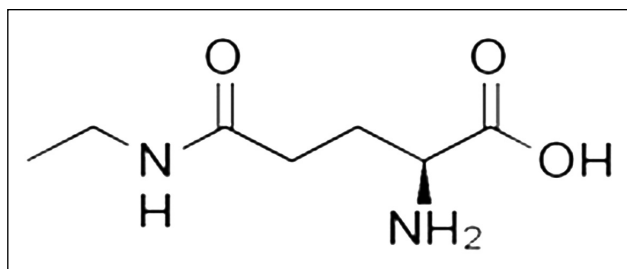


Рисунок 1. Молекула L-теанина

кальция из внутриклеточных депо, опосредованная как NMDA-рецепторами (рецептором N-метил-D-аспартата), так и не NMDA-рецепторами [13]. Чрезмерное накопление ионов кальция активирует различные внутриклеточные ферменты [15] и повышает концентрацию супероксидных радикалов [16], таким образом приводя к гибели нейронов [12]. L-теанин по своей структуре является аналогом глутамата и действует как конкурентный антагонист рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA), альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-изоксазол-4-пропионата (AMPA) и каинатных рецепторов, что приводит к уменьшению повреждения за счет торможения механизмов эксайтотоксичности [8, 17, 14]. В наших предыдущих работах было показано, что при ишемии мозга сочетанное введение L-теанина с NMDA или каиновой кислотой достоверно уменьшало их эксайтотоксическое действие, т.е. L-теанин оказывал нейропротективное действие при ишемии головного мозга за счет угнетения ишемической эксайтотоксичности посредством снижения NMDA-зависимого и каинатзависимого повреждения [6, 7].

Также предполагается, что нейропротективный эффект L-теанина может быть частично обусловлен активацией метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR), представляющих собой сцепленные с G-белком рецепторы, которые связывают глутамат и обеспечивают нервную возбудимость и синаптическую передачу в ЦНС [18, 19]. Активация mGluR проявляется повышенной экспрессией двух изоформ фосфорилаз (PC-beta1 и PC-gamma1), защищающих нейроны от оксидативного стресса [20–22]. Однако существуют противоречивые данные о нейротоксических и нейропротективных эффектах как агонистов, так и антагонистов I группы mGluR, что обуславливает необходимость дальнейшего изучения механизмов защитного эффекта теанина [19]. Нейропротективный эффект L-теанина связан не только с уменьшением ишемического и реперфузионного повреждения, но также с ингибированием апоптоза в нервной ткани, который является основным путем постишемической гибели клеток [9]. Данная гипотеза объясняет собственные данные, что L-теанин

уменьшает ишемическое-реперфузионное повреждение при введении препарата в позднем реперфузионном периоде (через 3 и 12 часов после начала реперфузии), влияя таким образом на отдаленные последствия ишемического и реперфузионного повреждения также, как и на ранние [5]. Таким образом, снижение эксайтотоксичности во время ишемического-реперфузионного повреждения и антиапоптотический эффект, предотвращающий нейрональную гибель в позднем реперфузионном периоде, вероятно, являются основными механизмами нейропротективного действия L-теанина.

Все исследования эффективности L-теанина производились на ранних сроках (до 48 часов) постишемического периода [6]. При этом отсутствуют данные по отдаленным нарушениям в постишемическом периоде (несколько недель), хотя на этих сроках может сохраняться неврологический дефицит, а также может отмечаться постишемическая энцефалопатия, сопровождающаяся психическими и поведенческими расстройствами.

Цель исследования

Оценить эффективность нейропротекции головного мозга крыс введением L-теанина с помощью неврологических и поведенческих тестов на поздних сроках (до 4 недель) постишемического периода.

Материалы и методы

Эксперименты проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85–23, США) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей редакцией Р.У. Хабриева, изд. второе, 2005.

В эксперименте использованы крысы-самцы линии Wistar массой 200–250 г. Животных содержали на стандартном рационе для лабораторных крыс К-120 («Информ-корм», Россия) со свободным доступом к еде и воде. Все оперативные вмешательства проводились под анестезией хлоралгидратом (430 мг/кг), внутрибрюшинно.

Все животные были разделены на три группы:

- ложнооперированные крысы — крысы, которым производилась перевязка общей сонной артерии ($n = 7$), группа «ложнооперированные»;
- ишемизированные крысы — крысы, прошедшие все этапы эксперимента без введения L-теанина ($n = 7$), группа «ишемия»;
- крысы, которым за 30 минут до окклюзии левой средней мозговой артерии вводился внутрибрюшинно L-теанин (Taio Kagaku, Япония) в дозе 1 мг/кг ($n = 10$), группа «теанин».

Основные этапы эксперимента:

- Отбор и предоперационное тестирование крыс с помощью функциональных тестов;
- Моделирование фокальной транзиторной ишемии головного мозга крыс путем окклюзии средней мозговой артерии по методике Koidzumi J., 1986 [23]. Ранее нами было показано, что при данной модели и сроках ишемии происходит преимущественное повреждение стриатума [24–26].
- Оценка неврологических и поведенческих расстройств у крыс с помощью шкалы Гарсия [27], «Нового адгезивного теста» [28], теста «Вытягивание языка» [29], теста «Открытое поле» [30] на разных сроках (до 4 недель) постишемического периода;
- Усыпление крыс производилось через 4 недели после операции.

Протокол операции: полипропиленовая нить (4–00, Ethicon) длиной 22 мм, обработанная силиконом и поли-L-лизином (далее — филамент), вводилась ретроградно в левую наружную сонную артерию, после чего проводилась через бифуркацию общей сонной артерии и внутреннюю сонную артерию к устью СМА, перекрывая его. Через 30 минут (продолжительность ишемии) нить извлекалась, рана ушивалась. Во время операции проводился контроль кровотока в бассейне левой средней мозговой артерии с помощью высокочастотной ультразвуковой доплерографии (ММ-Допплер-К —

25 МГц). Для этого формировалось трепанационное окно. В экспериментальные группы не включались животные, у которых сохранялся кровоток в бассейне левой средней мозговой артерии после введения филамента, а также животные, у которых не произошло восстановление кровотока в бассейне левой средней мозговой артерии после извлечения филамента.

(Рис. 2)

До операции, а также на 2, 7, 14, 21, 28 дни после операции проводились следующие тесты.

Оценка неврологического дефицита по шкале Garcia J.H. [27]

В данной методике оценивались 6 параметров, включающих в себя как моторный, так и чувствительный компоненты. Качество выполнения каждого параметра выражается в баллах от 1 до 3. Таким образом, максимально крыса могла получить 18 баллов, минимально — 3 балла.

Оцениваемые параметры:

1. Спонтанная активность в клетке за 5 мин.

В течение 5 минут проводилось наблюдение за животным в его нормальной окружающей среде (клетке). Активность крысы оценивалась по ее способности достичь всех четырех стен клетки, после чего выставлялись баллы по следующему принципу: 3 — крыса двигалась, изучала окружающую среду, и достигала по крайней мере трех стен клетки; 2 — крыса с поражением легкой степени двигалась по клетке, но не достигала всех сторон и двигалась нерешительно; 1 — крыса с тяжелым поражением не поднималась совсем и едва двигалась в клетке; 0 — крыса не двигалась совсем.

2. Симметричность движений конечностей.

Крыса подвешивалась в воздухе за хвост и наблюдалась симметричность движений четырех конечностей. Количество баллов означает: 3 — все четыре конечности вытягивались симметрично; 2 — конечности с левой стороны вытягивались меньше или более медленно, чем с правой стороны; 1 — ко-

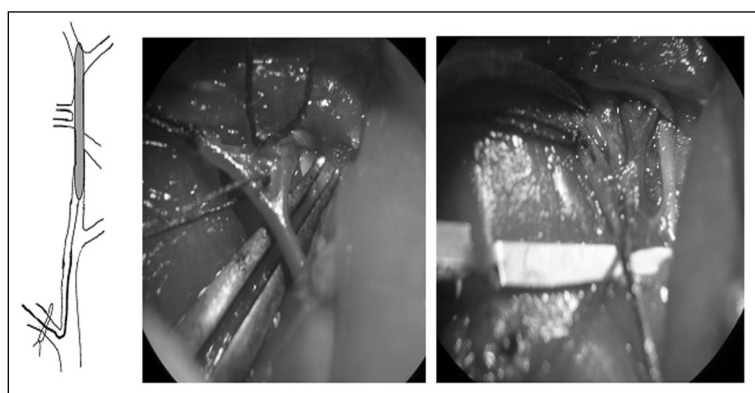


Рисунок 2. Схема и этапы операции

нечности с левой стороны демонстрировали минимальную двигательную активность; 0 — передняя конечность с левой стороны не двигалась совсем.

3. Вытягивание передних лап.

Крысу подносили к краю стола и заставляли идти на передних конечностях, в то время как ее держали за хвост. Наблюдала за симметричностью вытягивания обеих передних конечностей, когда крыса достигала стола, а задние конечности находились в воздухе. Количество баллов означает: 3 — обе передние конечности были вытянуты, и крыса шла, симметрично перебирая передними лапами; 2 — левые конечности вытягивались меньше, чем правые, и ходьба на передних конечностях была разобщена; 1 — левая передняя конечность двигалась минимально; 0 — левая передняя конечность не двигалась.

4. Способность забираться по стенке проводочной клетки.

Крысу сажали на вертикальную стенку проводочной клетки. В норме крыса использует все четыре конечности, чтобы забраться на стенку. Когда крысу снимали с клетки потягиванием за хвост, оценивалась сила, с которой животное удерживалось на клетке. Количество баллов означает следующее: 3 — крыса легко забиралась на стенку и крепко держалась за проволоку; 2 — движения левой стороны были разобщены с движениями правой, когда крыса забиралась, или левые лапы не зажимали проволоку так же крепко, как правые; 1 — крысе не удавалось забраться, или наблюдалась тенденция к хождению по кругу.

5. Реакция на прикосновение к каждой стороне туловища.

К каждой стороне тела крысы прикасались палочкой с иголкой на конце, и наблюдали за реакцией на стимул. Количество баллов означает следующее: 3 — крыса реагировала поворотом головы и была одинаково напугана стимулом, поступающим с обеих сторон; 2 — крыса медленно реагировала на

стимул с левой стороны; 1 — крыса не отвечала на стимул, расположенный с левой стороны.

6. Ответ на прикосновение к вибриссам.

Палочкой с иголкой на конце проводили против хода роста вибрисс на каждой стороне. Палочка двигалась по направлению к усам сзади, чтобы избежать вхождения в поле зрения крысы. Количество баллов означает следующее: 3 — крыса реагировала поворотом головы или была одинаково напугана стимулом, поступающим с обеих сторон; 2 — крыса медленно реагировала на стимул с левой стороны; 1 — крыса не отвечала на стимул, расположенный с левой стороны.

Новый адгезивный тест [28]

Проведение данного теста нацелено на определение координационных односторонних неврологических повреждений [28]. Липкая лента (Klebe bander, Германия) длиной 3 см, шириной 1 см закреплялась на запястье крысы (Рис. 3.). После этого крыса помещалась в клетку и наблюдалась в течение 30 секунд. Засекалось время, которое крыса тратит на попытки снять ленту, что отражает не только сохранность моторной функции, но и чувствительности. Использовались два таймера: первый работал без перерыва, а второй включался только во время попыток удалить ленту с лапы. Контралатеральная и ипсилатеральная конечности тестировались отдельно. Тест повторялся три раза в течение экспериментального дня, после чего два лучших результата усреднялись.

Тест «Вытягивания языка» [29]

В клинической практике одним из часто встречаемых признаков неврологического повреждения после инсульта является языковая дискоординация. Оценка длины высывания языка является относительно простым тестом, позволяющим оценить неврологический дефицит при повреждении орбитальной лобной коры и моторной зоны коры у крыс.

Длина высывания языка была измерена по следующей методике [29]. Стекланный цилиндр

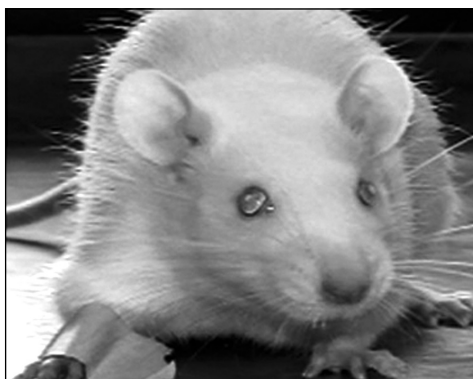


Рисунок 3. Новый адгезивный тест

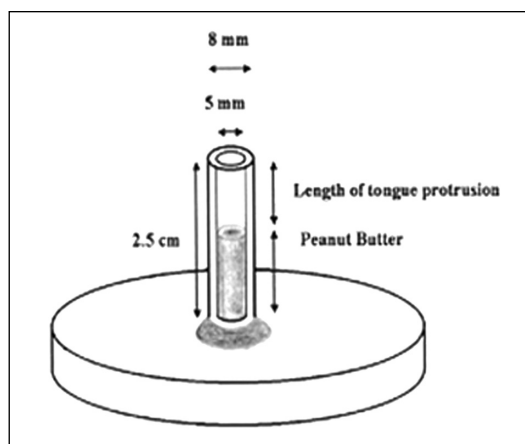


Рисунок 4. Аппарат для проведения теста «Вытягивание языка»

длиной 2,5 см с наружным диаметром 8 мм и внутренним диаметром 5 мм (Рис. 4.) фиксировался на наружной поверхности чашки Петри и заполнялся арахисовым маслом. Затем цилиндр помещался в домашнюю клетку крысы на всю ночь, и крыса имела возможность слизывать арахисовое масло из цилиндра. На этот период времени у животных не было доступа к еде при сохранении свободного доступа к воде. Утром оценивалась длина трубки, очищенная от масла, что коррелирует с двигательной активностью языка крысы. В норме длина трубки без масла составляет 9–11 мм.

Тест «Открытое поле» [30]

Тест позволяет оценить поведенческие реакции у крыс. Установка «Открытое поле» была изготовлена из белого пластика и представляла собой круглую камеру диаметром 1,25 м с высотой стенок 0,4 м. Дно камеры было расчерчено на 21 квадрат, площадью 625 см²; в точках пересечения линий разметки были сделаны отверстия (норки) диаметром 3,5 см (16 норок) (Рис. 5.).

Поведение животных в установке регистрировалось с помощью видеокамеры «Samsung-65X», после чего запись внимательно изучалась с целью оценки поведенческих реакций животных.

За два дня до начала эксперимента крыс приучали к рукам для снижения выраженности стрессорных реакций при проведении тестов.

Тестирование животных проводилось в темную фазу суточного светового цикла (с 20.00 до 24.00) при освещении тусклым рассеянным светом. В день тестирования крысы находились в помещении, в котором проводились тестирования 5–6 часов для того, чтобы привыкнуть к нему, после чего начинался непосредственно эксперимент. Животных сажали в центр установки и в течение 5 мин проводили съемку их поведения на видеокамеру. После каждого цикла тестирования поверхность установки обрабатывалась перекисью водорода для удаления запаха предыдущей крысы. Тестирование проводилось дважды, с промежутком между исследованиями 8 дней, чтобы исключить привыкание животных к

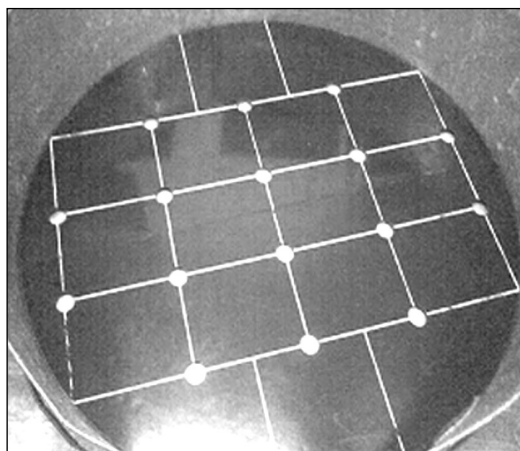


Рисунок 5. Установка для теста «Открытое поле»

Таблица 1

**ВРЕМЯ, ЗАТРАЧЕННОЕ ЖИВОТНЫМИ ПО УДАЛЕНИЮ ЛИПКОЙ ЛЕНТЫ
С ЛАПЫ ЗА 30-СЕКУНДНОЕ ВРЕМЯ НАБЛЮДЕНИЯ (В СЕКУНДАХ)**

Срок наблюдения	Лапа	Ложнооперированные	Ишемия	Теанин
до ишемии	левая	23,5 ± 1,9	22,4 ± 1,7	24,2 ± 1,4
	правая	24,5 ± 0,5	23,8 ± 0,9	24,3 ± 0,4
1 нед	левая	18,2 ± 1,6	16,8 ± 1,5	22,8 ± 2,1
	правая	22,0 ± 0,8	16,2 ± 2,0 *	21,0 ± 3,2
2 нед	левая	22,7 ± 0,8	20,6 ± 1,4	17,7 ± 2,1
	правая	24,3 ± 1,6	14,0 ± 2,1 *	18,7 ± 1,4
3 нед	левая	15,3 ± 1,1	19,4 ± 2,4	18,0 ± 2,3
	правая	16,3 ± 2,1	18,8 ± 2,2	18,3 ± 1,2
4 нед	левая	18,8 ± 3,0	16,8 ± 3,5	22,3 ± 2,4
	правая	17,3 ± 2,3	12,8 ± 2,9	16,5 ± 1,3

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой

данной процедуре. Согласно классическим представлениям, у крыс в установке «Открытое поле» проявляются ориентировочно-исследовательские и защитно-оборонительные реакции. Как правило, оценивают двигательную активность, ориентировочно-исследовательскую активность и психоэмоциональный статус животных. [31] Все эти показатели изменяются при введении в организм различных фармакологических препаратов [20], а также при действии на животного физических и социальных факторов [32].

Все показатели оцениваются по отдельным элементам поведения (паттернам), которые можно подсчитать по количеству и длительности.

К двигательной активности относятся паттерны:

– «локомоция» (перемещение на четырех лапах горизонтально по установке);

– «движение на месте» (т.е. перемещение передних лап в горизонтальной плоскости без движения задних лап);

– «сидение» (неподвижность);

К исследовательской активности относятся паттерны:

– «обнюхивание» (т.е. принюхивание и поворот головы без существенных изменений координат корпуса в вертикальной и горизонтальной плоскости);

– «норка» (заглядывание в круглое отверстие установки);

– «стойка с упором» (т.е. вертикальная стойка на задних лапах с упором передними в стенку);

– «вертикальная стойку» (вертикальная стойка на задних лапах);

К показателям тревожности относятся паттерны:

– «груминг» (вылизывание и почесывание);

– «фризинг» (замирание);

– количество актов дефекации (общее количество болюсов) и уринацию (общее количество мочеиспусканий).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета StatSoft Statistica v6.0 Multilingual. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Все показатели были представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение». Значения P менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

Результаты исследования

Оценка неврологического дефицита по шкале Гарсия

Только на второй день постишемического периода разница показателей неврологического дефицита между ложнооперированными крысами и группами «ишемия» и «теанин» достоверна ($p = 0,0003$). В последующие дни эта разница нивелировалась, что свидетельствует об относительно низкой чувствительности данного теста, хотя на ранних сроках постишемического периода различия между группами животных была достоверной.

Рис. 6.

Новый адгезивный тест

При дооперационном исследовании во всех группах крыс показатели теста были сходными (Таб. 1.). Достоверное снижение ($p = 0,0081$) соматосенсорной чувствительности правой лапки у крыс из группы «ишемия» наблюдалось на первой и второй неделе послеоперационного периода. Введение L-теанина достоверно уменьшало проявления неврологических расстройств.

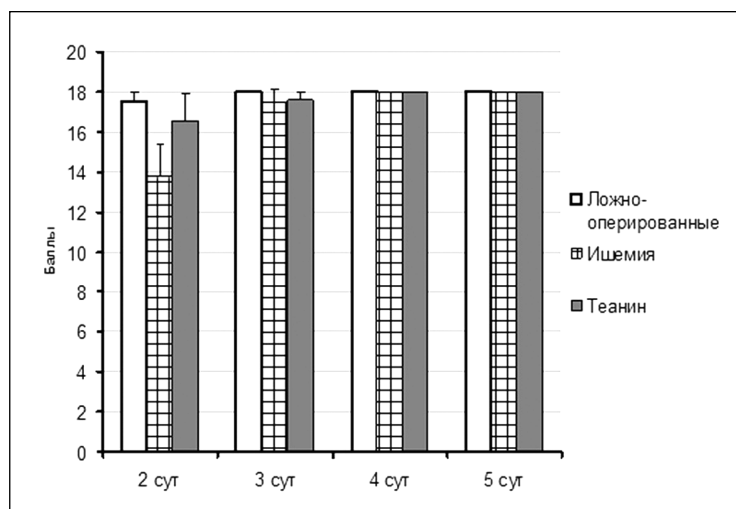


Рисунок 6. Изменение неврологического дефицита по шкале Гарсия на разных сроках постишемического периода

Тест «Вытягивание языка»

Окклюзия СМА достоверно вызывает дискоординацию языка, что проявляется достоверным снижением ($p = 0,036$) двигательной функции языка в группе «ишемия» по сравнению с другими группами крыс на 1 и 3 неделях постишемического периода. (Таб. 2.) К 4 неделе показатели двигательной функции языка во всех представленных группах крыс приближались к дооперационному уровню. Введение L-теанина оказывало благоприятное действие и на всех сроках постишемического периода уменьшало расстройство функции языка.

Таким образом, при исследовании неврологических расстройств после окклюзии СМА было выявлено, что неврологические тесты имеют разную чувствительность. Оценка неврологического дефицита по шкале Гарсия неэффективна на сроках более трех дней постишемического периода. Новый адгезивный тест и тест «Вытягивание языка» оказались более информативны на сроках 1–3 недели послеоперационного периода.

Тест «Открытое поле»

Первое тестирование животных проводилось за 5 дней до операции окклюзии СМА, второе тестирование через 48 часов после операции, третье и

последующие наблюдения поведенческих реакций в «Открытом поле» проведены ровно через одну, две, три и четыре недели после операции.

Оценка двигательной активности крыс

При анализе двигательной активности до операции практически у всех групп животных были получены сходные данные об их двигательной, исследовательской активности и тревожности; средние значения по группам достоверно не различались между собой.

Через 48 часов частота и длительность паттерна «локомоция» в группах «ишемия» и «теанин» достоверно снижаются по отношению к группе ложнооперированных животных. Также наблюдалось достоверное увеличение длительности паттерна «движение на месте» и достоверное снижение частоты паттерна «сидение на месте» в обеих экспериментальных группах животных. Различия между группой ложнооперированных крыс и группами «ишемия» и «теанин» были статистически достоверны ($p = 0,0073$ и $0,0033$ соответственно).

Таким образом, при анализе двигательной активности нами не получено достоверных различий между экспериментальными группами животных

Таблица 2

ГЛУБИНА СЪЕДЕННОГО СТОЛБИКА МАСЛА НА РАЗНЫХ СРОКАХ ПОСЛЕ ОККЛЮЗИИ СМА (В МИЛЛИМЕТРАХ)

Срок наблюден. группы	до опер	1 нед	2 нед	3 нед	4 нед
ложнооперир.	$9,2 \pm 0,3$	$9,2 \pm 0,4$	$9,0 \pm 0,4$	$9,0 \pm 0,5$	$9,3 \pm 0,2$
ишемия	$9,4 \pm 0,6$	$6,0 \pm 1,3 *$	$7,8 \pm 0,7$	$7,2 \pm 0,4 *$	$9,6 \pm 0,6$
теанин	$9,3 \pm 0,2$	$9,0 \pm 0,3$	$9,2 \pm 0,9$	$9,2 \pm 0,3$	$10,2 \pm 0,4$

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой.

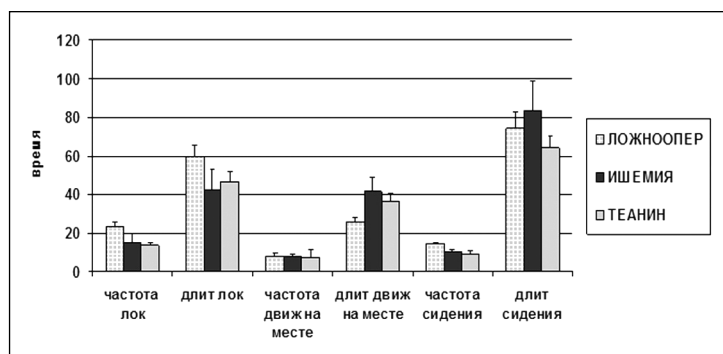


Рисунок 7. Двигательная активность крыс через 48 часов после окклюзии СМА

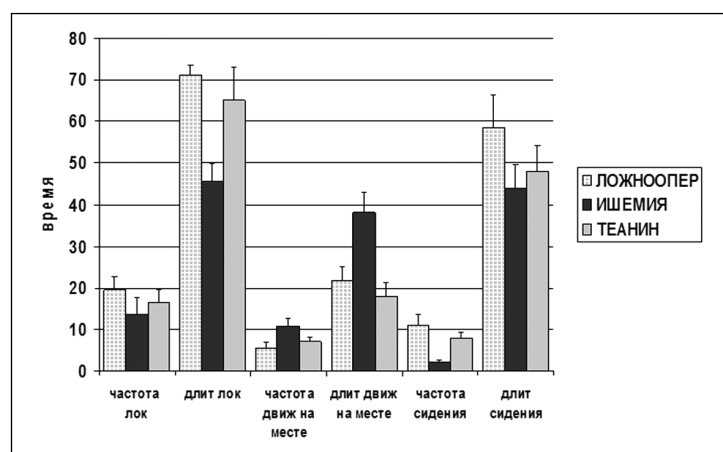


Рисунок 8. Двигательная активность крыс через 4 недели после окклюзии СМА

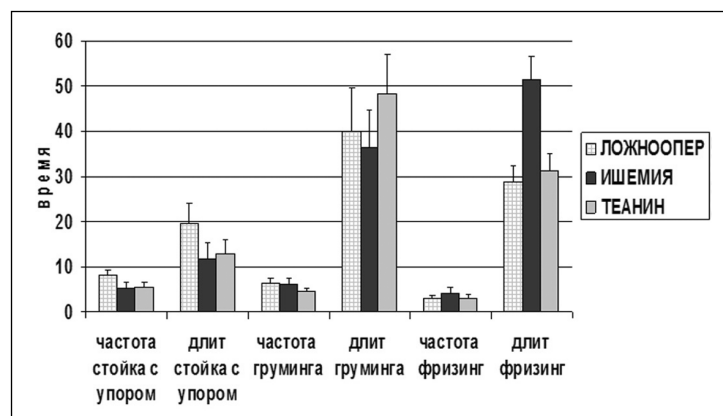


Рисунок 9. Показатели тревожности крыс через 48 часов после окклюзии СМА

на этом сроке наблюдения и можно сделать заключение, что теанин не влияет на параметры двигательной активности крыс через 48 часов после окклюзии СМА.

Через одну и две недели после операции показатели двигательной активности принципиально не отличались от изменений, которые были фиксированы через 48 часов (Рис. 7.)

На третьей и четвертой неделе постишемического периода отмечаются более выраженные нарушения двигательной активности крыс: в группе

«ишемия» уменьшались длительность «локомоции», частота «сидения на месте» и увеличивались показатели длительности «движения на месте» и частота «движения на месте» по сравнению с ложнооперированными животными. Все различия были максимально выраженными на четвертой неделе после окклюзии СМА (Рис. 8.).

Оценка тревожности крыс

По большинству признаков тревожности различия между опытными группами через 48 часов

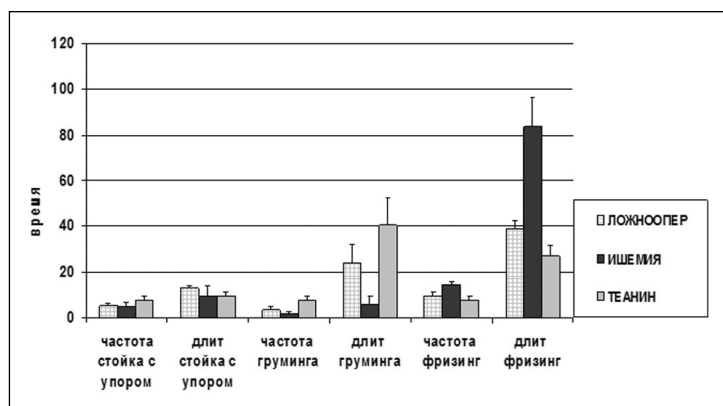


Рисунок 10. Показатели тревожности крыс через 4 недели после окклюзии СМА

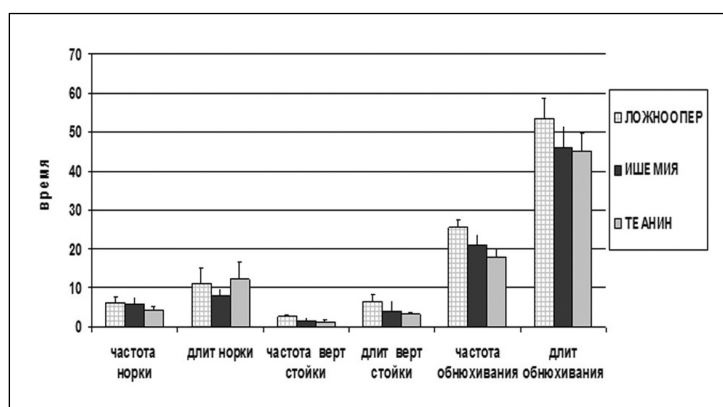


Рисунок 11. Показатели исследовательской активности крыс через 48 часов после окклюзии СМА

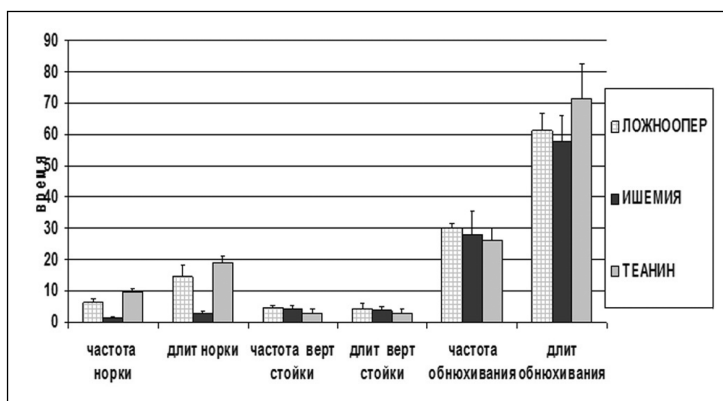


Рисунок 12. Показатели исследовательской активности крыс через 4 недели после окклюзии СМА

после операции были статистически недостоверными (Рис. 9.). Начиная с первой недели после операции у всех животных в группе «ишемия» отмечалось увеличение тревожности, что проявлялось увеличением частоты и длительности паттерна «фризинг», а начиная со второй недели отмечалось снижение частоты и длительности паттерна «груминг». Эти данные свидетельствуют о нарастании тревожности у крыс с ишемией по сравнению с ложнооперированными животными. Все изменения паттерна тревожного

поведения были максимально выражены к 4-й неделе наблюдения (Рис. 10), нарастая с каждой неделей.

Введение теанина достоверно уменьшало выраженность тревожности у крыс. На всех этапах исследования по большинству показателей (длительность и частота груминга и фризинга) не отмечалось достоверных различий между группой «теанин» и ложнооперированными животными (Рис. 9, 10).

Оценка исследовательской активности крыс

Через 48 часов наблюдалась тенденция к снижению общей исследовательской активности животных после проведенной операции. Длительность паттерна «норка», частота и длительность паттернов «обнюхивание» и «вертикальной стойки» имели тенденцию к снижению по сравнению с ложнооперированными животными. Однако достоверных различий между опытными группами («ишемия» и «теанин») не наблюдалось (Рис. 11).

Уменьшение исследовательской активности в опытных группах по сравнению с ложнооперированными животными сохранялось и в дальнейшем. К четвертой неделе наблюдения только показатели длительности и частоты паттерна «норка» были достоверно ниже в группе «ишемия» по сравнению с ложнооперированными животными (Рис. 12). Введение теанина достоверно приводило к улучшению состояния животных и показатели их исследовательской активности были такими же как в группе ложнооперированных животных.

Таким образом, исследование поведенческих реакций крыс с помощью теста «Открытое поле» привело к следующим результатам. Через 48 часов после окклюзии СМА выявляются незначительные различия нарушений поведенческих реакций крыс во всех группах. Со второй недели постишемического периода поведенческие расстройства в группе крыс «ишемия» постепенно нарастали и к четвертой неделе становились максимально выраженными. На этих сроках отмечалось достоверное положительное действие введения L-теанина, проявляющееся постепенной нормализацией поведенческих реакций крыс.

На основании проведенного исследования можно сделать заключение, что изменения поведенческих реакций могут служить косвенным признаком ишемического повреждения головного мозга крыс, оценка которых наиболее достоверна на поздних сроках (3–4 неделя) постишемического периода.

Обсуждение

Основным доказательством эффективности нейропротективных воздействий является уменьшение гистологического повреждения головного мозга и улучшение неврологических функции [33]. Однако, по мнению некоторых исследователей, объем некроза недостаточно хорошо коррелирует с неврологическими нарушениями у людей, перенесших инсульт [34]. Причина такого несоответствия не до конца изучена, вероятно, это связано с тем, что при сохранении жизнеспособности нейроны способны утрачивать свою передаточную функ-

цию из-за повреждения путей белого вещества, деструкции межнейронных соединений и гибели нейронов-мишеней [35]. Кроме того, оценка неврологических функций как у человека, так и у экспериментальных животных может не обладать достаточной чувствительностью, чтобы различать тонкие неврологические нарушения [34, 28]. Несмотря на эти трудности, разработано множество тестов для оценки неврологического дефицита [28]. Однако они обладают различной чувствительностью на разных сроках постишемического периода и в нашем исследовании проведение трех различных тестов также показало неодинаковую чувствительность. L-теанин оказал достоверный нейропротективный эффект, что в целом согласуется с нашими предыдущими исследованиями, а также с работами других авторов [4–6, 8].

Важно отметить, что нейропротективное действие L-теанина сопровождается длительным положительным эффектом, на сроке всего наблюдения за животными, в нашем случае до 4 недель после окклюзии СМА. Окраска головного мозга трифенилтетразолия хлоридом на более поздних сроках неинформативна, поскольку отражает жизнеспособность любых клеток, а через несколько недель в очаге повреждения присутствуют глиальные и соединительнотканые элементы. Поэтому мы оценивали выраженность ишемического повреждения с помощью функциональных тестов. Ожидалось, что максимально информативными окажутся неврологические тесты, в частности шкала Гарсия. Однако данный тест резко терял свою информативность уже через трое суток после ишемии мозга и не мог использоваться при более поздних наблюдениях. Новый адгезивный тест и тест «Вытягивание языка» были наиболее информативны на сроках 1–3 недели после ишемии, однако через 4 недели ни по одному из неврологических тестов не наблюдалось разницы между группой «ишемия» и ложнооперированными крысами. Некоторой неожиданностью оказались данные, что на позднем (4 недели) сроке оказался весьма показательным поведенческий тест «Открытое поле», который на раннем сроке постишемического периода (48 часов) после окклюзии СМА показал минимальные различия между контрольной и экспериментальными группами животных. Возможно, это связано с тем, что в качестве контрольной группы мы использовали ложнооперированных животных, которые переносили анестезию и оперативное вмешательство, что не могло не повлиять на их поведенческие реакции, в связи с чем на ранних сроках наблюдалась схожесть поведенческих реакций во всех группах животных. В тех случаях, когда изменения реакций крыс на ранних сроках

после ишемии были вызваны непосредственно ишемическим повреждением, значимых различий в обеих экспериментальных группах не выявлялось, и защитный эффект L-теанина не проявлялся.

Полученные нами данные о неинформативности теста «Открытое поле» при оценке постишемических расстройств у крыс на ранних сроках несколько противоречат данным Spencer S.J. и соавт. (2007), которые описывают различия поведенческих реакций между группами животных уже на третий день после окклюзии СМА. Данное противоречие, вероятно, связано с тем, что авторы проводили сравнение действия липополисахарида на поведение животных с ишемией головного мозга, а не эффект самой ишемии. В то же время наши данные подтверждаются работой Hamadate N. и соавт. (2010), в которой при оценке состояния крыс после транзиторной 30-минутной 4-х сосудистой ишемии головного мозга не было обнаружено различий в поведении крыс при его оценке с помощью теста «Открытого поля» через неделю после операции.

Выводы

- На ранних сроках постишемического периода из функциональных методов оценки наступивших расстройств наиболее воспроизводимы тесты, отражающие неврологический статус животных, в то время как поведенческие реакции более достоверны на поздних (3–5 недель) сроках постишемического периода.

- Введение L-теанина, как нейропротектора, сопровождалось снижением неврологического дефицита и расстройств поведенческих реакций у крыс на всех сроках постишемического периода.

Литература

1. Warlow C.P. Epidemiology of stroke // *Lancet*. — 1998. — Vol. 3, № 352. — P. 1–4.
2. Culebras A. Stroke is preventable catastrophic disease // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова (Приложение к журналу «Инсульт»). Материалы II Российского международного конгресса «Цереброваскулярная патология и инсульт». — 2007. — С. 75–76.
3. Peter A. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack 2008 // The European Stroke Organization (ESO) Executive Committee and the ESO Writing Committee. [Электронный ресурс] URL: <http://www.eso-stroke.org/recommendations>.
4. Власов Т.Д. Механизмы защиты головного мозга компонентами чая от ишемического повреждения // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. — 2012. — Т. 98. — № 8. — С. 929–942.
5. Дайнеко А.С. Исследование нейропротективных эффектов теанина в различных дозах и на различных сроках введения при фокальной ишемии головного мозга у крыс // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2012. — Т. 11. — Vol. 1, № 41. — С. 82–85.
6. Зухурова М.А. Механизмы нейропротективного эффекта компонента зеленого чая — L-теанина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2010. — Т. 9. — Vol. 4, № 36. — С. 67–71.
7. Зухурова М.А. Гипоксическое и фармакологическое preconditioning как механизмы защиты при фокальной ишемии головного мозга крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция — 2010. — Vol. 9, № 3. — С. 84–89.
8. Egashira N. Neuroprotective effect of gamma-glutamylethylamide (theanine) on cerebral infarction in mice // *Neurosci Lett*. — 2004. — Vol. 363, № 1. — P. 58–61.
9. Ekshyyan O. Apoptosis in acute and chronic neurological disorders // *Front. Biosci*. — 2004. — Vol. 9. — P. 1567–1576.
10. Egashira N. Involvement of GABA(A) receptors in the neuroprotective effect of theanine on focal cerebral ischemia in mice // *J. Pharmacol. Sci*. — 2007. — Vol. 105, № 2. — P. 211–214.
11. Kimura R. Influence of alkylamides of glutamic acid and related compounds on the central nervous system I. Central depressant effect of theanine // *Chem. Pharm. Bull*. — 1971. Vol. 19. — P. 1257–1261.
12. Kakuda T. Protective effect of gamma-glutamylethylamide (theanine) on ischemic delayed neuronal death in gerbils // *Neurosci. Lett*. — 2000. — Vol. 289, № 3. — P. 189–192.
13. Monaghan D.T. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. — 1989. — Vol. 29. — P. 365–402.
14. Yamada T. Theanine, gamma-glutamylethylamide, a unique amino acid in tea leaves, modulates neurotransmitter concentrations in the brain striatum interstitium in conscious rats // *Amino Acids*. — 2009. — Vol. 36, № 1. — P. 21–27.
15. Schanne F.A. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway // *Science*. — 1979. — Vol. 206, № 4419. — P. 700–702.
16. Lafon-Cazal M. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity // *Nature*. — 1993. — Vol. 364, № 6437. — P. 535–537.
17. Maruyama M. Electrophysiologically potent non-competitive glutamate antagonists at crayfish neuromuscular junctions are also potent inhibitors of [3H] MK801 binding to synaptic membranes from rat central nervous system // *Comp. Biochem. Physiol*. — 1994. — Vol. 107. — P. 105–110.
18. Nagasawa K. Possible involvement of group I mGluRs in neuroprotective effect of theanine // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. — 2004. — Vol. 320, № 1. — P. 116–122.
19. Nicoletti F. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection // *Neuropharmacology*. — 1999. — Vol. 38. — P. 1477–1484.
20. Лоскутова Л.В. Сверхмалые дозы антител к белку S100 и пептиду дельта-сна: Эффективность при

депрессивно-тревожном состоянии у крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. Приложение № 4. — С. 22–24.

21. *Lee Y.H.* Overexpression of phospholipase C β -1 protects NIH3T3 cells from oxidative stress-induced cell death // *Life Sci.* — 2000. — Vol. 67, № 7. — P. 827–837.

22. *Wang X.-T.* Oxidative stress-induced phospholipase C- α 1 activation enhances cell survival // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 28364–28371.

23. *Koizumi J.* Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area // *Jpn. J. Stroke.* — 1986. — Vol. 8. — P. 1–8.

24. *Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д.* Селективная гибель нейронов стриатума крысы после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии // *Морфология* — 2009. — Т. 135, № 2. — С. 80–82.

25. *Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Байса А.Е.* Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2009. — Т. 147. — № 2. — С. 217–219.

26. *Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г.* Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии // *Морфология* — 2012. — Т. 141. — № 2. — С. 28–32.

27. *Garcia J.H.* Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion

in rats. Statistical validation // *Stroke.* — 1995. — Vol. 26, № 4. — P. 627–634.

28. *Sughrue M.E.* An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats // *Journal of Neuroscience Methods* — 2006. — № 151. — P. 83–89.

29. *Gulyaeva N.* Tongue protrusion: a simple test for neurological recovery in rats following focal cerebral ischemia // *Journal of Neuroscience Methods.* — 2003. — Vol. 125. — P. 183–193.

30. *Подковкин В.Г., Иванов Д.Г.* Влияние краткосрочной изоляции на поведение крыс в тесте «Открытое поле» // *Успехи современного естествознания.* — 2009. — № 6.

31. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения // М.: Наука, — 1992. — 250 С.

32. *Смирнова Н.П.* Поведение крыс в «открытом поле» после воздействия магнитного поля // *Журнал ВНД им. Павлова.* — 1982. — № 1. — С. 72–81.

33. *Seshadri S.* The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham study // *Stroke.* — 2006. — № 37. — P. 345–350.

34. *Fisher M.* Recommendations for clinical trial evaluation of acute stroke therapies // *Stroke.* — 2001. — Vol. 32. — P. 1598–1606.

35. *Corbett D., Nurse S.* The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia // *Prog. Neurobiol.* — 1998. — Vol. 54. — P. 531–548.

ВОЛОСАТО — КЛЕТОЧНЫЙ ЛЕЙКОЗ. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ

Е.А. Стадник^{1, 2}

¹ ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² ГОБУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет
им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия

Стадник Елена Александровна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института гематологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ассистент кафедры факультетской терапии, врач-гематолог ГОБУ ВПО Санкт — Петербургского Государственного Медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. Тел.: (812) 702–37–65. E-mail: elena_stadnik@mail.ru (Стадник Елена Александровна).

Резюме

Волосато-клеточный лейкоз — редко встречающееся хроническое лимфопролиферативное заболевание, впервые описанное в 1958 году Bourncle et al. Его субстратом являются лимфоидные клетки В-клеточного происхождения, которые имеют характерную морфологию — крупные размеры (примерно в 2 раза больше нормального малого лимфоцита), округлое, овальное или бобовидное ядро и тонкие выросты цитоплазмы, от которых и произошло название заболевания.

Клинические проявления на момент постановки диагноза могут варьировать от минимальных (или вообще полностью отсутствовать) до выраженной панцитопении и гепатоспленомегалии. Но наиболее характерным является наличие в дебюте заболевания лейкопении (в особенности — моноцитопении), анемии, тромбоцитопении и спленомегалии. В 95 % случаев в крови пациентов обнаруживаются характерные «волосатые» лимфоциты.

В диагностике основная роль отводится иммуногистохимическому исследованию трепанбиоптата, так как получить аспират костного мозга часто не удаётся из-за его выраженного фиброза и, в связи с этим, проточная цитометрия имеет меньшее значение.

В основе терапии ВКЛ в настоящее время лежит использование аналогов нуклеозидов (кладрибина и пентостатина). Применение этих препаратов сравнимо по эффективности и позволяет добиться полной ремиссии и долгосрочной выживаемости у большинства пациентов. Добавление к терапии ритуксимаба может улучшить ее результаты.

Сейчас основной нерешённой проблемой при волосато-клеточном лейкозе является определение тактики ведения больных, не достигших полной ремиссии на фоне стандартной терапии.

Ключевые слова: волосато-клеточный лейкоз, иммуногистохимия, цитопения, кладрибин, ремиссия.

HAIRY CELL LEUKEMIA. GUIDELINE FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT

Е.А. Stadnik^{1, 2}

¹ Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

² Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341, Phone: (812) 702-37-65, E-mail: elena_stadnik@mail.ru (Elena A. Stadnik — PhD., senior researcher of hematology institute).

Abstract

Hairy cell leukemia is a rare lymphoproliferative neoplasm. It was first described in 1958 by Bournocle et al. It is morphologically characterized by presence of large cells of B-lymphoid origin, which have characteristic morphology. These cells are approximately twice bigger than normal small lymphocyte, their nuclei are typically round, oval or monocytoid, and they have irregular cytoplasmic projections, which gave this disease its name. Clinical state of the patients at diagnosis may vary from minimal or asymptomatic disease to marked pancytopenia and hepatosplenomegaly. The most common features in clinical presentation of the disease are leukopenia (especially monocytopenia), anemia, thrombocytopenia and splenomegaly. Hairy cells are detected in peripheral blood smears of approximately 95 % of patients.

Bone marrow trephine biopsy with immunohistochemical study plays central role in HCL diagnosis, especially because of high frequency of dry tap in these patients due to marked marrow fibrosis. This also diminishes the role of flow cytometry.

Current mainstay of HCL treatment is using of nucleoside analogues (cladribine and pentostatine). These drugs are similar in terms of efficacy and toxicity and produce remissions and long-term survival in majority of patients. Addition of rituximab to this therapy may increase its effectiveness.

The main unsolved problem in HCL treatment nowadays is management of patients which have not achieved complete remission after standard treatment.

Key words: hairy cell leukemia, immunohistochemistry, cytopenia, cladribine, remission.

Статья поступила в печать 01.10.12, принята к печати 20.10.12.

Волосато-клеточный лейкоз (ВКЛ) — хроническое В-клеточное лимфопролиферативное заболевание, впервые описанное в 1958 году [1]. ВКЛ встречается с частотой 2 % от всех лейкозов взрослых и 8 % среди других хронических лимфопролиферативных заболеваний. Это патология является наиболее характерной для мужчин средней возрастной группы (соотношение мужчин и женщин составляет 4–5 : 1, медиана возраста — 50 лет).

Частота встречаемости клинико — лабораторных проявлений в дебюте заболевания выглядит следующим образом:

1. Спленомегалия — у 60–70 % пациентов.
2. Гепатомегалия — у 40–50 % пациентов.
3. Лимфоаденопатия — у 10 % пациентов.
4. Анемия — у 70 % пациентов.
5. Тромбоцитопения — у 80 % пациентов.
6. Нейтропения — у 75 % пациентов.
7. Моноцитопения — у 90 % пациентов.
8. «Волосатые» лимфоциты в мазках периферической крови — у 95 % пациентов.

У некоторых больных может не отмечаться никаких симптомов и тогда заболевание является случайной находкой при взятии клинического анализа крови. Но чаще отмечаются клинические проявления панцитопении, в особенности, инфекции на фоне агранулоцитоза. «Волосатые» лимфоциты в мазках периферической крови встре-

чаются практически всегда, но количество их может варьировать.

Диагностика:

1. Мазок периферической крови: патологические лимфоциты имеют характерную морфологию. Они в два раза больше нормальных клеток, имеют округлое, овальное или «почкообразное ядро» с включениями свободного хроматина и тонкие выросты цитоплазмы [2].

2. Аспират костного мозга: его исследование, как правило, не информативно, так как получить качественный материал удастся только у 10 % пациентов. Причиной этому является диффузный фиброз костного мозга.

3. Трепанбиопсия: является обязательной диагностической процедурой. При гистологическом исследовании выявляется диффузный фиброз стромы костного мозга, представленный ретикулиновыми волокнами, между которыми отмечается очаговая или диффузная инфильтрация «волосатыми» лимфоцитами.

4. Иммуногистохимия: на парафиновых срезах можно определить экспрессию антигенов CD20, CD72 и тартрат — резистентной кислой фосфатазы (TRAP). Сочетанная экспрессия CD72 и TRAP является диагностическим критерием волосато — клеточного лейкоза [3]. Антителом к антигену CD72

является DBA.44. Для диагностики применяются также специфические моноклональные антитела к CD11c, CD25, CD123. Но наиболее высокоспецифичным современным маркером ВКЛ является аннексин A1, так как он, в отличие от других антигенов, практически никогда не экспрессируется при других хронических В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях [4]. Однако, его нельзя использовать для оценки минимальной остаточной болезни, так как его экспрессия может выявляться на некоторых миелоидных клетках и Т-лимфоцитах [5]. Из особенностей, с которыми можно столкнуться при проведении иммуногистохимического исследования, необходимо отметить, что в 50 % случаев ВКЛ может выявляться ядерная экспрессия циклина D1, однако характерная морфология клеток и гистологическая картина костного мозга при ВКЛ позволяют провести дифференциальный диагноз с лимфомой из клеток зоны мантии [6]. В 20 % случаев выявляется экспрессия CD10, что никак не отражается на течении заболевания и ответе на лечение [7].

5. Диагностика минимальной остаточной болезни: для ее выявления также необходимо выполнение трепанбиопсии. Ретикулиновый фиброз стромы исчезает еще до полной элиминации опухолевых клеток, поэтому одного гистологического исследования недостаточно. При проведении иммуногистохимического исследования рекомендовано использование анти-CD20 антитела для выявления остаточной популяции В-лимфоцитов, которые могут располагаться как кластерами, так и диффузно. Применение других, более специфичных для ВКЛ антител не рекомендовано.

6. Иммунофенотипирование: его проведение рекомендовано в случае проведения успешной аспирации костного мозга и/или наличии опухолевых клеток в периферической крови. Используется панель антител для выявления моноклональных В-лимфоцитов: CD19, CD20, CD22, Smlg, FMC7, а также панель, специфичная для ВКЛ: CD11c, CD25, CD103, CD 123 [8].

7. Гистологическое исследование ткани селезенки: спленэктомия в диагностических целях не показана, однако, в случае ее проведения, можно выявить необычную гистологическую картину. Она проявляется инфильтрацией красной пульпы с нарушением нормальной архитектоники балок и синусоидов в сочетании с атрофией белой пульпы. При всех остальных хронических В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях (за исключением лимфомы красной пульпы селезенки (Foucar et al.) отмечается инфильтрация белой пульпы. Также необходимо помнить, что такая же гистологическая

картина встречается при ВКЛ с пролимфоцитарной морфологией.

8. Цитохимическое исследование: его проведение в настоящее время утратило свою диагностическую ценность в связи с доступностью моноклональных антител, реагирующих с тартрат-резистентной кислотой фосфатазой на гистологических срезах.

9. Молекулярно-биологическое исследование: выявление мутации V600E в гене BRAF [9]. Это недавно выявленная находка приобретает приоритетное значение в диагностике и мониторинге эффективности терапии ВКЛ, а в будущем, возможно, явится мишенью для разработки новых таргетных препаратов. Исследование рекомендуется проводить всем пациентам с впервые диагностированным ВКЛ.

Оценка факторов прогноза:

1. Панцитопения, обусловленная инфильтрацией костного мозга и спленомегалией с уровнем гемоглобина менее 100 г/л, тромбоцитов менее 100×10^9 /л, нейтрофилов менее $1,0 \times 10^9$ /л в дебюте заболевания связана с относительно неблагоприятным прогнозом [10].

2. Внутривенная лимфоаденопатия связана с плохим ответом на терапию и меньшей общей выживаемостью [11, 12]. Поэтому выполнение КТ/УЗИ органов брюшной полости перед началом терапии имеет диагностическую ценность.

3. Ответ на терапию пуриновыми аналогами. Худший прогноз отмечается у пациентов, у которых после проведения лечения получена только частичная ремиссия [13]. В исследовании Else et al. показано, что медиана бессобытийной выживаемости у пациентов, находящихся в полной ремиссии не достигнута за 20-летний период наблюдения. У больных с частичной ремиссией она составила всего 4 года. Прогностическое значение ответа на терапию при ВКЛ доказано и при проведении многофакторного анализа [14].

4. Ответ на спленэктомию. Оценивается только в случае ее проведения по показаниям, определяемым в индивидуальном порядке. В случае нормализации показателей клинического анализ крови после ее выполнения, прогноз считается благоприятным.

Рекомендации по диагностике ВКЛ:

1. Для постановки диагноза ВКЛ необходимо выполнение мазка периферической крови и гистологического исследования костного мозга.

2. В случае доступности аспирата костного мозга необходимо выполнение иммунофенотипирования с использованием антител CD11c, CD25, CD103, CD123.

3. При проведении иммуногистохимического исследования костного мозга необходимо обязательное использование антител анти-CD20 и DBA.44

4. При оценке качества ремиссии (выявление минимальной остаточной болезни) после проведенной терапии проводится иммуногистохимическое исследование с определением уровня экспрессии CD20.

5. При постановке диагноза ВКЛ желателно проведение исследования на наличие мутации V600E в гене BRAF.

Лечение

Показания к началу терапии определяются индивидуально. В случае отсутствия симптомов заболевания и нормальной картины периферической крови допускается выжидательная тактика.

Основными показаниями к началу терапии являются выраженная панцитопения, наличие инфекционных осложнений и симптоматическая спленомегалия.

Учитывая высокий риск развития оппортунистических инфекций, наличие выраженной моноцитопении +/- нейтропении также может служить основанием для начала лечения даже при отсутствии других клинических проявлений.

I. Терапия первой линии

Основными препаратами, рекомендованными в терапии первой линии ВКЛ, являются два аналога нуклеозидов — пентостатин и кладрибин. Оба препарата вызывают хороший ответ у большинства пациентов (более 80 %), который сохраняется на протяжении многих лет [15, 16]. Хотя рандомизированных исследований по сравнению эффективности этих препаратов не проводилось, по данным разных исследований не получено больших различий в их эффективности и токсичности.

Пятилетняя выживаемость при ВКЛ в настоящее время составляет 95–98 %, поэтому эффективность терапии рекомендуется оценивать по продолжительности безрецидивной выживаемости.

Целью терапии является максимальная элиминация опухолевого клона. Поэтому терапия любым из препаратов должна проводиться до достижения полной ремиссии. Для тех пациентов, которые нуждаются в повторных курсах терапии пентостатином или повторном введении кладрибина, частоту достижения полного ответа можно повысить при помощи добавления к лечению 6–8 введений ритуксимаба [17].

Режим введения пентостатина:

4 мг/м² каждые 2 недели до достижения максимального ответа (4–10 введений) с последующими одной или двумя дополнительными инъекциями в рамках консолидации достигнутого эффекта. Необходимо учитывать, что проведение терапии пентостатином возможно только пациентам с сохранной функцией почек (клиренс креатинина должен быть не менее 60 мл/мин.). При клиренсе от 40 до 60 мл/мин доза редуцируется вдвое. Вводится путем в/в инфузии на объеме 1500 мл.

Режим введения кладрибина

В разных исследованиях кладрибин вводился пациентам разными способами: пролонгированная внутривенная инфузия в течение 7 дней, 2-х часовая внутривенная инфузия в течение 5 дней, ежедневные подкожные инъекции 5 дней подряд [18], ежедневные подкожные инъекции 5–6 недель подряд. В рандомизированных исследованиях не было выявлено различий в эффективности и переносимости препарата при разных режимах введения [19, 20]. В самых ранних исследованиях по использованию кладрибина при ВКЛ пациенты получали пролонгированную инфузию препарата [21], поэтому период наблюдения за этими больными достаточно большой. Данные по подкожному и внутривенному болюсному введению препарата появились несколько позже. Необходимо отметить, что одинаковая биодоступность кладрибина при подкожном и болюсном введении была подтверждена данными фармакологических исследований [22].

Учитывая удобство ежедневного подкожного введения препарата, данный режим является предпочтительным для применения в первой линии терапии ВКЛ. В случае достижения частичной ремиссии целесообразно проведение второго аналогичного курса.

Исходя из вышеизложенного, схемы введения кладрибина выглядят следующим образом:

- 0,1 мг/кг/день в виде постоянной инфузии в течение 7 дней. Повторное введение через 6 месяцев, в случае, если полная ремиссия не была достигнута.

- 0,14 мг/кг/день в виде двухчасовой инфузии в течение 5 дней. Повторное введение через 6 месяцев, в случае, если полная ремиссия не была достигнута.

- 0,14 мг/кг/день в виде внутривенной инфузии 1 раз в неделю в течение 6 недель. Повторное введение через 6 месяцев, в случае, если полная ремиссия не была достигнута.

- 0,14 мг/кг/день в виде подкожной инъекции в течение 5 дней. Повторное введение через 6

месяцев, в случае, если полная ремиссия не была достигнута.

- 0,14 мг/кг/день в виде подкожной инъекции 1 раз в неделю в течение 5 недель. Повторное введение через 6 месяцев, в случае, если полная ремиссия не была достигнута.

При проведении терапии кладрибином необходимо учитывать:

1. В связи с наиболее частым осложнением при введении кладрибина в виде высыпаний на кожных покровах, рекомендуется минимизировать количество препаратов из сопроводительной терапии в дни проведения инфузий.

2. После окончания введения препарата — необходимо профилактическое назначение ко-тримоксазол и ацикловира.

3. После проведения терапии аналогами пуринов пациенты пожизненно должны получать только облученные гемокомпоненты [23].

Оценка ответа на лечение:

Проводится после нормализации показателей клинического анализа крови (за исключением лимфопении). Как правило, это происходит через 4–6 месяцев после окончания лечения.

Критерии полной ремиссии:

- Исчезновение органомегалии и цитопении
- Отсутствие в периферической крови и костном мозге «волосатых» лимфоцитов
- При иммуногистохимическом исследовании трепанбиоптата не выявляется кластеров (более трех клеток) из CD20 — позитивных лимфоцитов.

Критерии частичной ремиссии:

- Исчезновение цитопении
- Уменьшение органомегалии и степени инфильтрации костного мозга на 50 % и более.
- Отсутствие в периферической крови «волосатых» лимфоцитов.

Роль минимальной остаточной болезни при ВКЛ:

Несмотря на очень хороший клинический ответ на терапию пентостатином и кладрибином, известно, что у многих пациентов после окончания лечения определяется минимальная остаточная болезнь (МОБ) [24, 25]. Данные некоторых исследований показали, что при проведении терапии ВКЛ аналогами пуринов в комбинации с ритуксимабом, у 90 % пациентов при помощи молекулярных и иммунологических методов исследования не выявляется МОБ [26–28]. В то же время продемонстрировано, что МОБ может выявляться у больных на протяжении многих лет без признаков рецидива и прогрессии заболевания [29]. Таким образом, полная эрадикация МОБ не

должна являться целью лечения ВКЛ в рутинной клинической практике.

I. Терапия рецидивов:

Большинство пациентов, получавших терапию аналогами нуклеозидов, в случае возникновения рецидива заболевания достигают повторной ремиссии как при терапии пентостатином, так и кладрибином. Выбор препарата для лечения рецидива зависит от продолжительности первой ремиссии. Если она длилась менее 2-х лет — рекомендуется замена пентостатина на кладрибин (и наоборот). Если ремиссия была длительной — возможно применение препарата, который использовался в первой линии лечения. Продолжительность достигнутых полных ремиссий не зависит от количества линий предшествующей терапии, однако количество их снижается с каждым последующим рецидивом (Else et al, 2009).

При терапии рецидивов могут быть рекомендованы комбинации кладрибина или пентостатина с ритуксимабом [30].

Практический опыт лечения пациентов с ВКЛ, не ответивших на один из нуклеозидных аналогов, или ставших рефрактерными, указывает на отсутствие перекрестной резистентности между кладрибином и пентостатином [31].

II. Лечение рефрактерного заболевания:

При резистентности к пентостатину, и к кладрибину, может быть рекомендовано применение ритуксимаба. Наиболее оптимальным является режим с еженедельным введением препарата в дозе 375 мг/м² в течение 2-х месяцев (8 введений) [32]. В исследовании Nieva et al. ответ был достигнут у 12 из 15 пациентов, причем у 8 зарегистрирована полная клиника — гематологическая ремиссия, подтвержденная исследованием костного мозга [33].

Роль Ритуксимаба в терапии ВКЛ (суммарно 6–8 введений):

375 мг/м² в виде внутривенной инфузии один раз в одну или две недели в монотерапии или совместно с аналогами пуринов у пациентов:

- не достигших полной ремиссии после терапии пентостатином или кладрибином в первой линии лечения,
- при проведении терапии по поводу рецидива заболевания
- в монотерапии в случае рефрактерности ко всем аналогам пуринов.

Интерферон — альфа:

3 млн ЕД/день до достижения максимального ответа с последующим переходом на введение этой дозы 3 раза в неделю [34]. Может быть

рекомендован для пациентов с выраженной цитопенией в дебюте заболевания, когда целью терапии является первоначальное достижение восстановления нормального кроветворения с последующим переходом на терапию аналогами пуринов [35].

Спленэктомия:

Выполняется при выраженной спленомегалии (более 10 см ниже реберной дуги) и незначительном поражении костного мозга.

Рекомендации по терапии ВКЛ:

1. При постановке диагноза ВКЛ у части пациентов при отсутствии симптомов заболевания допустима выжидательная тактика.

2. Лечение необходимо начинать при симптоматических цитопениях и спленомегалии.

3. В первой линии терапии ВКЛ используются аналоги пуринов — пентостатин и кладрибин. Разницы в эффективности и токсичности при использовании этих препаратов не получено.

4. Подкожное введение кладрибина является оптимальным методом лечения.

5. Пациентам, получившим терапию пуриновыми аналогами, нельзя проводить трансфузию необлученных гемокомпонентов на протяжении всей жизни.

6. После окончания введения аналогов пуринов необходимо проводить профилактическое лечение ацикловиром и ко-тримоксазолом до повышения уровня сегментоядерных нейтрофилов более $1,0 \times 10^9/\text{л}$

7. Пациенты, которые после терапии аналогами пуринов перенесли герпетическую инфекцию или пневмоцистную пневмонию, должны получать ацикловир и ко-тримоксазол до тех пор, пока число CD4-позитивных лимфоцитов не станет более $0,2 \times 10^9/\text{л}$.

8. Ответ на терапию оценивается через 4–6 месяцев с момента окончания введения препаратов, после нормализации показателей клинического анализа крови.

9. Если полная ремиссия не достигнута, необходимо повторное введение аналогов пуринов, возможно, с добавлением ритуксимаба.

10. Полная эрадикация минимальной остаточной болезни не должна быть целью терапии.

11. Пациенты, у которых произошел рецидив после терапии аналогами пуринов, должны получить терапию повторно или тем же самым препаратом, или его аналогом в зависимости от сроков возникновения рецидива. В этом случае рекомендовано добавление к лечению ритуксимаба.

12. В случае рефрактерности к аналогам пуринов целесообразно проведение монотерапии ритуксимабом.

13. Рутинное применение ростовых факторов не рекомендовано.

14. При симптоматической спленомегалии и минимальном вовлечении в процесс костного мозга, может быть рекомендована спленэктомия.

Литература

1. *Bouroncle B.A., Wiseman B.K. & Doan C.A.* Leukemic reticuloendotheliosis // *Blood*. — 1958. — № 13. — P. 609–630.

2. *Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al.* The French-American-British (FAB) Cooperative Group, Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias // *Journal of Clinical Pathology*. — 1989. — Vol. 42 — P. 567–584.

3. *Went P.T., Zimpfer A., Pehrs A. et al.* High specificity of combined TRAP and DBA.44 expression for hairy cell leukaemia // *American Journal of Surgical Pathology*. — 2005. — Vol. 29. — P. 474–478.

4. *Falini B., Tiacci E., Liso A. et al.* Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1) // *Lancet*. — 2004. — Vol. 363. — P. 1869–1870.

5. *Foucar K., Falini B., Catovsky D. & Stein, H.* Hairy cell leukaemia. In: WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. — IARC Press, Lyon. — 2008. — P. 188–190.

6. *Miranda R.N., Briggs R.C., Kinney M.C. et al.* Immunohistochemical detection of cyclin D1 using optimized conditions is highly specific for mantle cell lymphoma and hairy cell leukaemia // *Modern Pathology*. — 2000. — Vol. 13. — P. 1308–1314.

7. *Chen Y.H., Tallman M.S., Goolsby C. & Peterson L.* Immunophenotypic variations in hairy cell leukemia// *American Journal of Clinical Pathology*. — 2006. — Vol. 125. — P. 251–259.

8. *Del Giudice I., Matutes E., Morilla R. et al.* The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes // *Haematologica*. — 2004. — Vol. 89. — P. 303–308.

9. *Tiacci E., Trifonov V., Schiavoni G. et al.* BRAF mutations in hairy cell leukemia // *New England Journal of Medicine*. — 2011. — Vol. 364. — P. 2305–2315.

10. *Else M., Dearden C.E., Matutes E. et al.* Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis // *British Journal of Haematology*. — 2009. — Vol. 145. — P. 733–740.

11. *Mercieca J., Puga M., Matutes E. et al.* Incidence and significance of abdominal lymphadenopathy in hairy cell leukaemia // *Leukaemia and Lymphoma*. — 1994. — Vol. 14, № 1. — P. 79–83.

12. *Mercieca J., Matutes E., Emmett E., Coles H. & Catovsky D.* 2-chlordeoxyadenosine in the treatment of hairy cell leukaemia: differences in response in patients with and

without abdominal lymphadenopathy // *British Journal of Haematology*. — 1996. — Vol. 93. — P. 409–411.

13. *Maloisel F., Benboubker L., Gardembas M. et al.* Long-term outcome with pentostatin treatment in hairy cell leukemia in patients. A French retrospective study of 238 patients // *Leukemia*. — 2003. — Vol. 17. — P. 45–51.

14. *Dearden C.E., Else M. & Catovsky D.* Longterm results for pentostatin and cladribine treatment of hairy cell leukemia. *Leukaemia and Lymphoma*. — 2011. — Vol. 52, № 2. — P. 21–24.

15. *Zinzani P.L., Tani M., Marchi E. et al.* Long-term follow-up of the front-line treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine // *Haematologica*. — 2004. — Vol. 89. — P. 309–313.

16. *Zinzani P.L., Pellegrini C., Stefoni V. et al.* Hairy cell leukaemia: evaluation of the longterm outcome in 121 patients // *Cancer*. — 2010. — Vol. 116. — P. 4788–4792.

17. *Cervetti G., Galimberti S., Andreazzoli F. et al.* Rituximab as treatment for minimal residual disease in hairy cell leukaemia // *European Journal of Haematology*. — 2004. — Vol. 73. — P. 412–417.

18. *Juliussen G., Heldal D., Hippe E. et al.* Subcutaneous injections of 2-chlorodeoxyadenosine for symptomatic hairy cell leukaemia // *Journal of Clinical Oncology*. — 1995. — Vol. 13. — P. 989–995.

19. *Robak T., Jamrozak K., Gora-Tybor J. et al.* Cladribine in a weekly versus daily schedule for untreated hairy cell leukemia: final report from the Polish Adult Leukaemia Group (PALG) of a prospective, randomised, multicenter trial // *Blood*. — 2007. — Vol. 109. — P. 3672–3675.

20. *Zenhausern R., Leupin N., Hsu Schmitz S.-F. et al.* A randomized study of daily versus weekly administration of 2-chlorodeoxyadenosine in patients with hairy cell leukemia // *Blood*. — 2007. — Vol. 110. — P. 1352.

21. *Chadha P., Rademaker A.W., Mendiratta P. et al.* Treatment of hairy cell leukaemia with 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA): long-term follow-up of the Northwestern University experience // *Blood*. — 2005. — Vol. 106. — P. 241–246.

22. *Liliemark J., Albertioni F., Hassan M. & Juliusson G.* On the bioavailability of oral and subcutaneous 2-chloro-2'-deoxyadenosine in humans: alternative routes of administration // *Journal of Clinical Oncology*. — 1998. — Vol. 10. — P. 1514–1518.

23. *Treleaven J., Gennery A., Marsh J. et al.* Guidelines on the use of irradiated blood components prepared by the

British Committee for Standards in Haematology blood transfusion task force // *British Journal of Haematology*. — 2011. — Vol. 152. — P. 35–51.

24. *Pileri S., Sabattini E., Poggi S. et al.* Bone marrow biopsy in hairy cell leukaemia (HCL) patients, histological and immunohistological analysis of 46 cases treated with different therapies // *Leukemia and Lymphoma*. — 1994. — Vol. 14, № 1. — P. 67–71.

25. *Konwalinka G., Schirmer M., Hilbe W. et al.* Minimal residual disease in hairy cell leukaemia after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine // *Blood Cells Molecules and Diseases*. — 1995. — Vol. 21. — P. 142–151.

26. *Cervetti G., Galimberti S., Andreazzoli F. et al.* Rituximab as treatment for minimal residual disease in hairy cell leukaemia extended follow-up // *British Journal of Haematology*. — 2008. — Vol. 143, P. 296–298.

27. *Else M., Osuji N., Forconi F. et al.* The role of rituximab in combination with pentostatin or cladribine for the treatment of recurrent, refractory hairy cell leukaemia // *Cancer*. — 2007. — Vol. 110. — P. 2240–2247.

28. *Ravandi F., Jorgensen J.L., O'Brien S.M. et al.* Eradication of minimal residual disease in hairy cell leukaemia // *Blood*. — 2006. — Vol. 107. — P. 4658–4662.

29. *Sigal D.S., Sharpe R., Burian C. & Saven A.* Very long-term eradication of minimal residual disease in patients with hairy cell leukaemia after a single course of cladribine // *Blood*. — 2010. — Vol. 115. — P. 1893–1896.

30. *Else M., Dearden C.E., Matutes E. et al.* Rituximab with pentostatin or cladribine; an effective combination treatment for hairy cell leukaemia after disease recurrence // *Leukemia and Lymphoma*. — 2011. — Vol. 52, № 1. — P. 75–78.

31. *Grever M.R.* How I treat hairy cell leukaemia // *Blood*. — 2010. — Vol. 115. — P. 21–28.

32. *Thomas D.A., O'Brien S., Bueso-Ramos C. et al.* Rituximab in relapsed or refractory hairy cell leukemia // *Blood*. — 2003. — Vol. 102. — P. 3906–3911.

33. *Nieva J., Bethel K. & Saven L.* Phase 2 study of rituximab in the treatment of cladribine-failed patients with hairy cell leukaemia // *Blood*. — 2003. — Vol. 102, P. 810–813.

34. *Dearden C. & Catovsky D.* Treatment of hairy cell leukaemia with 2-deoxycytosine // *Leukemia and Lymphoma*. — 1990. — Vol. 1. — P. 179–185.

35. *Catovsky D.* Clinical experience with 2-deoxycytosine // *Hematology and Cell Therapy*. — 1996. — Vol. 38. — P. 103–107.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ АРТРОПАТИЙ

*Д.А. Жебрун¹, А.Л. Маслянский¹,
Э.А. Джавадова², О.С. Пругло²*

¹ ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ высшего профессионального образования
«Кировская государственная медицинская академия» Минздрава РФ

Жебрун Дарья Анатольевна — младший научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; *Маслянский Алексей Леонидович* — старший научный сотрудник НИЛ ревматологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; *Эллада Астановна Джавадова* — научный сотрудник Коми филиала ГБОУ высшего профессионального образования «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава РФ; *Олег Сергеевич Пругло* — научный сотрудник Коми филиала ГБОУ высшего профессионального образования «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: zhebrun@almazovcentre.ru (*Жебрун Дарья Анатольевна*).

Резюме

В данном обзоре рассматриваются вопросы использования мезенхимных стволовых клеток (МСК) в терапии воспалительных и невоспалительных артропатий на примерах ревматоидного артрита (РА) и остеоартроза (ОА). Несмотря на то, что за последние десятилетия был достигнут существенный прогресс в понимании механизмов патогенеза РА и ОА, совершенствовании подходов к их ранней диагностике и разработке новых методов терапии, эти заболевания остаются основными причинами необратимого повреждения суставов, требующих проведения эндопротезирования. В связи с этим, подход, базирующийся на клеточной терапии и сочетающий в себе иммуносупрессивный и регенераторный потенциалы, может стать одним из методов истинно патогенетической терапии артропатий, позволяющих замедлить темпы прогрессирования заболевания и улучшить прогноз.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, остеоартроз, мезенхимные стволовые клетки (МСК).

MESENCHYMAL STEM CELLS IN TREATMENT OF ARTHROPATHIES

A. Zhebrun¹, A.L. Maslyansky¹, E.A. Dgavadova², O.S. Pruglo²

¹ Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

² State Medical Academy, Syktyvkar, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: zhebrun@almazovcentre.ru (Daria Zhebrun — junior Researcher of the Immunology Laboratory).

Abstract

In this review we discuss the possibilities of treatment of inflammatory and non-inflammatory arthropathies (mainly rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA)) with mesenchymal stem cells. In recent decades essential progress was reached in understanding pathogenesis of RA and OA, development of early diagnostic and

therapeutic methods. However these diseases still are the main reason of irreversible joint damage requiring endoprosthesis replacement. Thereby cell therapy-based approaches, which combine both immunosuppressive and regenerative capacities, can become one of the effective ways of pathogenetic arthropathy treatment, enabling to slow down disease progression and improve the prognosis.

Key words: rheumatoid arthritis, osteoarthritis, mesenchymal stem cells.

Статья поступила в редакцию 01.10.2012, принята к печати 15.11.2012.

Ревматические заболевания (РЗ) относятся к числу наиболее важных и социально значимых форм патологии человека, что связано с их широкой распространенностью, тенденцией к поражению лиц трудоспособного возраста и для многих из них — инвалидизирующим характером течения. Среди РЗ доминирующей патологией являются воспалительные и невоспалительные артропатии — группа заболеваний, характеризующихся преимущественным поражением суставов — среди которых лидирующие позиции принадлежат остеоартрозу (ОА) и ревматоидному артриту (РА).

Так, частота встречаемости диагностированного остеоартроза составляет > 5 % (данные сильно зависят от возраста обследуемой популяции), ревматоидного артрита — 0,8–1,2 % [1]. По оценкам эпидемиологов, диагноз ОА в настоящее время установлен приблизительно 27 миллионам взрослых в США, диагноз РА — 1,5 миллионам [2]. По данным официальной статистики, в РФ в 2002 году было зафиксировано порядка 280 000 больных РА, однако эти данные представляются серьезно заниженными. Следует указать, что эти цифры сравнимы с распространенностью таких заболеваний, как артериальная гипертензия и сахарный диабет.

За последние десятилетия был достигнут существенный прогресс в понимании механизмов патогенеза РЗ, прежде всего РА и ОА, совершенствовании подходов к их ранней диагностике и разработке новых методов терапии. Однако, несмотря на это, по данным статистики США за последние 15 лет ревматоидный артрит и остеоартроз остаются основными причинами инвалидизации больных и основными причинами необратимого повреждения суставов, требующих проведения эндопротезирования [3].

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое аутоиммунное системное заболевание соединительной ткани, при котором воспалительный процесс преимущественно поражает периферические суставы с развитием в них эрозивно-деструктивных изменений.

Согласно современным представлениям, РА является гетерогенным заболеванием. В зависимости от серологического профиля больных РА выделяют

серопозитивную и серонегативную формы этого заболевания, которым присущи клинические, иммунологические и генетические различия [4].

Лучше изучен патогенез серопозитивного варианта РА. В настоящее время хорошо задокументирован факт генетической ассоциации между носительством генов главного комплекса гистосовместимости класса IIHLADR 4 и DRI, несущих аминокислотную последовательность, названную «общий антигенный эпитоп», и риском развития серопозитивного РА у носителя, а также тяжести течения заболевания, а также продемонстрирован эффект дозы гена на тяжесть течения РА. Наряду с HLA, для серопозитивного варианта РА описаны ассоциации с генами, кодирующими пептидиларгининдеиминазы (PAD 1–4,) а также RPTN22 [5]. Для этого варианта РА доказана триггерная роль некоторых факторов внешней среды, прежде всего курения, но также приема оральных контрацептивов и избыточного употребления кофе [6, 7]. Молекулярный механизм этого явления связывают с усилением процессов цитруллинирования аутологических белков под влиянием вышеперечисленных средовых факторов, что приводит к формированию аутоантигенных субстанций с дальнейшей презентацией аутоантигенов лимфоидным клеткам иммунной системы (в составе «общего антигенного эпитопа») и селекцией артритогенных клонов лимфоцитов.

Скандинавскими исследователями при анализе банков данных образцов ткани (крови) доказан факт возникновения иммунологических нарушений (продукции аутоантител) за многие годы до момента клинической манифестации заболевания [8].

Возникновение и прогрессирование синовита обусловлено нарушением механизмов аутоотолерантности с развитием лимфоцитарного иммунного ответа на присутствующие в суставе антигены. Среди вероятных аутоантигенов, вовлеченных в патогенез РА, в настоящее время называют цитруллинированный фибриноген, Sa антиген, α -енолазу, цитруллинированные белки вируса Эпштейна-Барра, а также Fc-фрагмент иммуноглобулина G, многие из которых могут быть обнаружены в синовиальной оболочке, больных РА [9].

Формирование клонов аутореактивных Т-лимфоцитов (CD4) и В-лимфоцитов приводит к гиперпродукции аутоантител и формированию иммунных комплексов. Иммунные комплексы способствуют продукции синовиоцитами хемокинов, привлекающих в полость пораженного сустава нейтрофилов, а также оказывают активирующее влияние на метаболизм моноцитов/макрофагов. Активация моноцитов/макрофагов сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, в частности $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$, а также металломатрикспротеиназ, которые определяют процессы деструкции костной и хрящевой ткани.

При серонегативном ревматоидном артрите у пациентов не обнаруживаются аутоантитела (антитела к цитруллинированным пептидам и ревматоидный фактор), а также отсутствуют указания на ассоциацию с общим антигенным эпитопом, а также провоцирующую роль средовых факторов. Его развитие связывают с носительством HLA A1, HLAB8, DRB1*03 генотипа. Тем не менее, морфологическая картина изменений синовиальной оболочки практически не отличима при обоих клинико-иммунологических вариантах РА: основным проявлением заболевания являются эктопические очаги гиперплазии синовиальной оболочки (паннус), инвазивный рост которой приводит к деструкции костной и хрящевой ткани [6].

Основной составляющей паннуса являются фибробластоподобные синовиоциты (типа В) и воспалительные клетки (преимущественно несущие маркеры активации CD4, моноциты/макрофаги, около 5 % В-клеток, плазматические клетки, тучные клетки, синовиоциты типа А). Неотъемлемая черта паннуса — активный ангиогенез, что объясняется как спектром экспрессируемых его клетками цитокинов и хемокинов, так и процессами тканевой гипоксии.

Таким образом, механизм индукции воспалительного процесса у больных серонегативным РА остается менее понятным. Эти пациенты отличаются по характеру ответа на иммуносупрессивные препараты. В частности, в отличие от больных серопозитивным РА, их характеризует худший ответ на препараты, нарушающие взаимодействие Т-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток (абатацепт), а также на анти В-клеточную терапию [10, 11]. Вышесказанное позволяет предполагать, что у больных серонегативным РА более выражен компонент «аутовоспалительного», нежели собственно аутоиммунного патогенетического механизма.

Важнейшей особенностью поражения суставов при РА является доминирование деструкции

костно-суставной ткани в отсутствие характерного для воспаления репаративного компонента. Это объясняют:

1) Спектром продуцируемых при РА цитокинов (гиперпродукция $TNF\alpha$ и $IL-1$, характеризующихся высоким катаболическим потенциалом)

2) Минимальной способностью хрящевой ткани к репарации

3) Персистированием воспаления

Согласно рекомендациям рабочей группы ACR/EULAR, основной целью при лечении больного ревматоидным артритом является максимально продолжительное сохранение высокого качества жизни, связанного с состоянием здоровья, путем контроля клинических проявлений, предотвращения структурного поражения суставов, нормализации функционирования и социальных возможностей пациента. В качестве способа достижения этой цели предлагается максимально раннее, полное и интенсивное подавление активности иммунновоспалительного процесса с помощью широкого спектра базисных препаратов (получившее название концепции «treat to target») [12].

Хотя эффективность такого подхода в целом не вызывает сомнений, обращает на себя внимание ряд обстоятельств:

1) Учитывая объективные сложности ранней диагностики заболевания (атипия клинической картины в дебюте), на момент постановки диагноза пациент как правило уже имеет необратимые изменения хрящевой ткани

2) Существует существенная когорта длительно болеющих больных, так называемым «поздним» РА, с далеко зашедшим эрозивно-деструктивным процессом, имеющим выраженные деформации

3) До настоящего времени не существует универсально эффективных базисных препаратов, и остается когорта больных, у которых на фоне терапии сохраняется неприемлемо высокая активность заболевания

В связи с этим представляется оправданным использование подходов, базирующихся на клеточной терапии, и сочетающих как иммуносупрессивный, так и регенераторный потенциал. Имплантация культуры аутологичных или аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (внутрисуставная инъекция или имплантация на биополимерном носителе) может быть эффективным терапевтическим подходом, обеспечивающим регенерацию хрящевой ткани у таких пациентов, и способствующим купированию синовита. Альтернативным способом введения МСК может быть их внутривенная инфузия. Эффективность данного метода ранее была показана в клинических ис-

следованиях при болезни «трансплантат против хозяина», и в настоящее время активно изучается при широком круге аутоиммунных заболеваний человека (<http://www.clinicaltrials.gov>). Очевидно, что при таком пути введения можно рассчитывать в первую очередь на иммуносупрессивный эффект МСК, тогда как регенераторный потенциал будет существенно меньшим. Хотя способность МСК при системном пути введения мигрировать в очаги поражения доказана (что опосредуется CXCR₄), однако численно доля поступившей из кровотока фракции оказывается невелика.

Остеоартроз — гетерогенная группа заболеваний, различных по пораженным суставам и этиологии, но сходные клинические, морфологические, биологические проявления, в основе которых лежит поражение всех компонентов сустава, в первую очередь хряща, но также субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы, около-суставных мышц. Данная патология представляет собой наиболее распространенную нозологическую форму дегенеративных заболеваний суставов и характеризуется хроническим прогрессирующим течением. По данным ревматологов Европы и США, на долю этого заболевания приходится до 69–70 % всех ревматических болезней [3]. ОА значительно ухудшает качество жизни больных и представляет серьезную социально-экономическую проблему, являясь одной из основных причин стойкой потери трудоспособности.

ОА является мультифакториальным заболеванием, основными предрасполагающими к развитию заболевания факторами являются ожирение, пожилой возраст и травматическое повреждение сустава. Эти же факторы предрасполагают к более тяжелому течению патологического процесса и более быстрой инвалидизации.

Предполагают, что одним из механизмов реализации средовых факторов на возникновение ОА является изменение биомеханики пораженного сустава (в том числе опосредованно, через возрастные нарушения периартикулярного мышечного и связочного аппарата) с формированием перегрузки участков субхондральной кости и гиалинового хряща [13].

Результатом является дисфункция хондроцитов с гиперпродукцией широкого спектра металломатрикспротеиназ, субклинического синовита с гиперпродукцией IL-1 и TNF α уровни которых однако оказываются существенно меньшими, чем при РА (lowgradeinflammation) [14].

Это приводит к прогрессирующему снижению объема гиалинового хряща, нарушению его функции, утрате конгруэнтности суставных по-

верхностей, изменению свойств синовиальной жидкости.

Возможно, в патогенезе ОА определенную роль играет гибель хондроцитов за счет увеличения апоптоза этих клеток.

Следует указать что существующие консервативные подходы к лечению ОА характеризуются преимущественно симптоматическим действием, и не позволяют значимо замедлить темпы деградации хрящевого матрикса, и, соответственно, прогрессирующую инвалидизацию больных. Они не влияют на важнейший патогенетический механизм заболевания — дегенерацию суставного хряща, и в связи с этим не замедляют темпы инвалидизации пациентов и не улучшают отдаленный прогноз. Возможность целенаправленного влияния на репаративный потенциал хрящевой ткани с помощью внутрисуставной имплантации мезенхимальных стволовых клеток позволит качественно повысить уровень оказания медицинской помощи у данной категории больных.

Согласно современным представлениям взрослая стволовая клетка определяется как недифференцированная клетка в составе органа или ткани, способная к самоподдержанию и дифференцировке в некоторые или все типы специализированных клеток данного органа или ткани.

МСК впервые были идентифицированы Friedenstein и соавт., которые наблюдали адгезирующие на пластике мононуклеарные клетки в культуре костного мозга морской свинки. Клетки формировали фибробласто-подобные колонии и проявляли способность к остеогенезу, хондрогенезу и адипогенезу [15]. С тех пор клетки, обладающие МСК-подобными характеристиками, стали обнаруживать не только в мезодермальных тканях (таких как костный мозг, губчатая ткань костей, синовиальная оболочка, хрящ, жир, мышцы), но также и в тканях энтодермального (тимус, печень) и эктодермального (кожа, волосные фолликулы, твердая мозговая оболочка, зубная пульпа) происхождения [16].

Костный мозг является достаточно удобным источником для получения МСК, и свойства данных клеток очень интенсивно изучаются. В отличие от гематопоэтических СК, МСК костного мозга не имеют уникальных клеточных маркеров на поверхности. Наоборот, они экспрессируют целый ряд поверхностных антигенов: Stro-1, CD105, CD73, CD44, CD90, CD106 (VCAM-1), CD166, CD29/CD49 and CD200; в то же время МСК не несут на своей поверхности CD45, CD14 и CD34, маркеров, являющихся специфичными для лейкоцитов, моноцитов и гематопоэтических СК,

соответственно [17–23]. Истинный фенотип МСК до сих пор остается неясным.

В настоящее время считается, что клетки, являющиеся МСК, должны соответствовать трем критериям: адгезироваться на пластике; обладать определенным фенотипом: CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD14-, CD11b-, CD34-; обладать способностью дифференцироваться, по меньшей мере, в хондроциты, остеобласты и адипоциты [24]. К тому же, под действием соответствующих активирующих сигналов МСК могут переключаться на дифференцировку в клетки других типов. Такими сигналами являются, в первую очередь, факторы роста, гипоксия и окружение, в котором находится клетка, тоже играют немаловажную роль [25].

Даже внутри субпопуляции МСК костного мозга клетки можно разделить в соответствии с их разными биологическими свойствами или стадией коммитирования. В одном исследовании, в котором использовались не иммортализованные МСК, было показано, что только 30 % клеток обладают свойством к дифференцировке в клетки трех типов, тогда как остальные 70 % клеток могут давать только остеобласты и хондроциты, или только остеобласты [26].

Внутри сустава МСК также локализуются в надкостнице, синовиальной оболочке, жировой ткани, перихондрии, хряще. МСК из ткани синовиальной оболочки проявляют сходные с МСК костного мозга фенотип и способность к дифференцировке. Они экспрессируют маркеры стромальных клеток, в том числе CD9, CD44, CD54, CD90 and CD166. Субпопуляция CD9+/CD90+/CD166+ является мультипотентной и способна к хондрогенной, остеогенной и адипогенной дифференцировке. Однако анализ транскриптомов двух популяций клеток показал различия в показателях экспрессии: так, в МСК синовиума повышен уровень экспрессии MIP2-α, IL-8 и IL-6, тогда как в МСК костного мозга — нейрегулина, IGF2, OX40L и активина [27].

МСК-подобные CD105+ и CD166+ клетки-предшественники из хрящевой ткани под действием нужных сигналов дифференцируются в остеобласты, хондроциты и адипоциты. Интересно, что в хряще пациентов с остеоартритом содержание МСК составляет около 7 % от общего количества клеток, тогда как у пациентов без остеоартрита это цифра доходит только до 3 % [28]. Нормальные пролиферирующие клетки хряща, так же как и МСК костного мозга, экспрессируют Notch-1, трансмембранный рецептор, регулирующий судьбу клетки и ее дифференцировку. Количество таких клеток увеличено у пациентов с остеоартритом.

Помимо своего потенциала к достаточно широкой дифференцировке, МСК также обладают иммуномодулирующими свойствами, оказывая антипролиферативное и противовоспалительное действие. Установлено, что МСК ингибируют пролиферацию Т-клеток и их активацию в ответ на митогенную или антигенную стимуляцию *in vitro*. МСК также подавляют созревание и функции наивных Т-хелперов, Т-клеток памяти и CD4+ and CD8+ Т-клеток в смешанных культурах лимфоцитов. МСК вызывают арест клеток в фазе G0-G1, а также предотвращают CD8+ опосредованный лизис [29]. Некоторые исследования показывают способность МСК супрессировать функции В-клеток, натуральных киллеров, дендритных клеток, а также способность ингибировать экспрессию ко-стимуляционных молекул на поверхности антиген-презентирующих клеток [30].

Возможные механизмы, лежащие в основе вышеперечисленных иммуномодулирующих эффектов МСК, известны только частично, но установлено, что необходимо действие комбинации провоспалительных цитокинов, в том числе IFN-γ, TNF-α, IL-1α или IL-1β [31]. Экспрессия CXCL9 и CXCL10 способствует привлечению МСК Т-клеток. Применение антител к рецептору для CXCL9/10 (CXCR3) восстанавливало пролиферацию Т-клеток и предотвращало их движение в направлении МСК. IL-1β дозозависимо вызывает экспрессию IL-6 и бесклеточные супернатанты МСК, активированных IL-1β, оказывают супрессирующий эффект на аллореактивные Т-клетки *in vitro* [32]. МСК экспрессируют и Toll-подобные рецепторы (TLR-2 до TLR-8). Использование лигандов этих рецепторов подавляло способность к дифференцировке, но при этом не затрагивало их иммуносупрессивную функцию [33].

Другим важным медиатором иммуносупрессии, который секретируется МСК, является молекула HLA-G, которая представляет собой не классическую молекулу HLA I класса. Установлено, что HLA-G подавляет пролиферацию CD4+ лимфоцитов, вызывает апоптоз CD8+ лимфоцитов и ингибирует натуральные киллеры [34].

Т-клеточная пролиферация может подавляться в результате секреции МСК оксида азота (NO). МСК мышей, у которых отсутствовала индуцибельная форма NO-синтазы, проявляли сниженный потенциал к супрессии пролиферации Т-лимфоцитов как *in vitro*, так и *in vivo* [35].

Помимо этого, простагландин E2 (PGE2) также участвует в иммуносупрессивном действии МСК. После воздействия фактором некроза опухоли (ФНО) или IFN-γ на МСК его продукция увели-

чивается. PGE2 оказывает сильное ингибирующее влияние на Т-клеточное размножение и продукцию IL-2. Специфичное ингибирование синтеза PGE2 отменяет антипролиферативный эффект МСК, подтверждая тем самым его ключевую роль в данном процессе [36]. Трансформирующий фактор роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), фактор роста гепатоцитов, гемоксигеназа-1, IL-6, фактор, ингибирующий лейкемию также дополняют список медиаторов, важных для осуществления МСК иммуносупрессивного действия. Однако, стоит заметить, что ингибирование любого из вышеперечисленных факторов, приводит лишь к частичному ослаблению иммуносупрессии, что говорит в пользу одновременного существования нескольких независимых механизмов данного процесса [37].

Все вышеперечисленные уникальные свойства МСК делают их потенциально важнейшим инструментом в терапии самых разнообразных заболеваний, в том числе ревматологического профиля, включая ревматоидный артрит и остеоартроз (остеоартрит).

На сегодняшний день интересные данные о положительном эффекте МСК при воспалении и повреждении тканей *in vivo* получены в целом ряде исследований, но они основываются главным образом на изучении экспериментальных животных моделей.

Так, в 2003 году появилась информация о действии МСК из костного мозга в модели остеоартрита у коз. При внутрисуставной трансплантации аутологичных клеток наблюдалась значительная регенерация медиального мениска, и введенные клетки детектировались в новообразованной ткани, также происходило уменьшение степени дегенерации хряща, ремоделирования ткани и субхондрального склероза [38]. Основываясь на этих данных было начато клиническое исследование с использованием МСК у пациентов с остеоартритом. Введение МСК производилось в коленный сустав. Несмотря на то, что окончательные результаты еще не опубликованы, уже известно, что МСК имеют хорошую переносимость и оказывают положительный эффект на болевые проявления, уменьшают субхондральный склероз и формирование остеофитов.

Что касается ревматоидного артрита, то данные по использованию МСК при этом заболевании противоречивы. Так, в одном из исследований на мышах с использованием модели экспериментального коллаген-индуцированный артрита однократная инъекция МСК предотвращала развитие тяжелого артрита и сопровождалась понижением содержания провоспалительных цитокинов [39]. Однако другая группа исследователей не выявила

положительного эффекта МСК на течение индуцированного артрита. При этом МСК не обнаруживались в органе-мишени. Еще одно исследование с использованием модифицированных МСК, экспрессирующих IL-10, подтвердило значительное уменьшение симптоматики артрита по сравнению с введением наивных МСК.

Одно из немногих клинических исследований по использованию МСК у людей было проведено в Каире. Это пилотное исследование показало многообещающие результаты относительно использования МСК для лечения дефектов хряща [40]. В этом исследовании использовался богатый тромбоцитами фибриновый клей в качестве носителя для доставки МСК при восстановлении хрящевой ткани.

В исследовании приняли участие 5 человек (4 мужчин и 1 женщина) в возрасте 21–37 лет с глубоким повреждением суставного хряща в *несущей* весовую нагрузку области мыщелка бедренной кости без положительного ответа на консервативное лечение. Аутологичные МСК из костного мозга были размножены в культуре, после чего во время операции они были перенесены на богатый тромбоцитами фибриновый клей и затем трансплантированы в область повреждения хряща, с покрытием аутологичным участком надкостницы.

Для получения аутологичных МСК ядродержащие клетки были изолированы из образцов костного мозга пациентов в градиенте плотности и ресуспендированы в культуральной среде. Клетки культивировались в течение ~14 дней до достижения 80–90 % конfluence, после чего подвергались трипсинизации и центрифугированию с повторным культивированием в течение 10 дней. МСК в культуре идентифицировались на основе их адгезивности, методом проточной цитометрии с определением поверхностных маркеров МСК (CD34–, CD45–, and CD73+), а также при помощи определения уровня экспрессии CD29. Далее МСК смешивались с богатым тромбоцитами фибриновым клеем и проводилась трансплантация пациенту.

Состояние пациентов оценивалось через 6 и 12 месяцев после вмешательства по *шкале Лисхольм* и *шкале Revised Hospital for Special Surgery Knee (RHSSK)*, а также рентгенологически и при помощи магнитно-резонансного анализа.

Было отмечено ослабление симптомов и улучшение функционирования коленного сустава у всех пациентов уже через 6 месяцев. Все пациенты смогли вернуться к нормальному образу жизни. У двух пациентов была проведена артроскопия, и баллы по шкале ICRS составили 8/12 и 11/12 (что почти соответствует норме). Результаты магнитно-

резонансного исследования подтвердили полное восстановление областей повреждения и полное соответствие вновь образованных поверхностей нативной хрящевой ткани у трех пациентов, тогда как у двух других произошло частичное восстановление.

Таким образом, терапия мезенхимальными стволовыми клетками может явиться одним из методов истинно патогенетической терапии артропатий, позволяющим замедлить темпы прогрессирования заболевания и улучшить прогноз. Действительно, на сегодняшний день зарегистрировано около 90 клинических испытаний с использованием МСК (<http://www.clinicaltrials.gov>) в лечении самых разных заболеваний человека. Некоторые из них были признаны неудачными и приостановлены, остальные продолжаются. Но стоит заметить, что при использовании МСК чрезвычайно важно уметь четко определять терапевтические цели, а также необходимо проводить постоянное улучшение качества клеток, особенно это касается источников МСК и их типов (аутологичные клетки или аллогенные), условий культивирования. К тому же, требуется накопление знаний о долгосрочных побочных эффектах введения МСК.

Работа выполнена при поддержке гранта в форме субсидий для юридических лиц на поддержку научных исследований в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», соглашение № 8811 от 14.11.2012 г.

Литература

1. Насонов Е.Л., Насонова В.А. Ревматология. Национальное руководство. — 2008, «ГЭОТАР-Медиа»: Москва. — 720 с.
2. Suri P., Morgenroth D.C., Hunter D.J. Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities // PM R. — 2012. — № 4(5 Suppl). — P. 10–19.
3. Watts R., Rheumatology. — 2009, Oxford: Oxford University Press.
4. Conrad K., Roggenbuck D., Reinhold D. et al. Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies // Autoimmun Rev. — 2010. — Vol. 9, № 6. — P. 431–435.
5. Johansson M., Arlestig L., Hallmans G. et al. PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100 % for the disease // Arthritis Res Ther. — 2006. — Vol. 8, № 1. — P. 19.
6. Crow M.K. Anticyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis: clues to disease pathogenesis // Curr Rheumatol Rep. — 2008. — Vol. 10, № 3. — P. 165–167.
7. Bang S.Y., Lee K.H., Cho S.K. et al. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status // Arthritis Rheum. — 2010. — Vol. 62, № 2. — P. 369–377.
8. Rantapää-Dahlqvist S. What happens before the onset of rheumatoid arthritis? // Curr Opin Rheumatol. 2009. — Vol. 21, № 3. — P. 272–278.
9. Trouw L.A., Mahler M. Closing the serological gap: promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis // Autoimmun Rev. — 2012 Jun 1.
10. Lal P., Su Z., Holweg C.T. et al. Inflammation and autoantibody markers identify rheumatoid arthritis patients with enhanced clinical benefit following rituximab treatment // Arthritis Rheum. — 2011. — Vol. 63, № 12. — P. 3681–3691.
11. Gottenberg J.E., Ravaud P., Cantagrel et al. Positivity for anti-cyclic citrullinated peptide is associated with a better response to abatacept: data from the ‘Orencia and Rheumatoid Arthritis’ registry // Ann Rheum Dis. — 2012 May 21.
12. Smolen J.S., Aletaha D., Bijlsma J.W. et al. T2T Expert Committee. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force // Ann Rheum Dis. — 2010. — Vol. 69, № 4. — P. 631–637.
13. Englund M. The role of biomechanics in the initiation and progression of OA of the knee // Best Pract Res Clin Rheumatol. — 2010. — Vol. 24, № 1. — P. 39–46.
14. Rainbow R., Ren W., Zeng L. Inflammation and Joint Tissue Interactions in OA: Implications for Potential Therapeutic Approaches // Arthritis. — 2012. Epub 2012 Jun 18.
15. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // Cell Tissue Kinet. — 1970. — Vol. 3, № 4. — P. 393–403.
16. Phinney D.G., Prockop D.J. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—Current views // Stem Cells. — 2007. — Vol. 25, № 11. — P. 2896–2902.
17. Gronthos S., Simmons P.J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro // Blood. — 1995. — Vol. 85, № 4. — P. 929–940.
18. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies // Bone. — 1992. — Vol. 13, № 1. — P. 69–80.
19. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues // Science. — 1997. — Vol. 276, № 5309. — P. 71–74.
20. Bruder S.P., Ricalton N.S., Boynton R.E. et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation // J. Bone Miner Res. — 1998. — Vol. 13, № 4. — P. 655–663.
21. Xu W., Zhang X., Qian H. et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro // Exp Biol Med (Maywood). — 2004. — Vol. 229, № 7. — P. 623–631.

22. *Delorme B., Ringe J., Gallay N. et al.* Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells // *Blood*. — 2008. — Vol. 111. — P. 2631–2635.
23. *Baddoo M., Hill K., Wilkinson R. et al.* Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection // *J Cell Biochem*. — 2003. — Vol. 89. — P. 1235–1249.
24. *Dominici M. et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. — 2006. — Vol. 8. — P. 315–317.
25. *Horwitz E., Le Blanc K., Dominici M. et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. — 2005. — Vol. 7. — P. 393–395.
26. *Muraglia A., Cancedda R., Quarto R.* Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model // *J. Cell. Sci*. — 2000. — Vol. 113. — P. 1161–1166.
27. *Djouad F., Bony C., Haup T. et al.* Transcriptional profiles discriminate bone marrow — derived and synovium-derived mesenchymal stem cells // *Arthritis Res. Ther*. — 2005. — Vol. 7. — P. 1304–1315.
28. *Alsalameh S., Amin R., Gemba T., Lotz M.* Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage // *Arthritis Rheum*. — 2004. — Vol. 50. — P. 1522–1532.
29. *Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al.* Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation // *Transplantation*. — 2003. — Vol. 75. — P. 389–397.
30. *Chen F.H., Tuan R.S.* Mesenchymal stem cells in arthritic diseases // *Arthritis Res. Ther*. — 2008. — Vol. 10. — P. 223.
31. *Ren G., Zhang L., Zhao X. et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide // *Cell Stem Cell*. — 2008. — Vol. 2. — P. 141–50.
32. *Liu C.H., Hwang S.M.* Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood // *Cytokine*. — 2005. — Vol. 32. — P. 270–279.
33. *Pevsner-Fischer M., Morad V., Cohen-Sfady M. et al.* Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions // *Blood*. — 2007. — Vol. 109. — P. 1422–1432.
34. *Selmani Z., Naji A., Zidi I. et al.* Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce +CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells // *Stem Cells*. — 2008. — Vol. 26. — P. 212–222.
35. *Ren G., Zhang L., Zhao X. et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide // *Cell Stem Cell*. — 2008. — Vol. 2. — P. 141–150.
36. *Djouad F., Charbonnier L.M., Bouffi C. et al.* Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism // *Stem Cells*. — 2007. — Vol. 25. — P. 2025–2032.
37. *Rasmusson I.* Immune modulation by mesenchymal stem cells // *Exp. Cell Res*. — 2006. — Vol. 312. — P. 2169–2179.
38. *Murphy J.M., Fink D.J., Hunziker et al.* Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis // *Arthritis Rheum*. — 2003. — Vol. 48. — P. 3464–3474.
39. *Augello A., Tasso R., Negrini S.M. et al.* Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis // *Arthritis Rheum*. — 2007. — Vol. 56. — P. 1175–1186.
40. *Haleem A.M., Singergy A.A., Sabry D. et al.* The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results // *Cartilage*. — 2010. — Vol. 1, № 4. — P. 253–261.

ХРОНИЧЕСКАЯ СЕРДЕЧНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ: КАК ОЦЕНИТЬ ОБЪЕМ ПРОБЛЕМ И ОПТИМИЗИРОВАТЬ ТЕРАПИЮ ПАЦИЕНТОВ С ЕЕ ТЯЖЕЛЫМИ ФОРМАМИ

М.Ю. Ситникова, Е.А. Лясникова, М.А. Трушкина

*ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия*

Ситникова Мария Юрьевна — доктор медицинских наук, профессор, руководитель научно-исследовательского отдела сердечной недостаточности ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Лясникова Елена Анатольевна* — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела сердечной недостаточности ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Трушкина Мария Александровна* — научный сотрудник научно-исследовательского отдела сердечной недостаточности ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, д. 2., Россия, 197341. Тел.: (812) 702–55–89.

Резюме

Эпидемиологические данные популяционных исследований XX века, посвященных хронической сердечной недостаточности (ХСН), подтверждают резкое повышение ее встречаемости в последние десятилетия и плохой прогноз. В обзоре особое внимание уделено опыту работы национальных регистров больных сердечной недостаточностью в западных странах, необходимости создания российского регистра больных ХСН и организации для пациентов тяжелой ХСН специализированных амбулаторных и госпитальных центров, ориентированных на высокотехнологичные методы лечения.

Ключевые слова: Хроническая сердечная недостаточность, эпидемиология, регистр больных, экономика.

CHRONIC HEART FAILURE: HOW TO ESTIMATE VOLUME OF PROBLEMS AND TO OPTIMIZE THERAPY OF PATIENTS WITH ITS SEVERE FORMS

M. Yu. Sitnikova, E. A. Lyasnikova, M. A. Trukshina

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. Tel.: (812) 702–55–89 (Maria Yu. Sitnikova — MD, professor, head of research department of heart failure of Almazov Federal heart, blood and Endocrinology centre).

Abstract

Epidemiological data of population researches of the XX-th century devoted to chronic heart failure (CHF), confirms sharp increase of its occurrence and a bad prognosis for the last decades. In the review the special attention is given to experience of heart failure national registers in the western countries, need of creation of the Russian heart failure register and the organization for patients with severe CHF the specialized outpatient and hospital centers focused on high-tech methods of treatment.

Key words: chronic heart failure, epidemiology, register of patient, economy.

Статья поступила в редакцию 01.12.12, принята к печати 20.12.12.

На протяжении последних десятилетий во всех зарубежных странах независимо от экономической и политической ситуации наблюдается прогрессивный рост числа больных ХСН. Согласно данным Европейского общества кардиологов (European Society of Cardiology) и Американской ассоциации сердца (American Heart Association), 15 миллионов европейцев и более 5 миллионов американцев имеют диагноз ХСН [1]. В США ежегодно регистрируется 550000 новых случаев ХСН [2]. Распространенность ХСН в западных странах варьирует от 1 до 2 %, (5–10 человек на 1000 населения), увеличиваясь с возрастом, достигая уже более 10 % среди лиц старше 70 лет [3–6]. Резкое повышение встречаемости ХСН связывают с по-

старением населения в целом и больных с ХСН, в частности, достижениями в терапии острого инфаркта миокарда, артериальной гипертензии, совершенствованием терапевтических и хирургических методов лечения главным образом ишемической болезни сердца, и, наконец, терапии самой сердечной недостаточности [1, 5]. В России на лечение ХСН тратится от 55 до 295 млрд. рублей в год, а расходы на госпитализации по поводу ее декомпенсации достигают 184,7 млрд. рублей [7]. Таким образом, сегодня распространенность ХСН имеет черты эпидемии, а затраты на терапию этого состояния чрезвычайно велики.

На сегодняшний день при разработке стратегии развития здравоохранения должны учитываться

Таблица 1

**ПРОГНОЗ ПАЦИЕНТОВ ХСН ПО ДАННЫМ ПОПУЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ,
ПРОВЕДЕННЫХ В XX ВЕКЕ**

Население, страна, скринированное население (человек)	Период исследования	Автор	Среднее число случаев ХСН на 1000 населения в год,	Выживаемость		
				1 год	5 лет	10 лет
Framingham США (9 405)	1948–1988	Ho et al. [11]	мужчины — 2,3 женщины — 1,4	мужчины 57 %, женщины 64 %	мужчины 25 %, женщины 38 %	мужчины 11 %, женщины 21 %
Framingham США (10 311)	1950–1969; 1990–1999	Levy et al. [12]	~5		мужчины 30 %, женщины 43 %; муж- чины 41 %, женщины 55 %	
Rochester США (7 298)	1979–1984; 1996–2000	Roger et al. [13]	~3		43 %; 52 %	
Rotterdam Нидерланды (7 983)	1990–1998	Mosterd et al. [14]		89 %	59 %	
Hillingdon west London Англия (151 000)	1995–1997	Cowie et al. [15, 16]	мужчины — 1,4 женщины — 1,2	62 %		
ECHOES* Англия (6 162)	1995–1999	Hobbs et al. [17]			53 % (ХСН + СДЛЖ†)	

Примечание: * — Echocardiographic Heart of England Screening (ECHOES) Study; † СДЛЖ — систолическая дисфункция левого желудочка.

Адаптировано из Taylor et al. Eur J Heart Fail. 2012; 14 (2): 176–184.

Roger Int J Environ Res Public Health. 2010; 7 (4): 1807–1830.

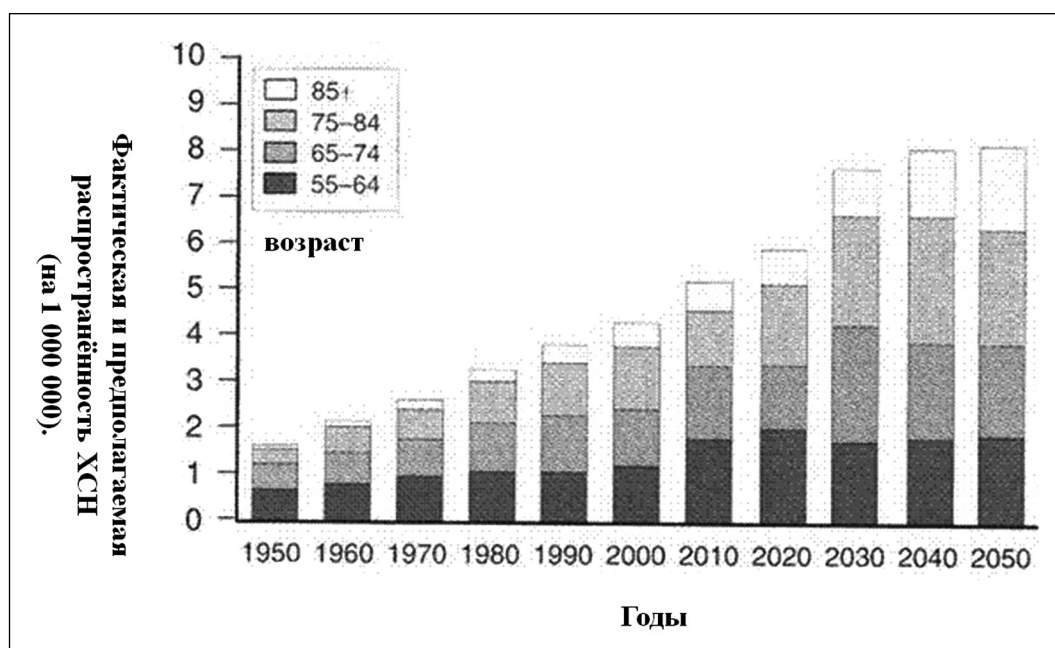


Рисунок 1. Прогнозируемая до 2050 года динамика случаев хронической сердечной недостаточности в развивающихся странах [24]

данные статистики, основанные на результатах эпидемиологических исследований. Подобные сведения, не могут базироваться на информации, полученной в ходе клинических исследований препаратов, поскольку оценка эффективности медикаментов обычно проводится на селективной когорте пациентов, набор в которую ограничен возрастными критериями и сопутствующей патологией. В связи с этим, большая часть эпидемиологических данных по ХСН базируется на ретроспективном анализе историй болезни или проспективном исследовании госпитализированных больных с ХСН [5, 8]. Важно заметить, что такие данные не отражают информацию об огромном пласте пациентов, находящихся на амбулаторном наблюдении кардиологов, участковых терапевтов, врачей общей практики, пациентов с минимальными клиническими проявлениями ХСН, атипичными клиническими проявлениями и с асимптоматической дисфункцией левого желудочка [5, 6].

В последние 30 лет большое значение приобретают проспективные популяционные исследования, подразумевающие наблюдение значительной по объему группы населения, сформированной по определенному принципу, и ее изучение в течение длительного времени без осуществления каких-либо вмешательств извне. С позиций медицины, основанной на доказательствах, результаты исследований такого типа обеспечивают большую достоверность в выявлении тех или иных закономерностей и имеют максимальную ценность. С другой стороны, необходимость ис-

пользования очень больших по объему выборок и большая длительность наблюдения затрудняют их проведение.

Данные по эпидемиологии ХСН широко варьируют и сложны для сравнения, что во многом обусловлено разной методологией оценки распространенности, разнородностью в понятии самой ХСН как синдрома, применяемой различными авторами [8]. Общим для всех популяционных исследований, касающихся ХСН, является вывод о резком повышении ее встречаемости в последние десятилетия и плохом прогнозе [9, 10] (Табл.1).

Однако в последнее время намечается тенденция к улучшению прогноза больных ХСН в развитых странах и отдельных центрах России [18, 19], что делает некоторые результаты проведенных ранее исследований достоянием истории.

На ряд клинко-эпидемиологических, а, следовательно — и экономических показателей ХСН (встречаемость, этиологию, прогноз, смертность) оказывают значимое влияние возрастные, гендерные, этнические, социальные различия исследуемого населения [20–22]. Описаны различия между странами во встречаемости ХСН. В странах с развитой промышленностью ХСН выше, чем в странах развивающихся [23]. Однако вплоть до 2050 г. рост числа случаев ХСН прогнозируется именно в развивающихся странах (Рис. 1).

Реально планировать затраты, связанные со здравоохранением в конкретной стране можно только на основании национальных регистров больных. Регистр, по сути, — это интернет-база пациентов,

где каждый участник имеет свою электронную карту, сведения в которой постоянно обновляются, контролируются и статистически обрабатываются координационным центром, что дает реальную возможность анализировать ситуацию в длительной перспективе, отслеживать судьбу больных. В регистры собирается информация, как о госпитализированных пациентах, так и о находящихся на амбулаторном наблюдении.

Электронная карта регистра, заполняемая исследователем в on line режиме, включает индивидуальные данные о демографии, объективном статусе, гемодинамических параметрах, инструментальных и лабораторных показателях, медикаментозной терапии, госпитализациях и др. Периодически работниками координационного центра или самими исследователями на местах сведения пополняются из национальных электронных баз, если такие имеются в стране. Через интересующий отрезок времени сведения о качестве жизни больных, их толерантности к нагрузкам, медикаментозной терапии берутся из опросников, которые присылаются по почте или

выдаются в момент запланированного визита каждому пациенту, зарегистрированному в базе регистра [8, 22].

Трудно переоценить значение работы регистра: большой пул клинико-эпидемиологических показателей позволяет оценивать прогноз у конкретной когорты пациентов, идентифицировать группы риска, которым требуется более раннее начало медикаментозного и высокотехнологичного воздействия. Не менее важна его информационно-обучающая роль: данные из регистра могут быть доступны всем участвующим в проекте исследователям медицинского сообщества, а это позволяет сравнивать медикаментозную тактику, оценивать адекватность терапии больных ХСН согласно принятым диагностическим и терапевтическим рекомендациям. Помимо этого, регистр дает возможность инициировать новые исследовательские проекты как лечебной, так и профилактической направленности.

Основные литературные данные относительно современных регистров ХСН в США связаны с 3 проектами (Табл. 2): Organized Program to

Таблица 2

НАИБОЛЕЕ КРУПНЫЕ РЕГИСТРЫ БОЛЬНЫХ ХСН

Регистр (количество включенных человек), цели	Период набора	Популяция	Дизайн
OPTIMIZE-HF (> 48 000) Цели: оценка терапии, акцент на β -АБ, смертность и регоспитализации	2002–2005 гг.	Пациенты с ХСН на госпитальном и амбулаторном наблюдении	follow-up: 60 и 90 дней после выписки из стационара
ADHERE (> 100 000) Цели: характеристика пациентов, диагноз, лечение, исходы, рекомендации	С 2002 –2006 гг.	Пациенты, госпитализированные по поводу острой впервые выявленной СН или декомпенсации ХСН	follow-up: госпитальный период
IMPROVE HF (> 30 000) Цели: препараты, ИКД, СРТ, образовательные программы, исходы	2005–2009 гг.	Амбулаторные пациенты с ХСН и/или с ИМ и СФ ЛЖ*	follow-up: 12 и 24 месяца
Italian Network on Congestive Heart Failure (IN-CHF), затем Italian Registry on Heart Failure Outcome (IN-HF) (> 30 000)	С 1995 г.	Больные с острой и хронической сердечной недостаточностью	Непрерывное наблюдение больных
Swedish Heart Failure Registry (S-HFR) /Riks Svik (> 28 000)	С 2003 г.	Больные с острой и хронической сердечной недостаточностью	Непрерывное наблюдение больных

Примечание: СФ ЛЖ — сниженная функция левого желудочка.

Initiate Lifesaving Treatment in Hospitalized Patients with Heart Failure (OPTIMIZE-HF), Registry to Improve the Use of Evidence-Based Heart Failure Therapies in the Outpatient Setting (IMPROVE HF), Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) [22, 25]. В странах ЕЭС наибольший объем информации накоплен по результатам работы регистров, действующих в Италии и Швеции [8, 26, 27] (Табл. 2).

В группе пациентов, участвующих в программе OPTIMIZE-HF, было получено снижение смертности, риска регоспитализации, уменьшение длительности стационарного лечения, сформировалась большая приверженность рекомендуемой терапии, чем в группе не вошедших в регистр пациентов [28]. Через 2 года работы регистра IMPROVE HF был показан достоверный рост назначения β -АБ и антагонистов альдостерона врачами, выросло число пациентов, которым были имплантированы ресинхронизирующие или дефибриллирующие (ИКД) устройства, и в целом — достоверное увеличение выживаемости больных [29, 30]. Самый крупный регистр больных ХСН в США — ADHERE начал работать с 2002 г. Важно, что 1 раз в квартал отчетная информация о госпитализируемом контингенте больных, объеме и качестве оказываемой медицинской помощи, а также исходах лечения была доступна персоналу госпиталей, участвующих в проекте [31]. Через 3 года работы регистра достоверно увеличилось число пациентов, инструктированных о правилах жизни при ХСН, возросло применение основных препаратов, снизилось использование инотропных агентов и дигоксина, уменьшились длительность пребывания пациента на койке и смертность [32]. Частота регоспитализации в течение 1 года в связи с ХСН у больных из стационаров, участвующих в проекте ADHERE, была достоверно меньше, чем в лечебных учреждениях, не вовлеченных в данный регистр [32].

По данным Национального Института здоровья США на базе регистра ADHERE с 2006 г. зарегистрировано подисследование ADHERE Longitudinal Module-Registry of Advanced Heart Failure Patients at High Risk for Rehospitalization — регистр, включающий более 1400 пациентов, основной задачей которого является оценка длительного прогноза пациентов ХСН [25].

В крупный итальянский проект Italian Network on Congestive Heart Failure (IN-CHF) с марта 1995 года начала поступать информация из 142 кардиологических центров, расположенных по всей стране. К 2005 г. в регистр располагал базой данных о 23 855 пациентах с ХСН [26]. С 2005 г.

IN-CHF работает в on line режиме, с 2007 года создается единая интернет-база пациентов ХСН — Italian Registry on Heart Failure Outcome (IN-HF). С 2007–2009 гг. из 64 центров в итальянский регистр было включено более 5500 пациентов с острой и хронической сердечной недостаточностью [27].

Шведский регистр — Swedish Heart Failure Registry (S-HFR) /RiksSvikt начал заполняться с осени 2003 г. и в 2007 г. насчитывал 16 117 пациентов, а через 2 года (к концу 2009 г.) количество зарегистрированных пациентов увеличилось вдвое и составило 28 000 человек. В проекте приняли участие 78 медицинских учреждений стационарного и амбулаторного профиля [8].

В нашей стране в 2001–2002 гг. под эгидой Общества специалистов по сердечной недостаточности были проведены 2 эпидемиологических исследования, посвященных сердечной недостаточности. ЭПОХА-ХСН (Эпидемиологическое Обследование больных в Европейской части России — ХСН), которое включило 19 500 респондентов из 8 регионов РФ, и ЭПОХА-О-ХСН (Эпидемиологическое Обследование больных ХСН в реальной практике по обращаемости) — наблюдательное *одномоментное* исследование по обращаемости, в которое вошли 17 824 человек из 22 регионов РФ. Было установлено, что к началу XXI века распространенность ХСН составила в нашей стране 7 % (7,9 млн. человек), а ее декомпенсация была причиной госпитализации почти у каждого второго больного [33–36]. ХСН встречалась несколько чаще на юге РФ, в промышленных центрах и крупных городах [23, 37]. Однолетняя смертность больных сердечной недостаточностью достигала 12 %. В результате дальнейшего 10-летнего наблюдения установлено, что распространенность ХСН в популяции росла в среднем на 1,2 человека на 1000 населения в год [33]. Немаловажным результатом этой работы, а также большой просветительской деятельности, посвященной проблемам медикаментозной терапии ХСН, стало повсеместное освоение стандартов терапии сердечной недостаточности на всех этапах ведения пациента. Сегодня обязательно вызовет недоумение отсутствие среди предписанной больному ХСН терапии β -АБ или интермиттирующий режим приема диуретиков. Однако взгляд на пациента с сердечной недостаточностью лишь через призму стандартной медикаментозной терапии уже устарел. За последние 8–10 лет в технологии лечения ХСН произошли существенные изменения: сегодня больной систолической ХСН III–IV ФК должен рассматриваться как потенциальный кандидат на ресинхронизиру-

щую терапию, имплантацию ИКД или трансплантацию сердца. Безусловно, такие методы лечения дорогостоящи, но они эффективно улучшают прогноз этого фатального синдрома, радикально меняют качество жизни пациентов, возвращают их к труду. Освоение российскими врачами этих технологий и организация высокотехнологичных медицинских центров, способных к проведению комплексного специализированного обследования и подготовке больных к этим вмешательствам, наличие высококлассных кардиохирургов и поэтапно организованная реабилитационная программа делают насущной задачу привлечения внимания к этим технологиям докторов, работающих на всех уровнях медицинской помощи.

Одним из следствий систематического проведения эпидемиологических исследований, посвященных проблеме ХСН в западных странах, стал мультидисциплинарный подход к терапии таких больных. В результате были организованы клиники сердечной недостаточности, укомплектованные персоналом, специализирующимся на терапии именно этого состояния и предоставляющие возможность как госпитального, так и амбулаторного (по принципу «дневного стационара») лечения, имеющие в своем распоряжении средства для диагностики и эффективного мониторинга. Наблюдение больных в таких центрах, обеспечивающих медицинскую, психологическую и социальную поддержку также и после выписки, позволило существенно улучшить результаты лечения. Ведущая роль на всех этапах курации данных пациентов отводится врачу — специалисту по сердечной недостаточности, активно применяющему более интенсивные программы лечения по сравнению с обычными кардиологами и тесно взаимодействующему с хирургами-аритмологами и транспланталогами [38, 39]. В нашей стране специализированных амбулаторных и госпитальных центров для курации больных тяжелой ХСН нет. Однако в свое время именно из-за необходимости активного и своевременного лечения острых форм ИБС из терапии выделились такие специальности как реаниматология и кардиология. *Лечение пациента с тяжелой сердечной недостаточностью — не менее сложная задача.* Она может быть решена только при умелом сочетании своевременного и адекватного применения самых новейших технологий и медикаментов, но и очень важных для прогноза знания стандартов образа жизни.

Учитывая многонациональный состав населения РФ, различия концентрации городского и сельского населения, особенности гендерного и

возрастного состава, актуальным становится создание национального регистра по ХСН, способствующего более детальному изучению клинико-эпидемиологических особенностей данного заболевания. Принимая во внимание опыт зарубежных стран, стратегическими задачами такого исследования могут стать улучшение терапии и повышение качества жизни больных, а так же решение вопросов медицинской организации и экономики для более рационального использования средств на лечение ХСН в нашей стране.

Список сокращений:

ХСН — хроническая сердечная недостаточность,
ИКД — имплантируемый кардиовертер — дефибриллятор,
РФ — Российская Федерация,
 β -АБ — бета-адреноблокаторы,
ФК — функциональный класс.

Литература

1. Dickstein K., Cohen-Solal A., Filippatos G. et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) // Eur. J. Heart Fail. — 2008. — Vol. 10, № 10. — P. 933–989.
2. Rosamond W., Flegal K., Friday G. et al. Heart disease and stroke statistics — 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee // Circulation. — 2007. — Vol. 115. — P. 69–171.
3. McMurray J.J., Adamopoulos S., Anker A.D. et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC // Eur. Heart J. — 2012. — Vol. 33, № 14. — P. 1787–1847.
4. Mosterd A., Hoes A.W. Clinical epidemiology of heart failure // Heart. — 2007. — Vol. 93, № 9. — P. 1137–1146.
5. Zannad F., Agrinier N., Alla F. Heart failure burden and therapy // Europace. — 2009. — Vol. 11, № 5. — P. 1–9.
6. Hoes A.W., Mosterd A., Grobbee D.E. An epidemic of heart failure? Recent evidence from Europe. Review // Eur. Heart J. — 1998. — Suppl. 1. — P. 2–9.
7. Сулимов В.А., Напалков Д.А., Сеидова Н.М. Хроническая сердечная недостаточность: смещение фокуса на начальные стадии заболевания // Лечащий врач. — 2008. — № 4. — С. 58–60.
8. Jonsson A., Ender M., Alehagen U. et al. Heart failure registry: a valuable tool for improving the management of

patients with heart failure // *Eur. J. Heart Fail.* — 2010. — 12, № 1. — P. 25–31.

9. *Taylor C.J., Roalfe A.K., Iles R. et al.* (Ten-year Prognosis of Heart Failure in the Community) Follow-up Data From the Echocardiographic Heart of England Screening (ECHOES) Study // *Eur J. Heart Fail.* — 2012. — Vol. 14, № 2. — P. 176–184.

10. *Roger V.L.* The Heart Failure Epidemic // *Int. J. Environ Res. Public Health.* — 2010. — Vol. 7, № 4. — P. 1807–1830.

11. *Ho K.K., Anderson K.M., Kannel W.B. et al.* Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects // *Circulation.* — 1993. — Vol. 88. — P. 107–115.

12. *Levy D., Kenechiah S., Larson M. G. et al.* Long term trends in the incidence of and survival with heart failure // *N. Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 347, P. 1397–1402.

13. *Roger V.L., Weston S.A., Redfield M.M. et al.* Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population // *J. Am. Med. Assoc.* — 2004. — Vol. 292. — P. 344–350.

14. *Mosterd A., Cost B., Hoes A.W. et al.* The prognosis of heart failure in the general population: the Rotterdam Study // *Eur. Heart J.* — 2001. — Vol. 22. — P. 1318–1327.

15. *Cowie M.R., Wood D.A., Coats A.J. et al.* Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study // *Eur. Heart J.* — 1999. — 20, № 6. — P. 421–428.

16. *Cowie M.R., Wood D.A., Coats A.J. et al.* Survival of patients with a new diagnosis of heart failure: a population-based study // *Heart.* — 2000. — Vol. 83. — P. 505–510.

17. *Hobbs F.D., Roalfe A.K., Davis R.C. et al.* Midlands Research Practices Consortium. Prognosis of all-cause heart failure and borderline left ventricular systolic dysfunction: 5 year mortality follow-up of the Echocardiographic Heart of England Screening Study (ECHOES) // *Eur. Heart J.* — 2007. — Vol. 28. — P. 1128–1134.

18. *Teng T.H., Hung J., Knuiman M. et al.* Trends in long-term cardiovascular mortality and morbidity in men and women with heart failure of ischemic versus non-ischemic aetiology in Western Australia between 1990 and 2005 // *Int. J. Cardiol.* — 2012. — Vol. 158, № 3. — P. 405–410.

19. *Иванов С.Г., Краснова О.А., Ситникова М.Ю. и др.* I/D полиморфизм гена ACE у больных с систолической сердечной недостаточностью: взаимосвязь с факторами риска и 5-летней выживаемостью // *Артериальная гипертензия.* — 2008. — Vol. 2, № 2. — С. 115–119.

20. *Ситникова М.Ю., Леявина Т.А., Шляхто Е.В. и др.* Особенности клиники, диагностики и прогноза хронической сердечной недостаточности у госпитализированных пациентов старческого возраста // *Журнал Сердечная недостаточность.* — 2006. — Vol. 7, № 2. — С. 85–87.

21. *Bahrami H., Kronmal R., Bluenke D.A et al.* Differences in the incidence of congestive heart failure by ethnicity: the multi-ethnic study of atherosclerosis // *Arh. Intern. Med.* — 2008. — Vol. 168, № 19. — P. 2138–2145.

22. *Fonarow G.C.* Improving quality of care and outcomes for heart failure. Role of registries // *Circ J.* — 2011. — 75, № 8. — P. 1783–1790.

23. *Агеев Ф.Т., Арутюнов Г.П., Беленков Ю.Н.* Хроническая сердечная недостаточность: руководство // М.: Гэотар. — 2010. — С. 336.

24. Braunwald: s Heart Disease, 7th edition // Elsevier Saunders. — 2005. — P. 604.

25. A service of U.S // National Institutes of Health. — 2011 // [Электронный ресурс]. — URL: <http://clinicaltrials.gov>.

26. *Fabbri G., Gorini M., Maggioni A.P. et al.* Italian Network on Congestive Heart Failure: ten-year experience // *G. Ital. Cardiol. (Rome).* — 2006. — Vol. 7, № 10. — P. 689–694.

27. Associazione Nazionale Medici Cardiologi Ospedalieri. — 2011 // [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.anmco.it/default.html>.

28. *Fonarow G.C., Abraham W.T., Albert N.M. et al.* Influence of a performance improvement initiative on quality of care for patients hospitalized with heart failure: Results of the Organized Program to Initiate Lifesaving Treatment in Hospitalized Patients With Heart Failure (OPTIMIZE-HF) // *Arch. Intern. Med.* — 2007. — Vol. 167. — P. 1493–1502.

29. *Fonarow G.C., Albert N.M., Curtis A.B. et al.* Improving evidence-based care for heart failure in outpatient cardiology practices: Primary results of the Registry to Improve the Use of Evidence-based Heart Failure Therapies in the Outpatient Setting (IMPROVE HF) // *Circulation.* — 2010. — Vol. 122. — P. 585–596.

30. *Fonarow G.C., Albert N.M., Curtis A.B. et al.* Associations between outpatient heart failure process-of-care measures and mortality // *Circulation.* — 2011. — Vol. 123. — P. 1601–1610.

31. *Fonarow G.C., Heywood J.T., Heidenreich P.A. et al.* ADHERE Scientific Advisory Committee and Investigators. Temporal trends in clinical characteristics, treatments, and outcomes for heart failure hospitalizations, 2002 to 2004: Findings from Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) // *Am. Heart J.* — 2007. — Vol. 153. — P. 1021–1028.

32. *Kociol R.D., Hammill B.G., Fonarow G.C. et al.* Generalizability and longitudinal outcomes of a national heart failure clinical registry: Comparison of Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) and non-ADHERE Medicare beneficiaries // *Am. Heart J.* — 2010. — Vol. 160, № 5. — P. 885–892.

33. Национальные рекомендации ВНОК и ОССН по диагностике и лечению ХСН (третий пересмотр). Утверждены конференцией ОССН 15 декабря 2009 года // *Журнал Сердечная Недостаточность.* — 2010. — Vol. 1, № 57. — С. 3–4.

34. *Беленков Ю.Н., Фомин И.В., Мареев В.Ю. и др.* Первые результаты российского эпидемиологического исследования по ХСН // *Журнал Сердечная Недостаточность.* — 2003. — Vol. 4, № 1. — С. 26–30.

35. *Агеев Ф.Т., Даниелян М.О., Мареев В.Ю. и др.* Больные с хронической сердечной недостаточностью

в российской амбулаторной практике: особенности контингента, диагностики и лечения (по материалам исследования ЭПОХА-О-ХСН) // Журнал Сердечная недостаточность. — 2004. — Vol. 5, № 1. — С. 4–7.

36. Фомин И.В., Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю. и др. Распространенность хронической сердечной недостаточности в Европейской части Российской Федерации — данные ЭПОХА-ХСН // Журнал Сердечная Недостаточность. — 2006. — Vol. 7, № 1. — С. 4–7.

37. Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю., Агеев Ф.Т. Эпидемиологические исследования сердечной недостаточно-

сти: состояние вопроса // Consilium Medicum. — 2002. — № 3. — С. 27–28.

38. McDonagh T.A., Blue L., Clark A.L. European Society of Cardiology Heart Failure Association Standards for delivering heart failure care // Eur. J. Heart Fail. — 2011. — Vol. 13, № 3. — P. 235–241.

39. Bello D., Shah N.B., Edep M.E. Self-reported differences between cardiologists and heart failure specialists in the management of chronic heart failure // Am. Heart J. — 1999. — Vol. 138, № 1. — P. 100–107.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРИНЦИПЫ ЛЕЧЕНИЯ АКРОМЕГАЛИИ

У.А. Цой, Е.Н. Гринева

*ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия*

Цой Ульяна Александровна — кандадат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической эндокринологии с группой нейроэндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Гринева Елена Николаевна* — доктор медицинских наук, директор Института эндокринологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Минздрава России» МЗ РФ, Институт эндокринологии, пр. Пархоменко д. 15, Санкт-Петербург, Россия, 194156. E-mail: utsoi@mail.ru (Цой Ульяна Александровна).

Резюме

Акромегалия является хроническим прогрессирующим заболеванием, которое развивается вследствие гиперпродукции гормона роста, приводящей к последующему повышению уровня инсулиноподобного фактора роста-1. Оно ассоциировано с высокими уровнями смертности и инвалидизации по сравнению с общей популяцией. В обзоре освещены современные принципы лечения акромегалии. Обсуждены показания к различным методам лечения: трансфеноидальной хирургии, медикаментозному лечению аналогами соматостатина, агонистами дофамина и антагонистом рецептора к гормону роста и лучевой терапии. Рассмотрен многоступенчатый подход к достижению эффективной компенсации заболевания, позволяющий достичь улучшения качества и продолжительности жизни больных акромегалией.

Ключевые слова: акромегалия, трансфеноидальная хирургия, аналоги соматостатина, агонисты дофамина, антагонистом рецептора к гормону роста, гамма нож.

CONTEMPORARY PRINCIPLES OF ACROMEGALY TREATMENT

U.A. Tsoy, E.N. Grineva

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 15, Parkhomenro str., Saint-Petersburg, Russia, 194156. E-mail: utsoi@mail.ru (Uliana Tsoy — PhD, senior research of the endocrinology institute, Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

Acromegaly is caused by hypersecretion of growth hormone and resultant overproduction of insulinlike growth factor and is associated with increased mortality and morbidity. Contemporary principles of acromegaly treatment are highlighted in this review. Indications for different treatment methods: transsfenoidal surgery, medical therapy and radiotherapy are discussed. A multiple approach to the adequate disease control which provides normal life expectancy and improves life quality in acromegaly patients is considered.

Key words: acromegaly, transsfenoidal surgery, somatostatin analogues, dopamine agonists, GH receptor antagonist, gamma knife.

Статья поступила в печать 02.01.13, принята к печати 11.01.13.

Введение

Акромегалия — это хроническое прогрессирующее заболевание, которое развивается вследствие гиперпродукции гормона роста (ГР), приводящей к последующему повышению уровня инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1). В 95 % случаях причиной заболевания является доброкачественная ГР-продуцирующая аденома гипофиза [1]. Акромегалия редкое заболевание. До недавнего времени распространенность ее оценивалась как 40–70 случаев на миллион населения, а заболеваемость 3–5 новых случаев на миллион населения в год [2]. Однако в течение последних лет были опубликованы работы, согласно которым распространенность заболевания составляет 130 случаев на миллион [3, 4]. Избыточная продукция ГР и ИФР-1 приводит к диспропорциональному росту костей, огрублению черт лица, увеличению объема мягких тканей [5], а также к развитию сердечно-сосудистых, респираторных, эндокринных и метаболических нарушений [1, 6]. Кроме этого, распространенный рост аденомы гипофиза может приводить к развитию нарушений полей зрения, поражению черепных нервов, головной боли, формированию гипопитуитаризма. Данные симптомы могут сопровождать клинические проявления акромегалии [7]. Смертность больных акромегалией в 2–3 раза выше, чем в общей популяции [8]. Развитие в 70-х годах микрохирургических трансфеноидальных технологий, а также появление препаратов аналогов соматостатина в 80-х привело к существенному изменению выживаемости пациентов с акромегалией. По данным метаанализа 16 исследований, посвященных изучению смертности при акромегалии, выполненных в период с 1970 по 2005 год, стандартизированный относительный показатель смертности (SMR) составил 1,72 (95 %, где доверительный интервал (ДИ) 1,62–1,83). Он отражает увеличение смертности среди больных акромегалией на 72 % по сравнению с общей популяцией. После разделения исследований на опубликованные до 1995 года, и после, оказалось, что стандартизированный относительный показатель смертности до 1995 года составил 2,11, а в исследованиях, опубликованных после 1995 года — 1,62 [9]. Таким образом, несмотря на внедрение современных методов лечения, смертность среди больных акромегалией остается высокой.

Снижение смертности, несомненно, основная задача терапии акромегалии. Результаты двух метаанализов показали, что контроль акромегалии приводит к снижению смертности [9, 10]. Данные одного из них, полученные Holdaway I.M. и соавторами, продемонстрировали, что если на фоне терапии уровень ГР был меньше 2,5 нг/мл при случайном

измерении, стандартизированный относительный показатель смертности приближался к показателям смертности в общей популяции, а именно 1,1 (95 %, ДИ 0,9–1,4), тогда как при ГР >2,5 нг/мл он составил 1,9 (95 %, ДИ 1,5–2,4). Также авторами было показано, что нормализация на фоне лечения уровня ИФР-1 соответственно полу и возрасту была ассоциирована со стандартизированным относительным показателем смертности 1,1 (95 %, ДИ 0,9–1,4), тогда как при повышенном уровне ИФР-1 он составил 2,5 (95 %, ДИ 1,6–4,0). Также значительное снижение смертности было отмечено в тех исследованиях, где применялись аналоги соматостатина более чем у 30 % пациентов. Данные метаанализа представлены в таблице 1. Таким образом, результаты этого метаанализа продемонстрировали, что при достижении уровня ГР < 2,5 нг/мл и нормализации ИФР-1 смертность в группе больных акромегалией становится сопоставима со смертностью в общей популяции [10].

Целями лечения акромегалии являются контроль биохимических показателей активности заболевания (подавление гиперсекреции ГР, нормализацию уровня ИФР-1), контроль размеров опухоли и предотвращение местных эффектов, обусловленных опухолевой массой, уменьшение клинических проявлений и симптомов заболевания, улучшение качества жизни, предотвращение развития или оптимизация терапии сопутствующей или ассоциированной патологии, снижение инвалидности и смертности (таблица 2) [7].

В настоящее время методы лечения акромегалии включают нейрохирургию, медикаментозную и лучевую терапии.

Хирургическое лечение

Целями хирургического лечения являются удаление аденомы или уменьшение ее объема для обеспечения лучшего контроля другими методами лечения, декомпрессия здоровой ткани гипофиза и окружающих структур (хиазма, тройничный нерв и др.), быстрое снижение секреции ГР и замедление или прекращение прогрессирования заболевания, улучшение течения ассоциированных заболеваний, получение материала для ИГХ и молекулярного анализа с целью оценки биологии опухоли и использования полученных данных для подбора текущего лечения и разработки новых терапевтических стратегий [11]. Большинство аденом может быть прооперировано трансфеноидальным доступом. Успех операции во многом определяется наличием соответствующего оборудования и команды специалистов, состоящей из опытного нейрохирурга (оптимальным считают выполнение не менее 50

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ КОНТРОЛЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ И НАЗНАЧЕНИЕ АНАЛОГОВ СОМАТОСТАТИНА
НА СМЕРТНОСТЬ БОЛЬНЫХ АКРОМЕГАЛИЕЙ [10]**

Больные акромегалией	SMR (95 % ДИ)	Риск (p)
Ремиссия у > 70 % пациентов	1,2 (1,0–1,5)	1,7 (<0,05)
Ремиссия у 70 % пациентов	2,0 (1,6–2,3)	
Гормон роста < 2,5 мкг/л	1,1 (0,9–1,4)	1,7 (< 0,05)
Гормон роста > 2,5 мкг/л	1,9 (1,5–2,4)	
Нормальный ИФР-1	1,1 (0,9–1,4)	2,3 (< 0,05)
Повышенный ИФР-1	2,5 (1,6–4,0)	
Назначение аналогов соматостатина > 30 % пациентов	1,2 (1,0–1,5)	1,7 (< 0,05)
Назначение аналогов соматостатина < 30 % пациентов	2,0 (1,6–2,3)	

Примечание: ДИ — доверительный интервал, ИФР-1 — инсулиноподобный фактор роста-1, SMR — стандартизированный относительный показатель смертности.

Таблица 2

ЦЕЛИ ЛЕЧЕНИЯ АКРОМЕГАЛИИ [7]

1.	Контроль биохимических показателей активности заболевания (подавление гиперпродукции гормона роста, нормализация уровня ИФР-1)
2.	Контроль размеров опухоли и предотвращение местных эффектов обусловленных опухолевой массой
3.	Уменьшение клинических проявлений и симптомов заболевания
4.	Улучшение качества жизни
5.	Предотвращение развития или оптимизация терапии сопутствующей или ассоциированной патологии
6.	Снижение инвалидности и смертности

Примечание: ИФР-1 — инсулиноподобный фактор роста 1.

операций на гипофизе в год) и эндокринолога, а также нейрорадиолога [12, 13]. Использование МРТ аппарат 3-тесла дает наиболее оптимальное представление о размерах и анатомии аденомы гипофиза [14]. Такой комплексный подход обеспечивает наилучшие результаты хирургического лечения со снижением заболеваемости и смертности [15, 16].

Трансфеноидальная хирургия является терапией первой линии для микроаденом, неинвазивных макроаденом, и в тех случаях, когда существуют наличие или угроза компрессии хиазмы [7]. У пациентов с интраселлярными микроаденомами хирургическое удаление обеспечивает биохимический контроль заболевания с нормализацией ИФР-1 в 75–95 % случаев [17–20]. В случаях неинвазивных макроаденом этот процент меньше, тем не менее, биохимический контроль заболевания, по данным различных исследователей, может быть достигнут в 40–68 % случаях [17–20].

В литературе активно обсуждается вопрос о необходимости предоперационной терапии аналогами соматостатина. Данные проспективных рандомизированных исследований о влиянии предоперационной терапии аналогами соматостатина на успех хирургического лечения противоречивы, они представлены в таблице 3. В исследовании Kristof R.A. и соавторов не было выявлено статистически достоверной разницы в достижении контроля акромегалии после хирургического лечения между пациентами, получавшими и не получавшими предоперационную терапию аналогами соматостатина (69 % и 55 % соответственно) [21]. Mao Z.G. с соавторами в 2010г. показали значительное преимущество предоперационной подготовки аналогами соматостатина (49 % ремиссии против 18 %, $P < 0.001$) [22]. Интерес представляют данные Carlsen S.M. и соавторов, опубликованные в 2008 году [23]. При анализе результатов без разделения

Таблица 3

**ДАННЫЕ ПРОСПЕКТИВНЫХ РАНДОМИЗИРОВАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
О ВЛИЯНИИ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ АНАЛОГАМИ СОМАТОСТАТИНА
НА УСПЕХ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ**

Исследователи	Получали лечение (% ремиссии)	Не получали лечение (% ремиссии)	P
Kristof R.A. et al., 1999	55 %	69 %	ns
Mao Z.G. et al., 2010	49 %	18 %	< 0,001
Carlsen S.M. et al., 2008	45 %	23 %	ns
Carlsen S.M. et al., 2008(макроаденомы)	50 %	16 %	0,02

в зависимости от размера аденомы гипофиза, достоверной разницы между группами получено не было (45 % против 23 % $P = ns$, получавшие предоперационное лечение аналогами соматостатина vs не получавшие терапию). Однако когда были отдельно проанализированы пациенты с макроаденомами, оказалось, что результаты хирургического лечения больных, получавших предоперационную терапию аналогами соматостатина, лучше (50 % достижения контроля заболевания после операции против 16 % в группе, не получавшей предоперационного лечения) [23]. Таким образом, вопрос о необходимости предоперационной терапии остается открытым. Вероятность улучшения прогноза в случае микроадеом минимальна, назначение терапии пациентам с макроаденомой гипофиза может улучшить прогноз, за счет уменьшения размеров опухоли [11, 24]. Перед операцией необходимо оценить функцию гипофиза и при необходимости подобрать заместительную терапию. Вторичная недостаточность коры надпочечников требует специального протокола ведения [11].

Послеоперационное мониторирование включает непосредственное наблюдение в послеоперационном периоде и контроль в отдаленные сроки. Основными задачами наблюдения в первые дни после операции являются диагностика и коррекция послеоперационных осложнений. Необходимо оценивать функцию надпочечников в связи с риском развития вторичной недостаточности коры надпочечников [11]. Функцию задней доли гипофиза необходимо контролировать в течение 2 недель после операции. Необходимы контроль электролитных нарушений, клиники сахарного диабета или синдрома неадекватной продукции АДГ [11]. Гипонатриемия вследствие синдрома неадекватной продукции антидиуретического гормона может развиться на 5–14 день у 5–10 % пациентов после трансфеноидальной операции. Легкая форма заболевания требует ограничения

жидкости, в тяжелых случаях может потребоваться госпитализация и парентеральное введение гипертонического раствора натрия хлорида [25]. Клиника транзиторного несахарного диабета встречается в 20 % случаев, длительная терапия десмопрессином требуется 2–7 % пациентов после трансфеноидальной хирургии [26]. Через 1,5 и 3 месяца оценивают функцию гипофиза с целью диагностики гипопитуитаризма [7].

В литературе обсуждается вопрос выявления ранних предикторов длительной ремиссии акромегалии после хирургического лечения. По данным некоторых авторов, уровень ГР < 2 нг/мл и нормальный уровень ИФР-1, полученные в первый день после операции, позволяют прогнозировать длительную ремиссию акромегалии. Так Krieger M.D. и соавторы показали, что из 116 пациентов, прооперированных по поводу акромегалии, среди тех больных, у которых на следующий день после операции уровень ГР был меньше 2 нг/мл, а уровень ИФР-1 был в пределах нормы, в 99 % случаев через 5 лет наблюдения сохранялась ремиссия заболевания [27]. Однако, следует учитывать, что оценка послеоперационного уровня ГР с прогностической целью имеет ограничения, т.к. хирургический стресс может стимулировать здоровую ткань гипофиза, что приводит к повышению уровня ГР [11]. В настоящее время, согласно большинству рекомендаций, оценку адекватности хирургического лечения, а именно контроль ГР в ОГТТ и ИФР-1, следует выполнять через 3 месяца после операции [7]. Необходимо учитывать, что нормализация уровня ИФР-1 может происходить очень медленно. Если через 3 месяца он повышен (особенно, если ГР соответствует критериям ремиссии), то рекомендуют повторное исследование через 3 месяца [11]. Контроль МРТ для оценки наличия остаточной ткани рекомендуют не раньше чем через 3 месяца после операции [29].

Критерии адекватности хирургического лечения: уровень ГР < 0,4 нг/мл в ОГТТ и нормаль-

ный уровень ИФР-1 для данного пола и возраста [24, 30–32], отсутствие опухоли по данным МРТ [30–32] (таблица 4). В случаях, когда хирургическое лечение оказалось адекватным, рекомендуют контроль ГР в ОГТТ и ИФР-1 ежегодно в течение первых 3 лет, далее периодически, так как описаны случаи рецидива через 10–20 лет после успешного хирургического лечения [11]. Контроль МРТ рекомендуют через 12 месяцев после операции, далее при наличии клинических показаний [33].

Медикаментозная терапия

Основными показаниями для медикаментозной терапии акромегалии являются: недостаточный эффект и сохранение активности заболевания после хирургического лечения, наличие противопоказаний к оперативному лечению, невозможность выполнения операции в ближайшие сроки, ожидание развития эффекта после лучевой терапии [11, 24]. В настоящее время для лечения акромегалии используют три группы препаратов: аналоги соматостатина, агонисты допамина и антагонист рецептора к гормону роста.

Для аналогов соматостатина и агонистов допамина критерии эффективности терапии следующие: уровень ГР < 1 нг/мл при случайном измерении или в одном из измерений, выполненных в течение

3 часов с интервалом 30 минут, уровень ИФР-1 в пределах нормы с учетом возраста [7, 11, 24, 32]. Выполнение ОГТТ в большинстве гайдлайнов не рекомендуется для оценки адекватности медикаментозной терапии [7, 24, 32]. Для антагониста рецептора ГР критерием эффективности лечения является нормальный уровень ИФР-1 в с учетом возраста и пола [7, 11, 24, 32] (таблица 5).

Согласно большинству рекомендаций, в подавляющем большинстве случаев терапия аналогами соматостатина является лечением первого выбора при назначении медикаментозной терапии акромегалии [7, 11, 24, 32].

3.1 Аналоги соматостатина

Секреция гормона роста регулируется посредством взаимодействия стимулирующих и ингибирующих гипоталамических пептидов, а именно гормон роста релизинг гормоном и соматостатином соответственно. Соматостатин ингибирует секрецию ГР путем связывания с соматостатиновыми рецепторами (ССР). Выделяют 5 типов ССР. Большинство аденом гипофиза экспрессируют более чем один тип ССР. Каждый рецептор опосредует определенную функцию. Например, контроль секреции ГР опосредован ССР2 и ССР5, индукция апоптоза ССР3 и, возможно, ССР2, ингибирование клеточного цикла ССР1 и ССР3. ССР1 может играть

Таблица 4

КРИТЕРИИ АДЕКВАТНОСТИ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

№	Показатель или метод исследования	Результат
1.	ГР	< 0,4нг/мл после нагрузки глюкозой в ОГТТ
2.	ИФР-1	Норма для данного пола и возраста
3.	МРТ	Отсутствие опухоли

Примечание: ГР — гормон роста, ОГТТ — оральный глюкозо-толерантный тест, ИФР-1 — инсулиноподобный фактор роста 1, МРТ — магнитная резонансная томография.

Таблица 5

КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ ТЕРАПИИ АКРОМЕГАЛИИ

№	Препараты	Критерии
1.	Аналоги соматостатина и агонисты допамина	Уровень ГР <1нг/мл при случайном измерении или в одном из измерений, выполненных в течение 3 часов с интервалом 30 минут, уровень ИФР-1 в пределах нормы с учетом возраста и пола
2.	Антагонист рецептора ГР (Пегвисомант)	Уровень ИФР-1 в пределах нормы с учетом возраста и пола

Примечание: ГР — гормон роста, ИФР-1 — инсулиноподобный фактор роста 1.

роль в ангиогенезе. В отличие от ткани нормального гипофиза, в ГР-продуцирующих аденомах гипофиза выявлена высокая плотность экспрессии ССР2 и ССР5 [24]. Способность аналогов соматостатина связываться с ССР лежит в основе механизма их действия. Доступные в настоящее время в клинической практике аналоги соматостатина преимущественно связываются с ССР2 типа и в меньшей степени ССР 5 типа [24, 34].

В настоящее время для клинического применения доступны два аналога соматостатина октреотид и ланреотид. Для длительной терапии применяют пролонгированные формы этих препаратов, а именно, октреотид ЛАР и ланреотид Аутожел [11].

Эффективность терапии аналогами соматостатина была оценена в метаанализе 44 исследований, опубликованном Freda P.U. и соавторами в 2005 году. Все пациенты получали терапию октреотидом ЛАР, в качестве терапии второй линии при недостаточном эффекте хирургического лечения. Критерии оценки эффективности терапии были следующие: нормализация уровня ИФР-1, средний уровень ГР меньше чем 2,5 нг/мл, уровень ГР меньше чем 1 нг/мл во время ОГТТ или комбинация этих критериев. Согласно данным этого метаанализа у 57 % пациентов, получавших терапию октреотидом ЛАР были достигнуты целевые значения ГР и у 67 % произошла нормализация ИФР-1 [35].

Эффективность октреотида ЛАР и ланреотида Аутожеля сопоставима в отношении достижения критериев адекватной терапии акромегалии [36, 37]. Schorohl J. с соавторами в 2011 году опубликовали данные, полученные после перевода 37 пациентов, получавших терапию Октреотидом ЛАР на Ланреотид Аутожел. Количество пациентов, достигших ремиссии на фоне лечения, оказалось сопоставимо при назначении в обоих препаратов [37]. В 2012 году Tutuncu Y.T. с соавторами опубликовали результаты рандомизированного исследования, в котором сравнили эффективность октреотида ЛАР и ланреотида Аутожеля в лечении больных акромегалией, у которых трансфеноидальное хирургическое лечение не привело к ремиссии заболевания. Было включено 68 пациентов с акромегалией, прооперированных в период с 2003 по 2009 год с сохранявшейся активностью акромегалии, все они были рандомизированы на 2 группы: 36 пациентов получали терапию Октреотидом ЛАР и 32 пациента Ланреотидом Аутогель в течение 18 месяцев. Через 18 месяцев оценивались биохимические критерии эффективности терапии, а именно ГР в ОГТТ и ИФР-1 (терапия считалась эффективной, если уровень ИФР-1 соответствовал норме, а уровень ГР в ОГТТ был меньше 1мкг/л). Контроль МРТ выполнялся через 12 месяцев.

Через 18 месяцев лечения количество пациентов, достигших целевых значений ГР и ИФР-1 в обеих группах достоверно не отличалось: 63,9 % в группе, получавшей октреотид ЛАР, и 78,1 % в группе, получавшей лантреотид Аутожел ($P = 0,454$). Через 12 месяцев лечения объем опухоли уменьшился достоверно в обеих группах, при этом количество пациентов с положительной динамикой размеров аденомы гипофиза оказалось сопоставимым (28,5 % против 34,9 %, $P = 0,166$) [38]. Таким образом, оба препарата имеют сопоставимую эффективность в отношении как достижения контроля биохимических показателей активности акромегалии, так и в уменьшении размеров опухоли [11, 24, 38].

В одной трети случаев терапия аналогами соматостатина не приводит к контролю заболевания [11, 24]. Индивидуально предсказать ответ на терапию аналогами соматостатина невозможно [24]. Были опубликованы данные, свидетельствующие о некоторой прогностической ценности оценки уровня ГР после тестового подкожного введения октреотида в дозе 50–100 мкг [39]. Однако, результаты других исследований не подтвердили это [40]. Так, по данным Herder W.W. и соавторов положительная и отрицательная прогностическая ценность супрессии ГР < 2 мкг/л при проведении теста с октреотидом в отношении длительной нормализации ИФР-1 на фоне терапии октреотидом ЛАР оказалась 56 % и 75 % соответственно. На основании этих данных авторы сделали вывод о том, что этот тест не может быть рекомендован для оценки прогноза ответа на терапию пролонгированными формами аналогов соматостатина [40]. В настоящее время экспрессия соматостатиновых рецепторов 2 типа рутинно не исследуется. Однако некоторыми авторами получены данные о том, что иммуногистохимическое выявление экспрессии соматостатиновых рецепторов 2 типа в аденомах гипофиза может свидетельствовать о лучшем ответе на терапию аналогами соматостатина [34, 41]. Другие предикторы неблагоприятного ответа на терапию аналогами соматостатина: очень большие размеры аденомы и активный ее рост [18, 19, 32], высокие уровни ГР и ИФР-1 в течение длительного времени [18, 19, 42, 43], большой объем оставшейся после операции ткани аденомы [42, 44], по данным иммуногистохимического исследования экспрессии ГР аденомой малогранулированные опухоли (чем больше плотность гранул, тем выше вероятность положительного ответа) [45, 46], гиперинтенсивное изображение аденомы гипофиза в T2 режиме МРТ [47, 48].

Терапия аналогами соматостатина хорошо переносится большинством больных. Жалобы со

стороны желудочно-кишечного тракта, такие как тошнота, метеоризм, нарушения стула, предъявляет 1/3 больных в первые недели лечения. Эти симптомы развиваются вследствие подавления экзокринной функции поджелудочной железы. В редких случаях жалобы сохраняются более длительное время, могут развиваться стеаторея и мальабсорбция. Назначение панкреатических ферментов приводит к купированию симптомов [32]. У 30–60 % больных, получающих длительное лечение, из-за подавления секреции холецистокинина, могут развиваться сладжи или камни в желчном пузыре. Как правило, они протекают бессимптомно [35, 47]. Редко пациенты предъявляют жалобы на выпадение волос, брадикардию, запоры. Может развиваться нарушение толерантности к глюкозе или сахарный диабет [32, 48].

Пасиреотид (SOM230) — новый аналог соматостатина, не зарегистрированный пока в России, обладает высокой аффинностью к ССР 1, 2, 3 и 5 типов. По сравнению с октреотидом он обладает большим периодом полураспада (2 часа против 27 часов) [49]. Пасиреотид более успешно связывается с ССР 5 типа по сравнению с октреотидом и ланреотидом. Известно, что ряд аденом гипофиза, резистентных к терапии октреотидом преимущественно экспрессируют ССР 5 типа, терапия пасиреотидом этих пациентов, таким образом, может быть более успешной [32]. Также предполагается, что высокая аффинность пасиреотида к ССР 1 типа и ССР 3 типа может приводить к большей стабилизации роста опухоли за счет ингибирования клеточного цикла и индукции апоптоза [24]. Терапия пасиреотидом в дозе 200, 400, 600 мкг подкожно 2 раза в день в течение 28 дней привела к снижению уровня ГР ниже чем 2,5 мкг/л в 19 % случаев, тогда как в группе пациентов, получавших октреотид в дозе 100 мкг три раза в день подкожно в течение 28 дней, такой результат был достигнут только у 9 % больных. Побочные эффекты были сопоставимы в обеих группах за исключением нарушений углеводного обмена, которые чаще встречались у пациентов, получавших терапию пасиреотидом [50].

3.2 Агонисты дофамина

До появления в клинической практике аналогов соматостатина агонисты дофамина были основными препаратами для лечения акромегалии, так как они обладают некоторой эффективностью в отношении подавления гиперсекреции ГР. Применявшийся в течение длительного времени бромкриптин был малоэффективен. В настоящее время основным препаратом этой группы, используемым при лечении акромегалии, является более селективный агонист допаминовых рецепторов 2 типа — каберголин. Ка-

берголин может быть эффективен у большего числа больных акромегалией [51–53]. В настоящее время каберголин уступил пальму первенства в лечении акромегалии аналогам соматостатина, тем не менее, актуальность назначения его в определенных клинических ситуациях несомненна. По данным бельгийского мультицентрового исследования среди 64 больных акромегалией, получавших монотерапию каберголином в дозах от 1,0 до 1,75 мг/нед в течение 3–40 месяцев, снижение уровня ГР ниже чем 2 мкг/л произошло в 46 % случаев и снижение ИФР-1 ниже 300 мкг/л произошло в 39 % случаев. Уменьшение размеров аденомы произошло у 13 из 21 пациента, у которых оценивалась динамика размеров опухоли. В 5 случаях уменьшение было более чем в 2 раза, все эти опухоли имели косекрецию гормона роста и пролактина [51]. В настоящее время основным показанием для назначения каберголина является комбинация с аналогами соматостатина в случаях недостаточной эффективности последних [11, 24 53–56]. Дозы каберголина при акромегалии выше, чем при лечении пролактиномы и составляют 1,75–2,75 мг в неделю [32]. Согласно метаанализу, выполненному Sandret L. с соавторами, добавление каберголина в случаях недостаточной эффективности терапии аналогами соматостатина приводило к нормализации уровня ИФР-1 в 50 % случаев. Изменение уровня ИФР-1 зависело от исходного уровня ИФР-1, но не от дозы каберголина, длительности терапии и наличия косекреции пролактина [54]. Основным критерием успешности терапии каберголином являются исходно умеренно повышенные уровни ГР и ИФР-1 [24]. Некоторые авторы рекомендуют назначение каберголина в случаях косекреции опухолью пролактина [57]. Однако, в целом ряде исследований было показано, что косекреция пролактина не является предиктором ответа на терапию агонистами дофамина [52, 55, 56]. Cozzi R. с соавторами в 2004 году опубликовали данные, полученные при лечении 19 больных акромегалией, у которых терапия аналогами соматостатина замедленного высвобождения оказалась недостаточно эффективной. Добавление к терапии каберголина в дозе 1–3,5 мг/неделю привело к снижению уровня ГР < 2,5 мкг/л в 4 случаях (21 %) и нормализации уровня ИФР-1 в 8 случаях (42 %). Эффект терапии не зависел от косекреции пролактина [53]. Побочные эффекты терапии каберголином: тошнота, рвота, головная боль, астения, нарушения стула, вазоспазм, отеки, расстройства сна. Реже встречаются ортостатическая гипотензия, психомоторные расстройства, визуальные галлюцинации, ретроперитонеальный фиброз. Тяжесть побочных эффектов зависит от дозы препарата, развитие нежелательных явлений

требует ее коррекции. Не следует назначать препараты этой группы пациентам с психическими расстройствами в анамнезе [24]. Следует помнить, что назначение больших доз каберголина (3 мг в день и выше) может приводить к поражению клапанного аппарата сердца. При длительной терапии агонистами дофамина показан контроль эхокардиографии [7, 24, 58].

3.4 Антагонист рецептора ГР

При неэффективном хирургическом лечении назначение аналогов соматостатина или комбинация терапии аналогами соматостатина с каберголином приводят к успешному снижению секреции ГР у 75–80 % больных акромегалией. Пациентам, у которых не удалось достичь ремиссии заболевания, показана терапия антагонистами рецептора ГР. Единственным представителем этой группы в настоящее время является пегвисомант.

Пегвисомант — это, полученный рекомбинантным способом, аналог молекулы 22 kD человеческого гормона роста, который действует как высокоселективный антагонист рецептора к гормону роста [11, 59, 60]. Пегвисомант, соединяясь с рецептором ГР, блокирует его активацию и, как следствие, последующий внутриклеточный сигнал. Лечение пегвисомантом приводит к дозозависимому снижению уровня ИФР-1. Уровень ГР может при этом повышаться. Следовательно, только оценка уровня ИФР-1 должна использоваться для контроля терапии пегвисомантом [11]. Лечение пегвисомантом приводит к нормализации ИФР-1 в 90–97 %, при этом средняя доза препарата составляет 130 мг/неделю, максимальная суточная доза препарата 40 мг/сут, п/к [24, 60]. Пегвисомант не влияет на углеводный обмен и может назначаться пациентам с нарушениями углеводного обмена, в том числе с сахарным диабетом [11, 48]. Комбинированная с аналогами соматостатина терапия приводит к значительному удешевлению лечения, а также уменьшает риск увеличения аденомы гипофиза. Добавление резистентным к терапии аналогами соматостатина пациентов пегвисоманта в средней дозе 60 мг/неделю (разброс 40–80 мг) привело к нормализации ИФР-1 в 95 % случаев через 42 недели [60]. Таким образом, комбинация с аналогами соматостатина позволила значительно снизить дозу пегвисоманта в сравнении со средней дозой 130 мг/неделю, необходимой для достижения компенсации акромегалии при монотерапии [24, 60]. К побочным эффектам терапии пегвисомантом относят повышение уровня ГР, возможное увеличение размеров аденомы гипофиза [59, 61], в связи с этим на фоне терапии рекомендуют контроль МРТ через 6 месяцев после ее начала, далее 1 раз в год [11], а также

бессимптомное и часто транзиторное повышение трансаминаз [62]. К сожалению, в настоящее время пегвисомант не зарегистрирован в России.

Лучевая терапия

Лучевая терапия при лечении акромегалии показана в тех случаях, когда хирургическое лечение и медикаментозная терапия оказываются неэффективными [1, 7, 63]. Благодаря появлению современных эффективных препаратов для лечения акромегалии роль лучевых методов в лечении заболевания значительно уменьшилась. Тем не менее, полностью они не утратили свою актуальность, а с развитием новых технологий, позволяющих прицельно воздействовать на опухоль с одной стороны, и минимизировать облучение окружающих тканей с другой, увеличило интерес к этому методу лечения [64].

В настоящее время выделяют два вида лучевой терапии конвенционную и стереотактическую. По данным проспективных наблюдений применение конвенционной радиотерапии приводит к достижению ремиссии акромегалии у 50–60 % пациентов через 10 лет лечения [64]. Вследствие большого количества побочных эффектов, таких как увеличение смертности от цереброваскулярных событий, увеличение риска новообразований головного мозга, значительное увеличение риска развития гипопитуитаризма [11], и появления новых технологий конвенционная лучевая терапия используется значительно реже при лечении пациентов с акромегалией.

Стереотактическая лучевая терапия.

Основной методикой стереотактической радиохирургии, применяемой при лечении опухолей гипофиза является гамма-нож [64, 65]. Гамма-нож был разработан в 1968 г. Lars Leskell, Швеция. Представляет собой 201 источник радиоактивного кобальта-60 [65]. Каждый источник генерирует пучок фотонов, которые фокусируются в заданной точке. Так как каждый пучок излучения малоинтенсивен, воздействие на окружающие ткани минимально. Доза облучения составляет 20–25 Gy (для сравнения при конвенционной терапии суммарная доза 40–50 Gy). Риск развития оптических осложнений минимален, если доза облучения оптического аппарата не превышает 8–10 Gy. Расстояние между опухолью и оптическим аппаратом должно быть не меньше 2–3 мм [64]. Гамма нож, как основной метод лучевой терапии пациентов с акромегалией, активно применяется в течение двух последних десятилетий [64, 66, 67]. Этот метод лечения доказал свою эффективность за период наблюдения как в отношении развития биохимической ремиссии, так и в отношении

контроль размеров аденомы гипофиза [66, 67]. Также как и для других методов лучевой терапии, для гамма ножа характерно постепенное развитие эффекта. Например, Losa M. и соавторы выполнили ретроспективный анализ данных 83 больных акромегалией, получивших терапию гамма ножом в период с 1994 по 2006 годы. Авторы показали, что количество пациентов, достигших биохимический контроль заболевания, возросло в течение времени и составило 30 %, 52 % и 85 % через 3, 5 и 10 лет соответственно [66]. Наиболее частый побочный эффект терапии гамма ножом это развитие гипопитуитаризма. По данным различных авторов частота встречаемости его составляет 0–47 % [64, 67], чем дольше период наблюдения, тем выше встречаемость недостаточности передней доли гипофиза. Из 39 пациентов в 10 % случаях гипопитуитаризм развился через 2 года, а через 5 лет в 33 % [68]. Другие ассоциированные с лучевой нагрузкой эффекты, а именно краниальные нейропатии, лучевые некрозы головного мозга, и стенозы сонной артерии, развиваются реже, чем после конвенционной лучевой терапии [64]. Риск развития опухоли головного мозга также ниже, чем после конвенционной фракционной терапии [69]. Следует отметить, что применение гамма ножа ограничено двумя десятилетиями, что не позволяет судить об отдаленных эффектах [64].

Заключение

Эффективное лечение акромегалии и ее осложнений позволит уменьшить заболеваемость и смертность среди пациентов, страдающих этой патологией. Для достижения этих целей необходим комплексный подход к терапии. В большинстве случаев трансфеноидальное хирургическое вмешательство в высокоспециализированных медицинских центрах является лечением первого выбора. Своевременная и правильная оценка эффективности хирургического лечения позволит вовремя назначить медикаментозную терапию, а именно аналоги соматостатина. В случаях, когда терапия этими препаратами оказывается недостаточной для достижения контроля заболевания, показано сочетание ее с каберголином. Лучевая терапия, а именно гамма нож, показана в тех случаях, когда нейрохирургу не удалось полностью удалить опухоль, медикаментозная терапия не достаточно эффективна или не переносится пациентом. Также необходимо компенсировать сопутствующие заболевания и связанные с акромегалией осложнения, вовремя оценивать возможные побочные эффекты лечения и корректировать их.

Литература

1. *Melmed S.* Medical progress: acromegaly // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 355. — P. 2558–2573.
2. *Holdaway I. M., Rajasoorya C.* Epidemiology of acromegaly // *Pituitary.* — 1999. — Vol. 2. — P. 29–41.
3. *Daly A.F., Tichomirowa M.A., Beckers A.* The epidemiology and genetics of pituitary adenomas // *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2009. — Vol. 23. — P. 543–554.
4. *Daly A. F., Petrossians P., Beckers A.* An overview of the epidemiology and genetics of acromegaly // *J. Endocrinol. Invest.* — 2005. — Vol. 28. — P. 67–69.
5. *Vasiliev V., Daly A., Zacharieva S., Beckers A.* Management of acromegaly // *F1000 Medicine Reports.* — 2010. / [электронный ресурс]. URRL: doi: 10.3410/M2–54 (дата обращения 14.12.2012).
6. *Colao A., Ferone D., Marzullo P., Lombardi G.* Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management // *Endocr. Rev.* — 2004. — Vol. 25. — P. 102–152.
7. *Melmed S., Colao A., Barkan A. et al.* Guidelines for Acromegaly Management: An Update // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2009. — Vol. 94. — P. 1509–1517.
8. *Sherlok M., Ayuk J., Tomlinson J.W. et al.* Mortality in patients with pituitary disease // *Endocr. Rev.* — 2010. — Vol. 31, № 3. — P. 301–342.
9. *Dekkers O.M., Biermasz N.R., Pereira A.M. et al.* Mortality in acromegaly: a metaanalysis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 93. — P. 61–67.
10. *Holdaway I.M., Bolland M.J., Gamble G.D.* A metaanalysis of the effect of the of lowering serum levels of GH and IGF-1 on mortality in acromegaly // *Eur. J. Endocrinol.* — 2008. — Vol. 159. — P. 89–95.
11. *Katznelson L., Atkinson J.L.D., Cook D.M. et al.* American association of clinical endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of acromegaly-2011 update // *Endocr. Pract.* — 2011. — Vol. 17, Suppl. 4. — P. 1–44.
12. *Jane J.J., Thapar K., Laws E.R.* Acromegaly: historical perspectives and current therapy // *J. Neurooncol.* — 2001. — Vol. 54. — P. 129–137.
13. *Atkinson J.L., Nippoldt T.B.* Pituitary neurologic surgery: a unique subspecialty in evolution // *Endocr. Pract.* — 2002. — Vol. 8. — P. 356–361.
14. *Wolfsberger S., Ba-Ssalamah A., Pinker K. et al.* Application of three-tesla magnetic resonance imaging for diagnosis and surgery of sellar lesions // *J. Neurosurg.* — 2004. — Vol. 100. — P. 278–286.
15. *Cric I., Ragin A., Baumgartner C., Pierce D.* Complications of transsphenoidal surgery: results of a national survey, review of the literature, and personal experience [with discussion] // *Neurosurgery.* — 1997. — Vol. 40. — P. 225–237.
16. *Ahmed S., Elsheikh M., Stratton I.M. et al.* Outcome of transsphenoidal surgery for acromegaly and its relationship to surgical experience // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* — 1999. — Vol. 50. — P. 561–567.
17. *De P., Rees D.A., Davies N. et al.* Transsphenoidal surgery for acromegaly in Wales: results based on stringent

criteria of remission // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2003. — Vol. 88. — P. 3567–3572.

18. *Nomikos P., Buchfelder M., Fahlbush R. et al.* The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical «cure» // *Eur. J. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 152. — P. 379–387.

19. *Shimon I., Cohen Z.R., Ram Z., Hadani M.* Transsphenoidal surgery for acromegaly: endocrinological follow-up of 98 patients // *Neurosurgery.* — 2001. — Vol. 48. — P. 1239–1243.

20. *Beauregard C., Truong U., Hardy J., Serri O.* Long-term outcome and mortality after transsphenoidal surgery for acromegaly // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* — 2003. — Vol. 58. — P. 86–91.

21. *Kristof R.A., Stoffel-Wagner B., Klingmuller D., Schramm J.* Does octreotide treatment improve the surgical results of macroadenomas in acromegaly? A randomized study // *Acta Neurochirurgica* — 1999. — Vol. 141, № 4. — P. 399–405.

22. *Mao Z.G., Zhu Y.H., Tang J.L. et al.* Preoperative lanreotide treatment in acromegalic patients with macroadenomas increases short-term postoperative cure rates: a prospective, randomized trial // *Eur. J. Endocrinol.* — 2010. — Vol. 162, № 4. — P. 661–666.

23. *Carlsen S.M., Lund-Johansen M., Schreiner T. et al.* Preoperative octreotide treatment in newly diagnosed acromegalic patients with macroadenomas increases cure short-term postoperative rates: a prospective, randomized trial // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 93, № 8. — P. 2984–2990.

24. *Plockinger U.* Medical therapy of acromegaly // *International Journal of Endocrinology.* — 2012. / [электронный ресурс]. URRS: doi 10/1155/2012/268957 (дата обращения 14.12.2012).

25. *Olson B.R., Gumowski J., Rubino D., Oldfield E.H.* Pathophysiology of hyponatremia after transsphenoidal pituitary surgery // *J. Neurosurg.* — 1997. — Vol. 87. — P. 499–507.

26. *Nemergut E.C., Zuo Z., Jane J.J., Laws E.J.* Predictors of diabetes insipidus after transsphenoidal surgery: a review of 881 patients // *J. Neurosurg.* — 2005. — Vol. 103. — P. 448–454.

27. *Krieger M.D., Couldwell W.T., Weiss M.H.* Assessment of long-term remission of acromegaly following surgery // *J. Neurosurg.* — 2003. — Vol. 98. — P. 719–724.

28. *Carmichael J.D., Bonert V.S., Mirocha J.M., Melmed S.* The utility of oral glucose tolerance testing for diagnosis and assessment of treatment outcomes in 166 patients with acromegaly // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2009. — Vol. 94. — P. 523–527.

29. *Dina T.S., Feaster S.H., Laws E.J., Davis D.O.* MR of the pituitary gland postsurgery: serial MR studies following transsphenoidal resection // *Am. J. Neuroradiol.* — 1993. — Vol. 14. — P. 763–769.

30. *Freda P.U., Post K.D., Powell J.S., Wardlaw S.L.* Evaluation of disease status with sensitive measures of growth hormone secretion in 60 postoperative patients with acromegaly // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1998. — Vol. 83. — P. 3808–3816.

31. *Guistina A., Chanson P., Bronstein M.D. et al.* A consensus on criteria for cure of acromegaly // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2010. — Vol. 95. — P. 3141–3148.

32. *Melmed S., Casanueva F.F., Klibanski A.* A consensus on the diagnosis and treatment of acromegaly complications // *Pituitary.* — 2012. / [электронный ресурс]. URRS: DOI 10.1007/s11102-012-0420-x (дата обращения 15.12.2012).

33. *Zirkzee E.J., Corssmit E.P., Biermasz N.R. et al.* Pituitary magnetic resonance imaging is not required in the postoperative follow-up of acromegalic patients with long-term biochemical cure after transsphenoidal surgery // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2004. — Vol. 89. — P. 4320–4324.

34. *Plockinger U., Albrecht S., Mawrin C. et al.* Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 93, № 4. — P. 1203–1210.

35. *Freda P.U., Katznelson L., van der Lely A.J. et al.* Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-analysis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2005. — Vol. 90. — P. 4465–4473.

36. *Murray R.D., Melmed S.* A critical analysis of clinically available somatostatin analog formulations for therapy of acromegaly // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 93. — P. 2957–2968.

37. *Schopohl J., Strasburger C.J., Carid D. et al.* Efficacy and acceptability of lanreotide autogel 120 mg at different dose intervals in patients with acromegaly previously treated with octreotide LAR // *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes.* — 2011. — Vol. 119, № 3. — P. 156–162.

38. *Tutuncu Y., Berker D., Isik S. et al.* Comparison of octreotide LAR and lanreotide autogel as post-operative medical treatment in acromegaly // *Pituitary.* — 2012. — Vol. 15. — P. 398–404.

39. *Karavitaki N., Botusan I., Radian S. et al.* The value of an acute octreotide suppression test in predicting long-term responses to depot somatostatin analogues in patients with active acromegaly // *Clin. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 62, № 3. — P. 282–288.

40. *Herder W.W., Taal H.L., Uitterlinden P. et al.* Limited predictive value of an acute test with subcutaneous octreotide for long-term IGF-I normalization with Sandostatin LAR in acromegaly // *Eur. J. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 153, № 1. — P. 67–71.

41. *Ezzart S., Kontogeorgos G., Redelmeier D.A. et al.* In vivo responsiveness of morphological variants of growth hormone-producing pituitary adenomas to octreotide // *Eur. J. Endocrinol.* — 1995. — Vol. 133. — P. 686–690.

42. *Colao A., Pivonello R., Auriemma R.S. et al.* Predictors of tumor shrinkage after primary therapy with somatostatin analogs in acromegaly: a prospective study in 99 patients // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2006. — Vol. 91, № 6. — P. 2112–2118.

43. *Lucas T., Astorga R., Catala M.* Preoperative lanreotide treatment for GH-secreting pituitary adenomas: effect on tumor volume and predictive factors of significant tumor shrinkage // *Clin. Endocrinol.* — 2003. — Vol. 58, № 4. — P. 282–288.

44. Verhelst J.A., Pedroncelli A.M., Abs R. et al. Slow-release lanreotide in the treatment of acromegaly: a study in 66 patients // *Eur. J. Endocrinol.* — 2000. — Vol. 143 № 5. — P. 577–584.
45. Bayana S., Booth G.L., Asa S.L. et al. The implication of somatotroph adenoma phenotype to somatostatin analog responsiveness in acromegaly // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2005. — Vol. 90. — P. 6290–6295.
46. Kiseljic-Vassiliades K., Shafi S., Kerr J.M. et al. Clinical implications of growth hormone-secreting tumors subtypes // *Endocrine.* — 2012. — Vol. 42, № 1. — P. 18–28.
47. Marazuela M., Panigua A.E., Gahete M.D. et al. Somatotroph tumor progression during pegvisomant therapy: a clinical and molecular study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2011. — Vol. 96, № 2. — P. E251–E259.
48. Chigo E., Biller B.M., Colao A. et al. Comparison of pegvisomant and long-acting octreotide in patients with acromegaly naive to radiation and medical therapy // *J. Endocrinol. Invest.* — 2009. — Vol. 32. — P. 924–933.
49. Hoek J.V.D., Herder W.W.D., Feelders R.A. et al. A single dose comparison of acute effects between the new Somatostatin analog SOM230 and octreotide in acromegalic patients // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2004. — Vol. 89, № 2. — P. 638–645.
50. Petersen S., Schopohl J., Barkan A. et al. Pasireotide (SOM230) demonstrates efficacy and safety in patients with acromegaly: a randomised, multicenter, phase II trial // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2010. — Vol. 95, № 6. — P. 2781–2789.
51. Abs R., Verhelst J., Maiter D. et al. Cabergoline in the treatment of acromegaly: a study in 64 patients // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1998. — Vol. 83. — P. 374–378.
52. Cozzi R., Attanasio R., Lodrini S., Lasio G. Cabergoline addition to depo somatostatin analogues in resistant acromegalic patients: efficacy and lack of predictive prolactin status // *Clin. Endocrinol.* — 2004. — Vol. 61, № 2. — P. 209–215.
53. Gatta B., Hau D. H., Catargi B. et al. Re-evaluation of the efficacy of the association of cabergoline to somatostatin analogues in acromegalic patients // *Clin. Endocrinol. (Oxf)* — 2005. — Vol. 63. — P. 477–478.
54. Sandert L., Maison P., Chanson P. Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2011. — Vol. 96, № 5. — P. 1327–1335.
55. Jallad R.S., Bronstein M.D. Optimizing medical therapy of acromegaly: beneficial effects of cabergoline in patients uncontrolled with long-acting release octreotide // *Neuroendocrinology.* — 2009. — Vol. 90, № 1. — P. 82–92.
56. Mattar P., Martins R.A., Abucham J. Short- and long-term efficacy of combined cabergoline and octreotide treatment in controlling IGF-I levels in acromegaly // *Neuroendocrinology.* — 2010. — Vol. 92, № 2. — P. 120–127.
57. Анциферов М.Б., Пронин В.С., Алексеева Т.М., Дорофеева Л.Г. Настоящее и будущее фармакотерапии акромегалии // *Фарматека.* — 2012. — № 249. — С. 16–19.
58. Valette S., Serri K., Rivera J. et al. Long-term cabergoline therapy is not associated with valvular heart disease in patients with prolactinomas // *Pituitary.* — 2009. — Vol. 12, № 3. — P. 153–157.
59. Van Der Lely A.J., Hutson R.K., Trainer P.J. et al. Long-term treatment of acromegaly with pegvisomant, a growth hormone receptor antagonist // *Lancet.* — 2001. — Vol. 358, № 9295. — P. 1754–1759.
60. Feenstra J., De Herder W.W., Ten Have S.M.T.H. et al. Combined therapy with somatostatin analogues and weekly pegvisomant in active acromegaly // *Lancet.* — 2005. — Vol. 365, № 9471. — P. 1644–1646.
61. Buhk J.H., Jung S., Psychogios M.N. et al. Tumor volume of growth hormone-secreting pituitary adenomas during treatment with pegvisomant: a prospective multicenter study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2010. — Vol. 95. — P. 552–558.
62. Schreiber I., Buchfelder M., Droste M. et al. Treatment of acromegaly with the GH receptor antagonist pegvisomant in clinical practice: safety and efficacy evaluation from the German Pegvisomant Observation Study // *Eur. J. Endocrinol.* — 2007. — Vol. 156. — P. 75–82.
63. Gastinetti F., Morange I., Dufour H. et al. Radiotherapy and radiosurgery in acromegaly // *Pituitary.* — 2009. — Vol. 12. — P. 3–10.
64. Minniti G., Scaringi C., Enrici R.M. Radiation techniques for acromegaly // *Radiation Oncology.* — 2011. — Vol. 6. — P. 167.
65. Rolston J.D., Blevins L.S.J. Gamma knife radiosurgery for acromegaly // *International Journal of Endocrinology.* — 2012. / [электронный ресурс]. URRS: Doi:10.1155/2012/821579 (дата обращения 17.12.2012)
66. Losa M., Gioia L., Picozzi P. et al. The role of stereotactic radiotherapy in patients with growth hormone-secreting pituitary adenoma // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 93. — P. 2546–2552.
67. Ronchi C.L., Attanasio R., Verrua E. et al. Efficacy and tolerability of gamma knife radiosurgery in acromegaly: a 10-year follow up study // *Clin. Endocrinol. (Oxf)* — 2009. — Vol. 71. — P. 846–852.
68. Pollock B.E., Jacob J.T., Brown P.D., Nippoldt T.B. Radiosurgery of growth hormone-producing adenomas: factors associated with biochemical remission // *J. Neurosurg.* — 2007. — Vol. 106. — P. 833–838.
69. Minniti G., Traish D., Ashley S. et al. Risk of second brain tumor after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma: update an additional 10 years // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2005. — Vol. 90. — P. 800–804.

НЕВРОЛОГИЧЕСКАЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТОП ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕЙРООСТЕОАРТРОПАТИИ (АРТРОПАТИИ ШАРКО)

А.Г. Демина^{1,2}, В.Б. Бреговский^{1,2}, И.А. Карпова¹

¹ Санкт-Петербургский территориальный диабетологический центр, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Бреговский Вадим Борисович — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИЛ диабетической стопы ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; врач-подиатр Санкт-Петербургского Территориального диабетологического центра ГКДЦ № 1; *Демина Анастасия Геннадьевна* — младший научный сотрудник, НИЛ диабетической стопы Института эндокринологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; врач-подиатр СПб Территориального диабетологического центра ГКДЦ № 1; *Карпова Ирина Альбертовна* — кандидат медицинских наук, заведующая Санкт-Петербургским Территориальным диабетологическим центром ГКДЦ № 1, главный диабетолог Комитета по здравоохранению администрации Санкт-Петербурга.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, пр. Пархоменко, д. 15, Санкт-Петербург, Россия, 194156. E-mail: podiatr@inbox.ru (Вадим Борисович Бреговский — ведущий научный сотрудник НИЛ диабетической стопы).

Резюме

Цель: изучение состояния нижних конечностей у больных сахарным диабетом (СД) с артропатией Шарко (АШ). **Методы.** Выборка больных с АШ проведена из 5430 больных, обратившихся в СПб Территориальный диабетологический центр в 2007–2011 гг. Определяли виды деформаций, вибрационную, болевую, температурную чувствительность, ахилловы рефлексы. На основании рентгенографии поражения классифицировались по Sanders L. & Frykberg R. **Результаты.** Обследовано 254 больных с АШ. Средний возраст $50,9 \pm 11,8$ лет, длительность СД $19,1 \pm 11,4$ года. СД 1 типа/СД 2 типа: 52,4/47,6 %. Язва/ампутация в анамнезе: 63 % и 35,4 %. Нечувствительность к 10-гр. монофиламенту — 70,4 %. Нарушения ахилловых рефлексов выявлены у 90,6 %, вибрационной, температурной и болевой чувствительности — у 90 %, 86,3 % и 87,5 % больных. Виды АШ: I тип — 54,3 %, II и III тип — 57,9 %, IV тип — 10,6 %, V тип — 2 %. Длительность острой и подострой АШ до осмотра — 2,5 мес. (2 нед. — 10 мес.). АШ среднего отдела проявлялась поражением медиального свода (16,1 %); валикообразной стопой, но без деструкции медиального свода (25,8 %); и комбинированным поражением (оба свода) — 58 %. Тип II выявлен у 42,9 % больных, у 53,6 % — сочетание II и III типов поражения. Изолированное поражение III типа — 1 больной: дислокация ладьевидной кости без деструкции. Не выявлено достоверной взаимосвязи между характером деформации и сочетанием пораженных АШ костей. При тяжелых, несовместимых с ходьбой в обычной обуви деформациях, масштаб деструкций был достоверно больше в сравнении с легкими и среднетяжелыми деформациями: медианы 5,5 (1 — 8); 4,5 (3 — 9) и 8 (4 — 12), соответственно, $p < 0,001$. **Выводы.** Больные с АШ характеризуются высокой распространенностью ДПН с одинаковой частотой поражения толстых и тонких волокон, причем сенсорный дефицит, как правило, тяжелый. Наиболее частым вариантом АШ являются поражение I типа, а также сочетание II и III типов. Отсутствие изолированного III типа АШ, а также АШ по типу дислокации (без деструкции) связано с поздним обращением больных. Форма стопы при АШ среднего отдела в значительной степени определяется не только числом пораженных костей, но степенью дислокации разрушенных суставов.

Ключевые слова: сахарный диабет, синдром диабетической стопы, диабетическая артропатия Шарко.

NEUROLOGIC AND MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF FOOT IN PATIENTS WITH DIABETIC NEUROARTHROPATHY (CHARCOT ARTHROPATHY)

A. Demina^{1,2}, V. Bregovskiy^{1,2}, I. Karpova¹

¹ Saint-Petersburg City Diabetes Centre, Saint-Petersburg, Russia

² Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 15 Parhomenko str., Saint-Petersburg, Russia. 194156. E-mail: podiatr@inbox.ru (Vadim B. Bregovskiy — senior researcher of Diabetic Foot Laboratory).

Abstract

Aim: to study the foot status in diabetic patients with Charcot arthropathy (CA). **Methods.** 254 patients with CA have been examined. Neurological examination included: pain, temperature, vibration sensation, Achilles reflexes, monofilament testing. After X-ray examination affected feet were classified according to Sanders L. & Frykberg R. Feet deformities were classified according to severity. **Results.** Mean age $50,9 \pm 11,8$ yrs., duration of DM $19,1 \pm 11,4$ yrs. Type 1 DM /type 2 DM: 52,4/47,6 %. History of ulcer/amputation: 63 % и 35,4 %. Negative monofilament testing: — 70,4 %. Abnormal Achilles reflexes — 90,6 %, abnormal pain, temperature and vibration sensation were noticed in 87,5 %, 86,3 % and 90 % pts, respectively. Distribution of patterns of CA according to X-ray were as follows: I — 54,3 %, II and III — 57,9 %, IV — 10,6 %, V — 2 %. Median duration of acute and subacute CA before the first examination was 2,5 months (2 wk — 10 mo). CA of midfoot were characterized as collapse of the medial arch (16,1 %); rocker-bottom without medial arch pathology (25,8 %); rocker-bottom and medial convexity deformity — 58 %. Type II — 42,9 % and 53,6 % — II and III types. Type III — 1 patient with dislocation without destruction of the navicular. There were no significant relationship between the shape of the foot and character of combinations of destructed bones. However, the number of destructed bones in patients with severe deformities was significantly higher compared to the ones with less severe deformities. **Conclusions.** The prevalence of severe polyneuropathy of small and large fibers in diabetic patients with CA is extremely high. The most frequent types (according Sanders & Frykberg classification) of midfoot CA are type I and combination of type II and III. The absence of pure III type and only 1 case with dislocation without destruction is explained by late diagnosis. The shape of the affected foot in midfoot arthropathy depends not only on the number and localization of destructed bones but also on the degree of joint and bones dislocations.

Key words: diabetes mellitus; diabetic foot; diabetic Charcot arthropathy.

Статья поступила в редакцию 10.01.2013, принята к печати 20.01.2013.

Введение

Согласно определению IWGDF (2011) под диабетической нейроостеоартропатией (стопа Шарко, артропатия Шарко) понимают неинфекционную деструкцию костей и суставов, ассоциированную с нейропатией, которая в острой фазе сопровождается признаками воспаления [1]. Частота этой патологии при сахарном диабете (СД) колеблется от 0,08 % до 0,85 %, однако в специализированных учреждениях (кабинеты «Диабетическая стопа»), частота диагностики АШ может быть в 3–4 раза выше [2, 3].

В 1868 году Жан-Мартен Шарко впервые описал нейрогенный отек и деструкцию голеностопного сустава, вызванную дегенерацией спинного мозга при сифилисе [4]. Артропатия Шарко (АШ) в дальнейшем была выявлена при лепре, сирингомиелии.

В 30-х годах XX века появились данные об АШ при СД [5].

Патогенез АШ до настоящего времени изучен недостаточно. Ж.М.Шарко предположил, что причиной остеодеструкции является поражение «трофических» нервов. Эта гипотеза, дополненная представлениями о нераспознанной травме, как пусковом механизме патологического перелома и следующей за ним лавинообразной остеодеструкции, до настоящего времени считается основой патогенеза АШ.

Предполагается, что основным условием развития АШ является диабетическая полинейропатия (ДПН) нижних конечностей, и, в первую очередь, автономная нейропатия (поражение т.н. «малых волокон») [6]. Поражение малых

немиелинизированных волокон С приводит к исчезновению болевой и температурной чувствительности, а с поражением А-дельта волокон связано нарушение иннервации сосудистой стенки. Автономная ДПН нижних конечностей у больных с АШ достигает степени аутосимпатэктомии, что ведет к раскрытию артериовенозных шунтов с развитием гиперперфузии не только кожи, что проявляется ее гиперемией и отеком, но и увеличением периостального кровотока. При этом внутрикостный кровоток может уменьшаться, что предрасполагает к деструкциям. Изменения кровотока сопровождаются активацией остеокластов и резорбцией кости, причем на первом этапе развития АШ соответствующей активации остеобластов не происходит. В последние годы интенсивно обсуждается роль нарушений взаимодействия между активатором рецептора к лиганду ядерного фактора каппа- β (RANKL) и остеопротегерином, в результате которых остеокласты приобретают автономность функции. Соответственно, при первичном разрушении (микроразрыве) развивается спонтанный остеолит, сопровождающийся выбросом массы провоспалительных медиаторов, которые и определяют картину воспаления в острой фазе АШ [7].

Пациенты с АШ относятся к группе крайне высокого риска развития язвенного дефекта стоп и ампутации. Это связано с изменениями формы стопы, отеком мягких тканей, тяжелыми нарушениями биомеханики стопы. Возникает «конфликт» между стопой и обувью, который в условиях отсутствия чувствительности заканчивается повреждением и развитием язвенно-некротического процесса. Особенно опасным в этом плане являются поражения среднего отдела стопы (суставы Лисфранка, Шопара) [8]. В связи с этим целью нашего исследования стало изучение состояния нижних конечностей у больных СД с АШ.

Методы

Выборка больных с АШ проведена при помощи программы-базы данных «Автоматизированное рабочее место врача-подиатра» из 5430 больных, обратившихся в СПб Территориальный диабетологический центр в 2007–2011 гг.

Проводился стандартный осмотр стоп с определением пульсации артерий стоп, видов деформаций, оценкой чувствительности: порог защитной чувствительности (10-гр монофиламент), вибрационная чувствительность (Биотезиометр или камертон с частотой вибрации 128 Гц), болевая (Neuropen) и температурная чувствительность (Tiptherm), ахилловы рефлексы.

Температуру кожи в области АШ измеряли при помощи инфракрасного термометра и сравнивали со значением в той же области на «здоровой» стопе.

На основании рентгенограмм и данных осмотра выделялись следующие области локализации АШ: пальцы, передний отдел (область плюснефаланговых суставов и диафиза плюсневых костей до их середины), средний отдел (суставы Лисфранка и Шопара), голеностопный сустав и пяточная кость. Поражения среднего отдела классифицировались по Sanders L. & Frykberg R. на тип II (изолированное поражение сустава Лисфранка) и тип III (ладьевидно-клиновидные суставы, таранно-ладьевидный и кальканеокубовидный с сохранением сустава Лисфранка) [2].

На основании рентгенологической картины, данных кожной термометрии и внешнего вида стопы стадия АШ характеризовалась как острая, подострая и хроническая согласно общепринятым критериям [8]. Поражения среднего отдела разделены по тяжести деформаций. Под легкой деформацией стопы понимались минимальные изменения ее формы, позволяющие пациенту ходить в обычной обуви без существенной опасности повреждения. Тяжелая деформация — полное разрушение медиального свода, выраженная девиация плюсневых костей в латеральную сторону, выступающие костные деформации, создающие опасность повреждения в обуви. Остальные стопы, не попадающие под критерии легкой и тяжелой степеней, отнесены к среднетяжелой артропатии.

Результаты

Обследовано 254 больных (126 мужчин и 128 женщин) с АШ, причем у 15,7 % диагностирована АШ обеих конечностей. Распространенность АШ в когорте больных СД составила 4,7 %. Средний возраст $50,9 \pm 11,8$ лет, длительность СД $19,1 \pm 11,4$ года. СД 1 типа страдали 52,4 % больных, среди больных с СД 2 типа треть получала инсулинотерапию. Язвенный дефект стопы в анамнезе имели 63 % обследованных, а 35,4 % до развития АШ перенесли ампутации в пределах стопы. Отмечена высокая распространенность ДПН. Так, нечувствительность к 10-гр. монофиламенту отмечена у 70,4 % больных. Частота нарушений функции толстых и тонких волокон была крайне высокой: нарушения ахилловых рефлексов выявлены в 90,6 % случаев, вибрационной чувствительности у 90 %, температурной чувствительности у 86,3 %, и болевой — у 87,5 % больных. При первичном осмотре у 44,4 % пациентов выявлены язвенные дефекты стоп. Частота поражения различных отделов представлена на рисунке 1.

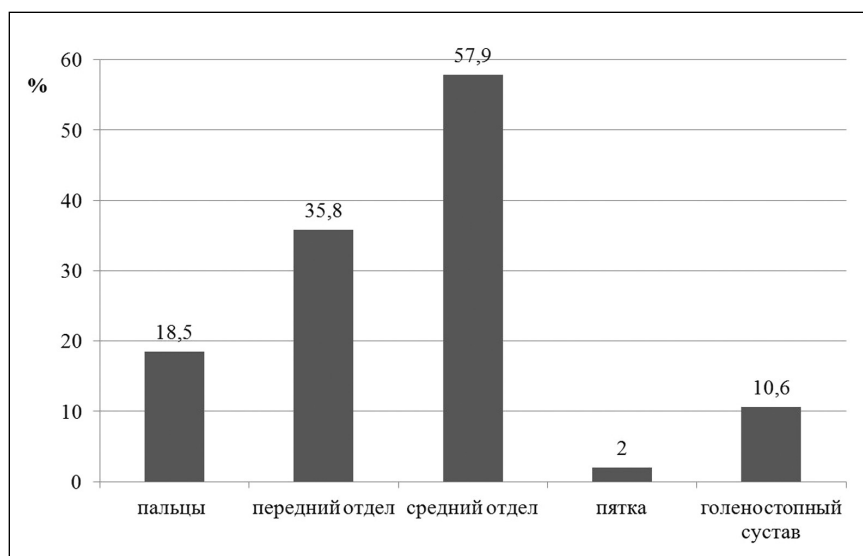


Рисунок 1. Локализация артропатии Шарко

Локализация артропатии Шарко

Наиболее часто поражались передний и средний отделы, АШ пальцев встречалась существенно реже, а деструкции голеностопного сустава и пяточной кости вместе составили 12,6 %. У большинства больных АШ вовлекала только один отдел стопы ($n = 198$, 78 %), однако у 56 больных (22 %) отмечены сочетанные поражения двух или трех отделов на двух стопах, а у 35 пациентов — двух отделов на одной стопе.

На момент обращения хроническая стадия АШ констатирована в 77,5 % случаев (197 больных). В 22,5 % случаев диагностирована острая стадия (19 больных) и подострая (38 больных). Длительность АШ у больных с острой стадией колебалась от 2 недель до 6 месяцев (медиана 1 мес.). Процесс АШ в группе больных с подострой стадией был достоверно более продолжителен (от 1 до 10 мес., медиана — 3 мес.) В то же время, достоверных различий в температурной разнице между пораженной и здоровой стопами у больных с острой и подострой стадиями не выявлено ($2,8 \pm 1,2$ и $3,0 \pm 1,5$ °C, соответственно).

Особый интерес с клинической точки зрения представляют поражения среднего отдела. Это обусловлено наибольшей их частотой и значительными последствиями для стопы и конечности в случае тяжелых деформаций.

Отмечены три варианта АШ в среднем отделе: преимущественное поражение медиального свода (16,1 %), поражение с формированием валикообразной стопы, но без значимой деструкции медиального свода (25,8 %), и комбинированное поражение (58 %). Анализ тяжести АШ при различных ее клинических вариантах в среднем от-

деле показал, что комбинированное поражение (валикообразная стопа и внутренний свод) чаще всего сопровождается наибольшей тяжестью поражения (64,7 %), в то время как изолированное поражение медиального свода сопровождается тяжелыми деформациями в 15,3 % случаев. Частота тяжелых деформаций при АШ по типу валикообразной стопы составила 38,9 %.

Анализ рентгенологических данных при поражении среднего отдела показал, что тип II по классификации Sanders & Frykberg определялся у 42,9 % больных, в то время как у 53,6 % больных выявлено сочетание II и III типов поражения с вовлечением не только сустава Лисфранка, но и таранной, кубовидной и ладьевидной костей и соответствующих суставов. Изолированное поражение III типа в обследованной когорте выявлено лишь у 1 больного, у которого АШ проявилась в виде вывиха и дислокации ладьевидной кости, не сопровождающихся деструкцией. В остальных случаях рентгенологическая картина свидетельствовала о наличии патологических переломов и остеолита, которые у 37 % больных сопровождались вывихами суставов стопы и дислокациями костных структур.

Частота поражения костей стопы у больных с АШ в среднем отделе различалась. Чаще всего отмечены деструкции центральной части сустава Лисфранка: 1 и 2 клиновидной кости (КК1 и КК2) (11,5 % и 13,1 %), основания 2 и 3 плюсневой костей (ПК2 и ПК3) (13,7 % и 10,9 %). Поражения таранной кости и 5 плюсневой кости были редкими (по 3,3 %).

Число пораженных костей на 1 стопу при АШ легкой степени и средней степени тяжести досто-

верно не различалось, но при тяжелых, несовместимых с ходьбой в обычной обуви деформациях, было достоверно больше: медианы 5,5 (1–8); 4,5 (3–9) и 8 (4–12), соответственно, $p < 0,001$.

При анализе частоты поражения отдельных костей при различных клинических вариантах АШ в среднем отделе выявлено, что при изолированном поражении медиального свода чаще поражались КК1 и КК2 и проксимальная головка ПК2 (20–16 %), при этом частота поражения проксимальной головки ПК1 не превышала 5 % (Рисунок 2).

Частота поражений костей среднего отдела стопы в зависимости от характера деформации

При деформации по типу валикообразной стопы достоверных различий в частоте деструкций различных костей выявлено не было, за исключением 1 ПК и таранной, которые вовлекались несколько реже. Сочетание поражения медиального свода с валикообразной деформацией проявлялось примерно одинаковой частотой разрушения КК2 (10–12 %), деструкцией основания ПК1 (15 %). При этом варианты основания ПК2 и ПК3 поражались с той же частотой.

Вовлечение кубовидной и ладьевидной костей встречалось при поражении внутреннего свода в 2–3 раза реже, чем при валикообразной деформации или комбинированном поражении обоих сводов, однако достоверных различий в этом аспекте между двумя последними вариантами не выявлено.

Обсуждение

Особенностью обследованной нами когорты больных является тяжелая патология стопы до развития АШ. Так, подавляющее большинство пациентов имели крайне тяжелую ДПН с поражением всех типов волокон, а доля больных с язвами стоп и/или малыми ампутациями в анамнезе достигала 63 и 35 %, соответственно. Вероятно, этими факторами объясняется высокая частота I типа поражения по классификации Sanders & Frykberg, т.к. АШ в зоне плюснефаланговых суставов нередко развивается в послеоперационный период. С другой стороны, частота поражений пяточной кости (V тип) и области голеностопного и подтаранного сустава (IV тип) в целом, соответствует литературным данным [8].

Закономерным течением артропатического процесса является постепенное снижение температурной разницы между пораженной и не пораженной конечностями, которая при острой АШ может достигать 5–8°C [9]. В нашем исследовании средняя температурная разница у лиц с острой АШ была относительно невелика и достоверных различий в острую и подострую стадии выявлено не было. Это может быть обусловлено более поздним обращением больных в специализированный КДС, чем в практике зарубежных центров [3, 8, 9]. В связи с этим многие больные впервые были осмотрены специалистом кабинета «Диабетическая стопа» на стадии, когда острая артропатия уже прошла или переходила в подострую, а подострая стадия

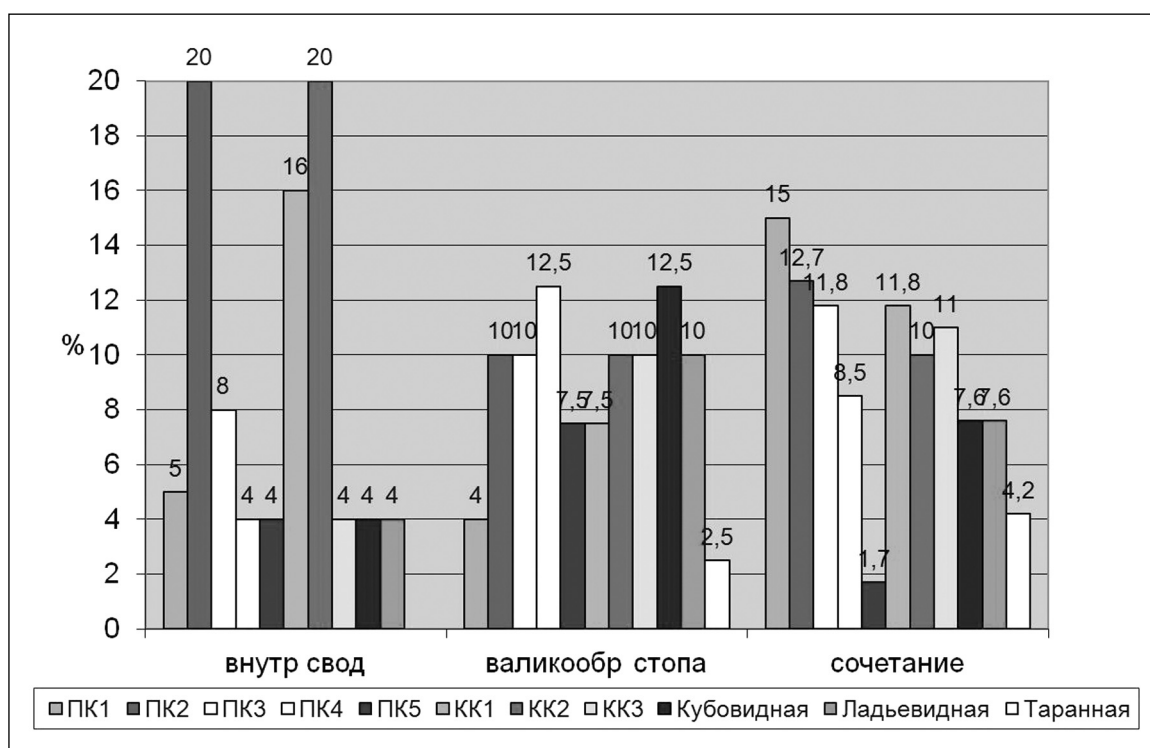


Рисунок 2. Частота поражений костей среднего отдела стопы в зависимости от характера деформации

уже завершалась. Отсутствием своевременного диагноза можно также объяснить большую частоту сочетанного поражения среднего отдела (2 и 3 типы), сопровождающегося значительной тяжестью деформаций обоих сводов стопы: крайне тяжелые деформации, несовместимые с ходьбой или использованием несложной ортобуви, отмечены почти у 40 % больных. Кроме того, нами отмечен лишь один случай 3 типа поражения, сопровождающегося только вывихом ладьевидной кости без деструкций. Подобное развитие АШ в виде дислокации сустава без сопутствующей деструкции, описанное в литературе в относительно небольшом количестве, также возможно исключительно на ранних стадиях процесса (до 1 недели) [10, 11]. В обследованной группе только 2 пациента были осмотрены нами в течение 2 недель с момента развития симптомов, а средний срок длительности АШ до осмотра в кабинете «Диабетическая стопа» составил 3,7 мес.

Особенности распределения частоты поражения костей стопы, по-видимому, следует искать в характере переноса веса тела при ходьбе. Линия движения центра давления при перекате стопы проходит именно в проекции 2 клиновидной кости и через основание 2 плюсневой кости, которые являются основой стабильности стопы, и разрушение в этой области может привести к деструкции всего сустава Лисфранка [8]. Очевидно, максимальная нагрузка в этой зоне чаще реализуется в артропатию Шарко. Сдвиг в латеральную сторону остальных плюсневых костей сопровождается появлением латеральной валикообразной деформации, а дальнейшее разрушение костей в медиальном и центральном отделе сустава Лисфранка приводит к валикообразной стопе и коллапсу внутреннего свода. По нашим данным частота поражения ПК2 и КК2 составила 20 %. Частота поражения других костей была меньше и ни одно из сочетаний поражений не достигало статистически значимых отличий. По-видимому, отсутствие убедительной взаимосвязи между частотой пораженных артропатией костей (взятых по отдельности или в сочетаниях) и типом деформации стопы при легких и среднетяжелых деформациях обусловлено тем, что степень дислокации варьировалась от пациента к пациенту, и ее выраженность не представлялось возможным оценить объективно. В то же время обращает на себя внимание более высокая частота вовлечения ПК1, которая отмечается при наиболее тяжелом с клинической точки зрения варианте артропатии — с комбинированным поражением обоих сводов. Кроме того, при подобном варианте АШ отмечено достоверное увеличение масштабов остеодеструкции, выражающееся в увеличении числа пораженных костей.

Выводы

Больные с артропатией Шарко характеризуются высокой распространенностью полинейропатии с одинаковой частотой поражения толстых и тонких волокон, причем сенсорный дефицит, как правило, тяжелый.

Наиболее частым вариантом артропатии Шарко являются поражение I типа, а также сочетание II и III типов по классификации Sanders & Frykberg, которая сопровождается деструкцией медиального и латерального сводов стопы одновременно.

Отсутствие изолированной артропатии III типа, а также артропатии по типу дислокации (без деструкции) связано с поздним обращением больных.

Форма стопы при артропатии среднего отдела в значительной степени определяется не только числом пораженных костей, но степенью дислокации разрушенных суставов.

Список сокращений

АШ — артропатия Шарко
ДПН — диабетическая полинейропатия
КК (1, 2, 3) — клиновидная кость
ПК (1, 2, 3, 4, 5) — плюсневая кость
СД — сахарный диабет

Литература

1. International Working Group on the Diabetic Foot. International Consensus on the Diabetic Foot, 2011.
2. Sanders L., Frykberg R. «Diabetic neuropathic osteoarthropathy: charcot foot,» in: The High Risk Foot in Diabetes Mellitus. (Frykberg R.G. ed.), Churchill Livingstone, New York, 1991.
3. Vallini V., Piaggese A., Zampa V. Five years of activity of an outpatient clinic dedicated to the neuro-osteoarthropathy of the diabetic foot // Abstracts of 6th International Symposium on The Diabetic Foot. — 2011. — P. 103.
4. Charcot J. Sur quelques arthropathies qui paraissent dependre d'une lesion du cerveau ou de la moelle epiniere // Arch Physiol Norm Pathol. — 1868. — Vol. 1. — P. 161–178.
5. Jordan W. Neuritic manifestations in diabetes mellitus // Arch Intern Med. — 1936. — Vol. 57. — P. 307–366.
6. Mabilieu G., Edmonds M. Role of neuropathy on fracture healing in Charcot neuro-osteoarthropathy // J. Musculoskelet Neuronal Interact. — 2010. — Vol. 10. — P. 84–91.
7. Mabilieu G., Petrova N., Edmonds M. et al. Increased osteoclastic activity in acute Charcot's osteoarthropathy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand // Diabetologia. — 2008. — Vol. 51. — P. 1035–1040.
8. Sanders L., Frykberg R. Charcot neuroarthropathy of the foot. In: Levin and O'Neal's The diabetic foot. Ed. Bowker J. and Pfeifer M. — 2001. — Ch. 21. — P. 439–466.

9. *Armstrong D., Todd W., Lavery L. et al.* The natural history of acute Charcot's arthropathy in a diabetic foot specialty clinic // *J. Am Podiatr Med Assoc.* — 1997. — Vol. 87. — P. 272–278.

10. *Newman J.* Non-infective disease of the diabetic foot // *The Journal of bone and joint surgery.* — 1981. — Vol. 63. — P. 593–596.

11. *Herbst S., Jones K., Saltzman C.* Pattern of diabetic neuropathic arthropathy associated with the peripheral bone mineral density // *J. Bone Joint Surg.* — 2004. — Vol. 86. — P. 378–383.

К ИСТОРИИ МЕДИЦИНСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ СЕСТРОРЕЦКА

С.Г. Щербак, А.Е. Попов, Ю.М. Докиш, Д.А. Журавлев

СПбГБУЗ «Городская больница № 40», Санкт-Петербург, Россия

Щербак Сергей Григорьевич — главный врач СПбГБУЗ «Городская больница № 40», доктор медицинских наук, профессор; *Попов Алексей Евгеньевич* — заместитель главного врача по внебюджетной деятельности и маркетингу СПбГБУЗ «Городская больница № 40»; *Докиш Юрий Михайлович* — кандидат медицинских наук, заместитель начальника научно-методического отдела организации восстановительного лечения и реабилитации СПбГБУЗ «Городская больница № 40»; *Журавлев Дмитрий Алексеевич* — специалист СПбГБУЗ «Городская больница № 40», кандидат исторических наук.

Контактная информация: СПбГБУЗ «Городская больница № 40, ул. Борисова, д. 9, Сестрорецк, Россия, 197706. E-mail: demetrio_s@mail.ru (Журавлев Дмитрий Алексеевич).

Резюме

В статье изложены основные события возникновения и развития медицинских учреждений Сестрорецка, от лазарета, открытого в середине XVIII века, до современного крупного стационара Санкт-Петербурга, Городской больницы № 40. Определены основные обстоятельства, повлиявшие на формирование медицинских учреждений Сестрорецка, актуальные задачи, стоявшие перед ними, вклад главных врачей.

Ключевые слова: лазарет, завод, лекарь, врач, больница, реабилитация.

BRIEF HISTORY OF MEDICAL INSTITUTIONS IN SESTRORETSK

S.G. Scherbak, A.E. Popov, Yu.M. Dokish, D.A. Zhuravlev

Saint-Petersburg State Budget Establishment of Health Care City Hospital No 40, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Saint-Petersburg State Budget Establishment of Health Care City Hospital No 40, 9 Borisova str., Sestroreetsk, Russia, 197706. E-mail: demetrio_s@mail.ru (Dmitry A. Zhuravlev — PhD, specialist).

Abstract

The article describes the basic stages of genesis and evolution of medical institutions of Sestroretsk, starting from a lazaret, opened in the 18th century, to a big modern hospital of Saint-Petersburg, City hospital № 40. The main factors which have influenced medical institutions of Sestroretsk, their actual problems, the role of their chef physicians are determined.

Key words: lazaret, plant, physician, doctor, hospital, rehabilitation.

Статья поступила в редакцию 12.01.13, принята к печати 23.01.13.

История медицины Сестрорецка имеет множество своеобразных и крайне любопытных страниц, они характеризуют развитие самого города, ставшего сегодня частью Санкт-Петербурга, его социальной и экономической жизни на протяжении трех столетий. Вместе с тем, выделяется четкая тенденция развития медицинской сферы Сестрорецка, которая заключа-

ется в доминировании фундаментального лечебного учреждения, будь то XVIII–XIX века, или современность. В нем концентрировались материальные ресурсы, интеллектуальный потенциал, и качество жизни горожан определялось этими учреждениями.

В своем исследовании мы не будем затрагивать вопросов традиционных методов лечения,

которые использовали жители данного региона к началу XVIII в., и начнем свой рассказ с периода петровских преобразований. Медицина, как и многое в Санкт-Петербурге, связано с гением Петра Великого. В 1721 г. в Сестрорецке был заложен, а в 1724 году открыт знаменитый на всю Россию оружейный завод. [3]. Столь мощное производство даже в те времена не могло обходиться без стационара, и в 1748 г. при заводе был открыт лазарет на 50 коек. Именно 1748 год считается годом основания Городской больницы № 40, преемницей первого медицинского учреждения Сестрорецка. Со временем, менялось число коек, название и месторасположение в нашем городе этого лечебного учреждения, а по функциям оно являлось правопреемником предыдущих медицинских учреждений и оставалось единственным стационаром для жителей Сестрорецка.

При обращении к «Послужному списку, состоящих в ведомстве Сестрорецкого завода разных чинов служителей», можно выявить имена и фамилии некоторых врачей, служивших на заводе. Среди них, более 20 лет, лекарем был Петр Федорович Ширяев. Незаурядный человек из простых солдатских детей, он обучался в госпитале лекарских учеников, окончил его в двадцать лет в 1760 г. подлекарем, в 1763 г. стал лекарем с окладом 150 рублей в год, а затем и штаб-лекарем лейб-гвардии Преображенского полка.

Работы у лекаря на заводе было немало, чему способствовали крайне тяжелые условия труда, социальная неустроенность оружейников. Рабочий, страдающий каким-либо заболеванием или получивший травму на заводе, лечился заводским врачом на дому. На содержание больного, поступившего в лазарет, вычиталась половина из получаемого работниками провианта и жалования, с незначительными процентами на приобретение медикаментов. Больной рабочий получал на свое выздоровление 3 копейки в день. [2]. Женщины и дети рабочих лечились домашними методами в основном у местных знахарок.

Анализ списков умерших показывает, что в основном причинами смерти на заводе становились цинга, чахотка. На содержание больного в лазарете вычиталась половина получаемого им мизерного провианта и заработка. Незначительные денежные начисления выдавались больному на приобретение необходимых лекарств. Однако это мало улучшало положение рабочих, большая часть не получала никакой медицинской помощи.

В 1808 г. лазарет переоборудовали в полугоспиталь на 77 коек только для лиц мужского пола. Мальчиков начинали лечить с 8 летнего возраста, а женщин, девочек и мальчиков младше 8 лет лечили на дому врачи из лазарета. Заболеваемость среди рабочих в течение многих лет не снижалась. Самыми распространенными недугами были



Здание Сестрорецкой больницы имени Олицкого. 1947 год. Здание сохранилось до настоящего времени

простудные заболевания, нервные и желудочные болезни. [2]

В 1874 г. Сестрорецкая волость получила своего врача, но у него не было постоянного приемного покоя. Частые эпидемии тифа и оспы уносили массу людей, гибли мастеровые и их семьи. Это заставило администрацию завода принимать меры к улучшению медицинской помощи. В 1884 г. под земскую больницу Сестрорецкой волости для женщин и детей были переданы освободившиеся Никольские казармы. Весь штат этого лечебного учреждения состоял из врача, фельдшера и акушерки.

Начало XX века вписывает новую, яркую страницу в историю больницы и связана она с именем талантливого хирурга Сергея Юльевича Малевского (1869–1934). В нелегкий для истории нашей страны год, 1917-й, он приступает к работе в Сестрорецке. На базе полугоспиталя Оружейного завода, располагавшегося в деревянном здании на берегу озера Разлив, он организует больницу. В ней нашлось место для трех небольших отделений — хирургического, терапевтического, гинекологического. Благодаря настойчивости Малевского, больнице были переданы помещения по улице Володарского. В последующие годы здесь в течение 40 лет располагалась Сестрорецкая больница имени Олицкого. С.Ю. Малевский воплотил в себе лучшие качества русского врача. В первую очередь, он исходил из потребностей

больного. Он мог оперировать подолгу, приходил в больницу каждый день, нередко оставался у постели тяжелобольного на ночь. За это его любили пациенты, коллеги, подчиненные. В тяжелые годы после окончания Гражданской войны Сергей Юльевич смог обеспечить больницу всем необходимым. Семья Малевского жила довольно бедно, но при этом Сергей Юльевич на свои средства приобретал инструментарий для операционной, приносил из дома крупу для приготовления супа, заботясь о питании послеоперационных больных. [1]. И поныне в Сестрорецке помнят этого доброго человека, отличного врача.

В предвоенные годы основным медицинским центром Сестрорецка являлась больница имени Олицкого, имевшая 180 коек и поликлиника, к которой в 1936 году было пристроено новое здание. К 1937 году в лечебных заведениях Сестрорецка работало 40 врачей.

Великая Отечественная война 1941–1945 гг. не пощадила больницы. Она располагалась практически на линии фронта, и судьба ее была предрешена. В здание больницы было несколько прямых попаданий, она была сильно разрушена. Известно, что в суровые блокадные дни лечением жителей на участке от поселка Разлив до Лисьего Носа занимались два врача — молодой врач Нина Александровна Губанова и опытный врач с большим ста-



Здание реабилитационного центра СПбГБУЗ «Городская больница № 40»

жем работы Таисия Федоровна Петрова-Алпатова. Т.Ф. Петрова-Алпатова вместе с будущим супругом, врачом-хирургом Василием Александровичем Алпатовым окончили в 1932 году 2-й медицинский институт, работали в поликлинике им. Малевского. В.А. Алпатов служил хирургом на фронте во время Советско-финляндской войны, скоропостижно скончался в ноябре 1941 года в Сестрорецке в возрасте 47 лет. Т.Ф. Петрова-Алпатова всю войну работала участковым врачом в поселке Лисий Нос и Сестрорецке. Многие жители Курортного района Санкт-Петербурга обязаны этим врачам жизнью, тем, что сумели выстоять в страшные дни.

В первые послевоенные годы недалеко от полуразрушенной больницы располагался лагерь немецких военнопленных № 393 (лаготделение 1), эти военнопленные и привлекались к восстановлению больницы и других разрушенных зданий в Сестрорецке вплоть до их отъезда в Германию в 1949 году. [6]. Восстановлением разрушенной больницы и ее развитием в мирный период занимался главный врач Николай Евгеньевич Слупский (1899–1964), выпускник Военно-медицинской академии. Таким образом, история больницы тесным образом связана с Военно-медицинской академией, её выпускники — военные врачи, неоднократно становились главными врачами больницы и внесли достойный вклад в её развитие. Талант Николая Евгеньевича как хирурга был хорошо известен не только жителям Сестрорецка, но и далеко за его пределами. Н.Е. Слупский послужил прообразом героя романов Юрия Германа «Дорогой мой человек», «Дело, которому ты служишь», «Здоровствуйте, доктор!» и повести «Повесть о докторе Николае Евгеньевиче».

Возможности больницы, имевшей в своем составе всего 200 коек, были недостаточны для растущего Сестрорецкого района. 24 июля 1963 г. была открыта Объединенная больница № 40, что знаменовало собой переход на иной качественный уровень в обслуживании жителей Сестрорецка и Ленинграда. [5]. С середины 1960-х годов начинается расширение больницы, строятся новые корпуса — детский, пульмонологический, хирургический, терапевтический. Было открыто первое в Ленинграде специализированное проктологическое отделение.

11 мая 1974 года на базе больницы в соответствии с планом Министерства здравоохранения РСФСР был открыт первый в СССР стационарный реабилитационный центр на 520 коек. Интерес к работе центра был настолько велик, что ежегодно его посещало до 50 медицинских иностранных делегаций, а в спинальном отделении находились

на лечении пациенты из США, Италии, Канады, Турции, Сирии. [4].

Постепенно шло развертывание и других отделений центра. Всего в больнице на тот период насчитывалось 630 коек восстановительного лечения, а ее мощность в 1974 году достигла 1200 коек. В 1975 г. было построено 2 корпуса общежития для медицинских сестер на 720 мест, что в значительной степени помогло решить кадровый вопрос со средним медицинским персоналом.

Возникла необходимость в научном обобщении полученных результатов. С 10 по 12 января 1978 г. в гостинице «Репинская» была проведена городская научно-практическая конференция «Организация и эффективность реабилитации в медицинских учреждениях Ленинграда». Это была первая научно-практическая конференция в истории здравоохранения Ленинграда, возможно и Советского Союза, полностью посвященная вопросам реабилитации и восстановительного лечения. На конференции было представлено 26 докладов от сотрудников реабилитационного центра больницы № 40. В 1980 г. материалы конференции были изданы отдельным сборником.

Высокая эффективность реабилитации больных в эти годы достигалась за счет довольно длительного курса лечения с использованием эффективных методик, разработанных в то время совместно с рядом медицинских научно-исследовательских институтов Ленинграда, достаточным штатом и хорошей укомплектованностью инструкторами лечебной физкультуры для групповых и особенно индивидуальных занятий, медсестрами физиотерапии и медсестрами по массажу, их кропотливой ежедневной работой с больными. Таким образом, за советский период своего существования больница имела широкую известность, а ее деятельность была во многом новаторской.

Трудности и лихолетье последних десятилетий прошлого века больнице и центру удалось пережить без существенных потерь. Главное — был сохранен коллектив, который продолжал активно работать как в области лечения и реабилитации, так и интенсивно заниматься научными исследованиями. С 2005 г. началось широко-масштабное восстановление всей больницы и центра. В настоящее время Санкт-Петербургское Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Курортного района «Городская больница № 40» входит в пятерку наиболее мощных 1000-коечных стационаров Санкт-Петербурга и занимает ведущее место по числу коек восстановительного лечения и медицинской реабилитации в Российской Федерации.

Функционально отделения восстановительного лечения больницы объединены в Городской научно-методический центр восстановительной медицины и реабилитации (ЦВМР), где результаты лечебной работы подвергаются подробному научному анализу, служащему основой для разработки современных методических рекомендаций, научных статей. Ежегодно на отделениях восстановительного лечения больницы получают медицинскую помощь до 10 тыс. пациентов. В процессе восстановительного лечения и реабилитации в центре, наряду с общепринятыми, внедрены новейшие разработки отечественных и зарубежных ученых по технологиям восстановительной медицины. [6].

За последние годы значительное внимание в Городской больнице № 40 проделана большая работа по организации высокотехнологичной медицинской помощи, оказываемой пациентам с заболеваниями сердца. Отделение сердечно-сосудистой хирургии занимается оказанием специализированной, в том числе высокотехнологичной, медицинской помощи по следующим направлениям: кардиохирургия, сосудистая хирургия, рентгенэндоваскулярная хирургия, хирургическая аритмология.

Большое внимание уделяется в больнице развитию научных исследований. Научный потенциал лечебного учреждения не был таким мощным за всю его историю. В коллективе работает в настоящее время 12 докторов медицинских наук, 49 кандидатов медицинских наук, 1 кандидат исторических наук и 1 кандидат технических наук, 177 врачей высшей категории.

Городская больница № 40 является уникальным многопрофильным медицинским учреждением, где пациентам оказывается квалифицированная, высокотехнологичная комплексная медицинская помощь с применением самого современного медицинского оборудования и новейших медицинских технологий от амбулаторно-диагностической и неотложной медицинской помощи, до лечения огромного коли-

чества заболеваний в острой стадии с последующей реабилитацией в отделениях восстановительного лечения.

За более чем 35-летний период существования центра реабилитации на базе больницы № 40 восстановительное лечение получило более 250 000 больных и инвалидов. Не счесть тех, кому была оказана помощь, чья жизнь спасена благодаря медицинскому персоналу больницы за два столетия ее истории. Традиции гуманизма и милосердия, которыми руководствовались медики сестрорецкой больницы на протяжении всех этих лет, сохраняются в Городской больнице № 40 и сегодня. Об этом могут рассказать ее многочисленные благодарные пациенты.

Литература

1. *Гаттук П.Г.* Сергей Юльевич Малевский (1869–1934) / Вопросы диагностики и лечения в условиях многопрофильной больницы. Л.: «Издательство Медицина», 1971. С. 7–11.
2. *Иванова Н.Л.* Жизнь военного поселения в XVIII веке / История Сестрорецка и его окрестностей. Том 1. От истоков до конца XVIII века. СПб: «Остров», 2005. С. 136, 137.
3. *Кубарева А.С.* История Сестрорецка и его завода / Курортный район. Страницы истории. Выпуск 1. СПб: «Остров», 2005. С. 8–9.
4. *Кукушкина Т.Н.* Опыт работы стационарного центра реабилитации городской больницы № 40 Ленинграда / Организация и эффективность реабилитации в медицинских учреждениях (Материалы научно-практической конференции). Под ред. К.И.Журавлевой. Л.: Медицина, 1980. С. 20.
5. *Смирнов М.И.* Предисловие / Вопросы диагностики и лечения в условиях многопрофильной больницы. Л.: «Медицина», 1971. С. 3.
6. *Щербак С.Г., Докиш Ю.М., Терешин А.Е.* 35 лет первому в России (СССР) центру восстановительной медицины и реабилитации. Исторический очерк. СПб.: НПО «Стратегия будущего», 2009. С. 5, 12.

ПРАВИЛА ПОДАЧИ РУКОПИСЕЙ

(составлены с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов)

«Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокардиологии им. В.А. Алмазова» представляет на своих страницах оригинальные статьи, обзоры литературы, клинические лекции и наблюдения, учебно-методические публикации. Значительное место отведено публикациям, представляющим новые технологии оказания высокотехнологичной медицинской помощи.

Издание рассчитано на широкий круг читателей — врачей-специалистов, терапевтов, врачей общей практики, семейных врачей, студентов медицинских ВУЗов, научных работников и преподавателей — и отражает современные взгляды на необходимость развития междисциплинарного подхода к решению проблемы снижения смертности и увеличения продолжительности жизни в РФ.

В журнале имеются следующие разделы: 1) передовые и редакционные статьи; 2) оригинальные статьи; 3) обзоры и лекции; 4) рекомендации для практического врача; 5) дискуссии; 6) краткие сообщения; 7) исторические очерки; 8) информация о планах проведения конференций, симпозиумов, съездов; 9) реклама.

Общими критериями для публикации статей в журнале «Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокардиологии им. В.А. Алмазова» являются актуальность, новизна материала и его ценность в теоретическом и/или прикладном аспектах. Редакция обеспечивает экспертную оценку (рецензирование) рукописей. На основании двух письменных рецензий и заключения редколлегии рукопись принимается к печати, отклоняется или возвращается автору (авторам) на доработку.

Редакция оставляет за собой право публиковать принятые к печати статьи в том виде и последовательности, которые представляются оптимальным для журнала.

Оформление рукописи. Статьи представляются в редакцию в двух экземплярах, напечатанных на одной стороне белой непрозрачной бумаги формата А4 (210 × 297 мм). Текст должен быть напечатан через 2 интервала, черным шрифтом «Times New Roman» (шрифт 14), с полями: сверху — 20 мм, слева — 30 мм, справа — 10 мм, снизу — 25 мм; а также на электронных носителях или по электронному адресу: bulleten@almazovcentre.ru.

Все страницы должны быть последовательно пронумерованы. Рукопись оригинальных статей (и кратких сообщений) должна включать в себя следующие разделы: 1) титульный лист; 2) резюме; 3) ключевые слова; 4) введение; 5) материалы и методы; 6) результаты; 7) обсуждение; 8) список литературы; 9) иллюстрации; 10) подписи к рисункам; 11) таблицы.

Титульный лист печатается на отдельной странице и включает: ФИО, должность и ученую степень автора (всех соавторов), место (места) выполнения работы и подписи всех авторов (заверяющие согласие на научное и литературное редактирование статьи и передачу редакции журнала прав на статью в отредактированном виде). В нижней части этого листа следует указать ФИО, полный почтовый адрес, телефон, факс и e-mail, должность и ученую степень автора на русском и английском языках, с которым редакция будет поддерживать контакт. Статья должна сопровождаться официальным направлением от учреждения, в котором выполнена работа, иметь визу научного руководителя. В направлении можно указать, является ли статья диссертационной.

Резюме (Abstract) на русском и английском языках объемом не более 200 слов, включающее ФИО авторов и место выполнения работы, ключевые слова (не более 5). Резюме оригинальной статьи должно включать разделы: актуальность (необязательно) (Background), цель исследования (Objective), материалы и методы (Design and methods), результаты (Results), выводы (Conclusion).

Список литературы составляется в соответствии с ГОСТ РФ 7.0.5–2008 «Библиографическая ссылка» в порядке цитирования, на отдельной странице. Фамилии иностранных авторов в тексте даются в оригинальной транскрипции (в случае, когда число авторов превышает 3, используются формулировки «et al.» и «и соавт.»). Ссылки на литературу, цитируемую в тексте статьи, даются нумерацией арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [1]).

Таблицы. Каждая таблица должна быть напечатана на отдельной странице, иметь номер (арабскими цифрами) и название (без сокращений). Таблицы должны располагаться в порядке упоминания в статье (в тексте дается указание, например, табл. 1). Все графы в таблице должны иметь заголовок; все сокращения — расшифрованы в конце таблицы.

Рисунки должны быть в электронном виде в форматах *.tif, *.png, *.jpg (Excel, PowerPoint, Word для графиков и диаграмм). Размер фотографий 9 × 12 см. На рисунке должно быть минимальное количество обозначений, все пояснения выносятся в подпись под рисунком. Для всех иллюстративных материалов в тексте указывается место (в тексте дается указание, например, рис. 1).

Для оригинальной статьи суммарный объем (все разделы) не должен превышать 15 страниц (формат А4); для краткого сообщения — 4 страниц; число иллюстраций — не более 3, количество цитированных источников — не более 15. Объем и оформление других видов работ (обзор, лекция или иное) согласуется с редакцией заранее. В материалах, направленных в журнал, должна быть использована система СИ, за исключением размерности величин, традиционно измеряемых в других мерах.

Все аббревиатуры, используемые в статье, должны быть расшифрованы, кроме символов химических элементов и сокращенных названий общеизвестных метрических единиц.

Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять принятые работы.

Направление в редакцию работ, уже переданных в другие издания или напечатанных в них, не допускается. Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются. Рукописи, оформленные с нарушением правил, редакцией не рассматриваются.

Оформленные в соответствии с настоящими правилами рукописи следует направлять в электронном виде по адресу:

bulleten@almazovcentre.ru.

Тел./факс +7 (812) 702-37-16.

Текущую информацию по журналу

можно получить на сайте

ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова»:

www.almazovcentre.ru