

СОДЕРЖАНИЕ 4/2013

0530P	
Образцов И.В., Годков М.А.	Глав
Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика	IV
Макаров М.С.	акаде
Флюоресценция в исследовании клеток: пути и возможности	Редк
Коков Л.С., Шутихина И.В., Тимина И.Е. Использование ультразвуковых технологий в оценке атеросклеротических поражений сосудистой стенки	ответствен Н.Н. Белуц К.В. Анохи А.В. Васил
Чернов В.И., Зельчан Р.В., Тицкая А.А., Синилкин И.Г., Чижевская С.Ю., Чойнзонов Е.Л. Однофотонная эмиссионная компьютерная томография	А.И. Григор А.Д. Дурне
с ^{99М} Тс-МИБИ и ¹⁹⁹ ТІ-хлоридом в диагностике и оценке эффективности химиотерапии первичных и рецидивных опухолей гортани и гортаноглотки	И.М. Кветн В.И. Кисел Л.С. Коков
Туманова У.Н., Дубова Е.А., Кармазановский Г.Г., Щеголев А.И. Компьютерно-томографические и морфологические сопоставления степени васкуляризации очаговой узловой гиперплазии печени	Н.Е. Кушли Е.М. Пальц В.О. Попов
Андреев В.Н., Евсеев А.К., Гараева Г.Р., Гольдин М.М. Сопоставление редокс-потенциала и антиоксидантной активности сыворотки крови	Е.С. Север С.Е. Север Д.А. Сыче
Боровкова Н.В., Александрова И.В., Валетова В.В., Кобзева Е.Н.	Реда
Апоптоз лимфоцитов крови в норме и при патологии	А.И. Арчак В.А. Быков А.Н. Конов
Оценка эффективности тромболитической терапии по данным перфузионной сцинтиграфии легких	В.П. Скула В.Н. Смирн
Килина О.Ю., Завадовская В.Д., Зоркальцев М.А., Удодов В.Д., Замышевская М.А. Исследование факторов, влияющих на эффективность	В.А. Ткачу
мечения лейкоцитов радиоколлоидным комплексом « ^{99m} Tc-ТЕХНЕФИТ»	А.А. Тотоля Р.М. Хаито
Молекулярная эпидемиология внутрибольничных золотистых стафилококков в стационарах различных регионов России	Н.А. Яицки

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

Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций Свидетельство о регистрации ПИ №ФС77-50064 от 04.06.12 Редакция не имеет возможности возвращать рукописи За содержание рекламных материалов редакция ответственности не несет. Журнал выходит 6 раз в год

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

Редактор Г.А. Суворова Корректор М.Е. Щербакова Верстка Р.Р. Саргсян Компьютерный набор Е.А. Козловская

> Выход в свет 05.08.13 Формат 60×90/8. Заказ 46 Цена свободная

Отпечатано в 000 «Офсет Принт», 127550, Москва, Дмитровское ш., д. 39, корп. 1.

Главный редактор

М.А. Пальцев кадемик РАН и РАМН

Редколлегия журнала

нный секретарь икина д.б.н., профессор чл.-корр. РАН и РАМН ьев д.б.н., профессор рьев академик РАН и РАМН B чл.-корр. РАМН Ю д.м.н., профессор ев чл.-корр. РАМН чл.-корр. РАМН **НСКИЙ** чл.-корр. РАМН цева д.м.н. чл.-корр. РАН ИН чл.-корр. РАН ИН чл.-корр. РАМН д.м.н., профессор

Редакционный совет

ОВ академик РАМН академик РАМН алов академик РАН и РАМН чев академик РАН академик РАМН, 10B чл.-корр. РАН академик РАН и РАМН ЯН чл.-корр. РАМН)B академик РАН и РАМН академик РАМН

Адрес редакции и издателя: 119048, Москва, ул. Усачева, 11,

корп. 17 *(1-й этаж)*

 E-mail:
 belushkina@rambler.ru

 E-mail:
 verstka@rusvrach.ru

 Секретариат:
 8-499-246-81-90

 Отдел подписки:
 8-499-246-79-83

 Web-site:
 www.rusvrach.ru

Подписной индекс по каталогу Роспечать

82141

82142

для индивидуальных подписчиков

для организаций

Scientific iournal

REVIEWS

CONTENT 4/2013

Obraztsov I.V., Godkov M.A. Chemiluminescent analysis of the blood cells in medicine: history, theory, practice
Makarov M.S.
Fluorescence in cell research: approaches and possibilities
Kokov L.S., Shutikhina I.V., Timina I.E.
The use of ultrasound technologies in the assessment
of atherosclerotic lesions of the vessel wall
ORIGINAL INVESTIGATIONS
Chernov V.I., Zelchan R.V., Titskaya A.A., Sinilkin I.G., Chizhevskaya S.Yu., Choynzonov E.L.
Single photon emission computed tomography with 99mTC-MIBI
and ¹⁹⁹ TL-chloride in the diagnosis and evaluation of the effectiveness
of chemotherapy of primary and recurrent tumors of the larynx and hypopharynx
Tumanova U.N., Dubova E.A., Karmazanovsky G.G., Shchegolev A.I.
Computed tomography and morphological comparisons
the degree of vascularization of focal nodular hyperplasia of the liver
Andreev V.N., Evseev A.K., Garaeva G.R., Goldin M.M.
Blood serum redox potential and antioxidant activity comparison
Borovkova N.V., Aleksandrova I.V., Valetova V.V., Kobzeva E.N.
Blood lymphocyte apoptosis in norm and pathology
Migunova E.V., Kudryashova N.E., Nikitina O.V., Beresneva E.A., Gol'dina I.M.,
Zabavskaya O.A., Sinyakova O.G., Mikhaylov I.P., Kosolapov D.A., Kungurtsev E.V.
Assessment of the effectiveness of thrombolytic therapy
of pulmonary tromboembolism by lung perfusion scanning
Kilina O.Yu. , Zavadovskaya V.D., Zorkal'tsev M.A., Udodov V.D., Zamyshevskaya M.A.
The study of factors affecting the efficiency
of labeling leukocytes with radiocolloid complex «99mTs-tekhnefit»
Romanov A.V., Chernov E.A., Edelstein M.V.
Molecular epidemiology of nosocomial Staphylococcus aureus
in hospitals in different regions of Russia

Editor-in-chief

M.A. Paltsev acad. of RAS, RAMS

Editorial board

Executive secretary

N.N. Belushkina professor

K.V. Anokhin corr. memb.

of RAS, RAMS

A.V. Vasilev professor

A.I. Grigorev acad. of RAS, RAMS
A.D. Durnev corr. memb. of RAMS

I.M. Kvetnoy professor
V.I. Kiselev corr. memb. of RAMS

V.I. Kiselev corr. memb. of RAMS
L.S. Kokov corr. memb. of RAMS

N.E. Kushlinsky corr. memb. of RAMS E.M. Paltseva d. med. s.

V.O. Popov corr. memb. of RAS
E.S. Severin corr. memb. of RAS

S.E. Severin corr. memb. of RAMS

professor

D.A. Sychev

Editorial committee

A.I. Archakov
V.A. Bykov
A.N. Konovalov
V.P. Skulachev
V.N. Smirnov
acad. of RAS, RAMS
acad. of RAS, RAMS
acad. of RAS, RAMS
acad. of RAS, RAMS
corr. memb. of RAS
V.A. Tkachuk
acad. of RAS, RAMS

V.A. Tkachuk acad. of RAS, RAMS
A.A. Totolyan corr. memb. of RAMS
R.M. Khaitov acad. of RAS, RAMS

acad. of RAS, RAMS

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

The journal was registered by the Press Committee of the Russian Federation under №ФC77-50064 on June 04, 2012 Reproduction of materials elsewhere or duplication of the materials published in the journal, in whole or in part, is not permitted without the written consent of the Russkiy Vrach (Russian Physician) Publishing House. The editors have no opportunity of returning manuscripts. The editors provide no warranty as to the contents of advertisements. Published 6 times a year

Publishing House «Russkiy Vrach» General Director G.S. Zolnikova Editor G.A. Suvorova Proof-reader M.Ye. Scherbakova Maker-up R.R. Sargsyan Computerized compositor Ye.A. Kozlovskaya

> Signed for publication 05.08.13 Format 60x90/8. Order 46

Printed at the «Ofset Print» printing-house: 39, Dmitrovskoe chausse, Moscow, 127550

Address of the editorial office and publisher

Address: 119048, Moscow, 11, Usacheva St., corp. 17 (1st floor)

E-mail: belushkina@rambler.ru
E-mail: verstka@rusvrach.ru
Secretariat: 8-499-246-81-90

Subscription

N.A. Yaitsky

department: 8-499-246-79-83
Web-site: www.rusvrach.ru

Rospechat catalogue subscription index

for individual subscribers 82141 for organisations 82142

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК КРОВИ В МЕДИЦИНЕ: ИСТОРИЯ, ТЕОРИЯ, ПРАКТИКА

И.В. Образцов¹, М.А. Годков², доктор медицинских наук

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ, Москва, ²НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

E-mail: mgodkov@yandex.ru

Хемилюминесцентный анализ используется для оценки окислительного метаболизма клеток крови уже в течение полувека. Разработаны многочисленные методики для исследования функциональной активности моноцитов и нейтрофилов. В последние десятилетия применение хемилюминесцентного анализа в клинических и экспериментальных исследованиях позволило расширить возможности лабораторной диагностики различных патологических процессов. В настоящем обзоре систематизированы описанные в литературе подходы к хемилюминесцентному анализу клеток крови, перспективные для использования в клинической практике.

Ключевые слова: хемилюминесцентный анализ, нейтрофилы, моноциты, функциональная активность фагоцитов

CHEMILUMINESCENT ANALYSIS OF THE BLOOD CELLS IN MEDICINE: HISTORY, THEORY, PRACTICE I.V. Obraztsov¹, M.A. Godkov²

¹Federal Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, ²Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow

Chemiluminescence is used to investigate the oxidative metabolism of blood cells for half a century. Numerous techniques for evaluation monocyte and neutrophil function have been developed. Applying of chemiluminescent analysis in clinical and experimental research has strengthened the ability of laboratory diagnosis of various pathological processes since last decades. In this review, we have described and classified methods of chemiluminescent analysis of blood cells that are promising for use in clinical practice.

Key words: chemiluminescent assay, neutrophils, monocytes, phagocytic function, oxidative metabolism

ВВЕЛЕНИЕ

Постоянной задачей врачей клинической лабораторной диагностики является совершенствование методов неинвазивной (малоинвазивной) диагностики патологических состояний. Современные метолы тестирования биологических тканей и клеточных популяций должны характеризоваться как высокой избирательностью исследуемого объекта (возможностью тестирования тонких механизмов развития конкретной патологии), так и способностью проводить интегральную оценку сложных патологических процессов. Группа биофизических методов тестирования функционального состояния клеточных популяций и биологических жидкостей, основанная на регистрации эмиссии квантов света и объединенная названием хемилюминесцентный анализ (ХЛА), полностью отвечает перечисленным требованиям.

Так, ХЛА полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) или моноцитов/макрофагов (в цельной крови или выделенных с помощью различных лабораторных технологий) позволяет с достаточной опреде-

ленностью судить о функциональном соответствии конкретных популяций фагоцитарного звена иммунной системы, состоянии их рецепторного аппарата, способности к эффективному фагоцитозу и киллингу микроорганизмов. Вместе с тем оценка состояния иммунитета пациентов с использованием ХЛА клеток крови характеризуется малой инвазивностью, возможностью регистрации клеточной активации в процессе ее развития, высокой чувствительностью, исключением субъективного фактора работы оператора.

Биофизические и физиологические принципы XЛ клеток крови

Хемилюминесценцией (ХЛ) называют эмиссию электромагнитного излучения в диапазоне видимого света, сопровождающую химические реакции. ХЛ часто сопровождает процессы, протекающие в биологических системах, в частности, в клетках человека и животных. ХЛ живых систем принято классифицировать следующим образом [4]:

- 1. Биолюминесценция свечение некоторых организмов, связанное со специфическими ферментативными реакциями: свечение весьма интенсивное и может быть зафиксировано невооруженным глазом, однако оно не характерно для клеток человеческого организма.
- 2. Сверхслабое свечение собственная XЛ клеток и тканей человека и животных, обусловлена метаболизмом активных форм кислорода, азота и липидов. Интенсивность настолько мала, что этот тип свечения может быть зарегистрирован только с помощью высокочувствительных приборов (фотоэлектронный умножитель, газоразрядные счетчики).
- 3. Усиленная XЛ свечение, усиленное за счет введения в систему специальных веществ (ХЛ-зондов), которые увеличивают ХЛ-сигнал в результате взаимодействия с конкретными формами свободных радикалов-субстратов, ответственных за формирование ХЛ. Наиболее распространенные ХЛ-зонды люминол и люцигенин.
- 4. Индуцированная XЛ свечение клеток, вызванное воздействием индукторов, запускающих специфические метаболические каскады, приводящие к синтезу активных форм кислорода (АФК) или органических свободных радикалов, являющихся субстратом ХЛ. В качестве индуктора применяются: физические факторы (облучение лазером, электрический ток, тепловое или механическое воздействие), химические стимулы (12-0-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат ТФА, 4β-форбол-12-миристат-13-ацетат ФМА, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин ФМЛФ, липополисахарид ЛПС), агенты, ини-

Ο, ФМА Корпускулярный O_{2}^{-} стимул (действие ФМЛФ ŏ0 через фагоцитоз) Cyt b 0000 Мембрана p67 (p47)-P Рецепторы Racl) GTP ΦΜΠΦ ↑↑Ca+ Транс-(Racl) GTP (Racl)GDP Аденилатлокация (RhoGDI) PKCα циклаза (p67 (p47)- p (Racl) GDP ▲ cPLA, ΡΚСδ 🗻 цАМФ Фосфорилирование Цитозоль p67 (p47) AA

Рис. 1. Действие различных индукторов клеточной XЛ и механизм сборки $HAД\Phi \cdot H$ -оксидазы фагоцитов: $\mu AM\Phi - \mu \mu \kappa$ лический аденозинмонофосфат; PKC - nротеинкиназа C; $PLA2 - \phi$ осфолипаза A2; AA - aрахидоновая кислота. Овалы обозначают субъединицы комплекса $HAД\Phi \cdot H$ -оксидазы. По [24] с изменениями и дополнениями

циирующие процесс фагоцитоза (частицы латекса, суспензии микроорганизмов).

Первооткрывателем собственной клеточной XЛ является российский ученый А. Гурвич, показавший в 1934 г. существование чрезвычайно слабого свечения клеток в ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, названного им митогенетическими лучами [3]. Первым способность клеток человеческой крови испускать сверхслабое свечение продемонстрировал Р. Аллен, который в 1973 г. открыл собственную ХЛ лейкоцитов крови человека [12], а также предложил использовать люминол в качестве активатора ХЛ макрофагов. В этих работах показано, что субстратом ХЛ клеток крови являются ПЯЛ и моноциты, обладающие специфическим ферментативным аппаратом для реализации кислородзависимой микробицидности.

Кислородзависимая микробицидность фагоцитов осуществляется за счет синтеза АФК. Под действием индуктора фагоцит активируется, что сопровождается респираторным взрывом — процессом активной краткосрочной выработки АФК, направленной на окисление и разрушение молекулярных структур чужеродного агента. Респираторный взрыв наблюдается при образовании везикул в процессе фагоцитоза и при адгезии фагоцита на недоступные для фагоцитоза объекты [13]. АФК, выделяющиеся при активации фагоцита в первую очередь, относятся к первичным кислородным метаболитам; молекулы, образующиеся из них, называют вторичными кислородными метаболитами [25, 30].

Деструктивные эффекты кислородных метаболитов весьма многообразны. К прямым деструк-

тивным эффектам относятся перекисное окисление липидов и белков, инактивация ферментов и окисление ДНК, к опосредованным — повышение чувствительности к гидролазам, подавление ингибиторов нейтральных протеиназ, образование липидных хемоаттрактантов и вторичных биотоксинов, активация металлопротеиназ.

В начале в цепи превращений цитотоксичных метаболитов кислорода стоит супероксидный радикал [11] ООТ. Генерация его происходит за счет переноса 2 электронов на 2 молекулы кислорода при участии НАДФ • Н-оксидазного комплекса (НАДФ • Н-оксидазы) [3]. Значение этого превращения трудно переоценить, так как недостаточность синтеза супероксидрадикала, развивающаяся в

результате какой-либо дисфункции НАДФ • Ноксидазы, приводит к серьезным нарушениям иммунного ответа. НАДФ • Н-оксидаза представляет собой многокомпонентный ферментативный комплекс, направленный на перенос электрона на молекулу кислорода. Этот комплекс встроен в липидный бислой мембраны и может находиться как на плазмалемме, так и на мембранах внутриклеточных вакуолей фагоцитов. Весь ферментативный комплекс состоит из нескольких субъединиц. В покоящейся клетке эти субъединицы разобщены и распределены между плазматической мембраной и цитозолем [39]. Во время активации клетки каким-либо индуктором запускается каскад внутриклеточных посредников, который приводит к сборке мембранного комплекса НАДФ • Н-оксидазы и активации синтеза супероксидного радикала [24]. На рис. 1 представлено действие растворимых (ФМА и ФМЛФ) и корпускулярных индукторов и механизм сборки НАДФ • Ноксидазы.

Сборка НАДФ • Н-оксидазного комплекса происходит не только на клеточной мембране, но и на мембранах фагоцитируемых везикул. Работа фермента в мембране фагосомы направлена на окисление структур поглощенных микроорганизмов под действием АФК; НАДФ • Н-оксидаза, встроенная в плазмалемму, необходима для выработки супероксида, направленного на объекты, недоступные для фагоцитоза. Выделяющийся супероксид взаимодействует с другими ферментами (супероксиддисмутазой — СОД, миелопероксидазой — МПО) и превращается во вторичные цитотоксические продукты [4, 25].

Методология проведения ХЛА фагоцитов

Объектами исследования ХЛ клеток крови являются: 1) разведенная цельная кровь; 2) выделенные фракции ПЯЛ; 3) выделенные фракции мононуклеаров. Авторы, исследующие ХЛ цельной крови, рекомендуют использование различных степеней разведения крови для анализа: 1/9 [15]; 1/21 [6]; 1/40 [10]; 1/100 [16]; 1/200 [8]; в отечественных методических рекомендациях [7] предложено разведение крови в 22 раза. При этом рост интенсивности ХЛ-ответа при увеличении степени разведения с 2- до 22-кратного обусловлен снижением оптической плотности раствора; дальнейшее увеличение степени разведения приводит к падению интенсивности ХЛответа за счет снижения количества фагоцитов в пробе.

Однако, несмотря на значительное упрощение процедуры анализа, работа с разведенной цельной кровью имеет существенный недостаток: невозможно избавиться от антиоксидантной активности плазмы, способной значительно исказить результаты ХЛА клеток крови. В связи с этим большинство исследователей работают с изолированной фракцией клеток: ПЯЛ [17] или мононуклеаров [19, 43, 47]. Выделение необходимой фракции клеток выполняют на градиенте Ficoll-верографин с плотностью 1,077 — для получения фракции ПЯЛ или 1,119 — для мононуклеаров.

Как уже указывалось, наиболее простым способом оценки синтеза $A\Phi K$ клетками крови является регистрация собственной $X\Pi$ клеток без использования какого-либо усилителя свечения [5]. Субстратом $X\Pi$ является синглетный кислород [27]. Существенный недостаток тестирования собственной $X\Pi$ — крайне низкая интенсивность свечения, вследствие чего приходится использовать большие количества клеток в пробе.

Благодаря работам Р. Аллена и соавт. [12], в начале 1970-х годов широкое распространение получило использование люминола в качестве химического усилителя ХЛ (за счет окисления люминола, АФК и взаимодействия его окисленных форм с супероксидным радикалом или пероксидом водорода). Этот сложный процесс протекает в 8 стадий, в итоге приводящих к испусканию кванта света (рис. 2) [23].

Среди исследователей весьма популярно применение люминола и его изомеров в качестве ХЛ-зондов. Молекула люминола свободно проникает в клетку, в отличие от своего изомера изолюминола,

Рис. 2. Выделение кванта света при взаимодействии люминола с АФК (схема реакции, по [4])

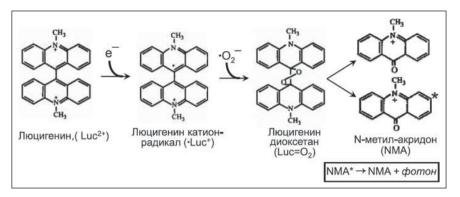


Рис. 3. Выделение кванта света при взаимодействии люцигенина с АФК (схема реакции, no [4])

в котором аминогруппа находится не в 5-м, а в 6-м положении [35]. Изолюминол, вступая во взаимодействие с АФК по тем же механизмам, что и люминол, позволяет оценить экскрецию кислородных метаболитов только во внеклеточную среду.

Помимо производных люминола, в качестве усилителя XЛ широкое распространение получил люцигенин [38] с принципиально иными структурой и механизмом действия. Этот XЛ-зонд также используется для обнаружения супероксидного радикала. Описан [17] механизм действия люцигенина (рис. 3).

Стоит отметить, что выше охарактеризованы только наиболее часто используемые ХЛ-зонды. Многообразие веществ, чувствительных к супероксиду и способных усиливать клеточную ХЛ, весьма велико. К ним относятся, к примеру, L012, целентеразин, аналог люциферина MCLA [17].

В современных исследованиях используется целый спектр индукторов, вызывающих сборку

ИНДУКТОРЫ КЛЕТОЧНОЙ ХЛ

Индукторы			Источник
	Облучен	ие светом	[46]
Физические	Лазерное	[36], [28]	
	Электро	опорация	[37]
		ФМЛФ	[38], [2]
	Агонисты рецепторов	анти-CD36	[11]
	рецепторов	Зимозан А	[9], [21]
Химические	Са ²⁺ ионофор	A23187	[40]
		Иономицин	[50]
	Активаторы	ФМА	[20], [2]
	ПКС	ТФА	[34]
	Частицы	ы латекса	[31]
Корпускулярные	Микро-	E. coli	[47]
	организмы	C. albicans	[48]

НАДФ • Н-оксидазы и реализацию кислородного взрыва фагоцитов (см. таблицу).

Применение физических индукторов ХЛ, таких, как низкоинтенсивное лазерное излучение или световое излучение диодов, широко представлено в работах отечественных исследователей [3, 19]; другие физические индукторы в настоящее время используют значительно реже. Химические индукторы — такие, как агенты, способные избирательно влиять на то или иное звено каскада вторичных посредников, приводя-

щего к активации клетки, получили широкое признание и у отечественных [4, 6] и у зарубежных [12, 42] ученых. Отработана технология применения при ХЛА ряда веществ, способных стремительно активировать клетку благодаря лигандрецепторному взаимодействию (ФМЛФ для рецептора ФМЛФ, зимозан для β-гликанового рецептора, моноклональные антитела и др.). Липофильные молекулы специфических активаторов протеинкиназы С (ПКС) проникают в клетку за счет пассивной диффузии, этот процесс более медленный. В результате действия обоих семейств химических индукторов происходят открытие кальциевых каналов, вход ионов Са²⁺ в клетку и ее активация. Такое же действие оказывают молекулы иономицина, А23187 (Са²⁺-ионофоры) и эффект электропорации. Корпускулярные индукторы являются макрочастицами, способными активировать процесс фагоцитоза с последующей наработкой АФК в пространство сформированной фаголизосомы. Их использование позволяет оценить эффективность внутриклеточного бактериального киллинга (см. рис. 1).

Исследователями [2, 41] оценен эффект последовательного воздействия растворимых и корпускулярных индукторов на фагоциты цельной крови человека. Показано значительное усиление интенсивности ХЛ-ответа на внесение ФМЛФ или латекса в суспензию клеток, предварительно стимулированных ФМА, по сравнению с контрольным опытом (предстимуляция физиологическим раствором) (рис. 4).

Яркая вспышка ХЛ после внесения ФМЛФ в систему, предстимулированную ФМА, подтверждает данные об эффекте потенцирования рецепторов ФМЛФ за счет действия ФМА [27]. Потенцирование ХЛ-ответа, индуцированного латексом, за счет предстимуляции ФМА связано с непосредственным действием последнего (активация ПКС). Активация ПКС способствует сборке НАДФ • Н-оксидазного комплекса на мембранах везикул с поглощенными частицами латекса.

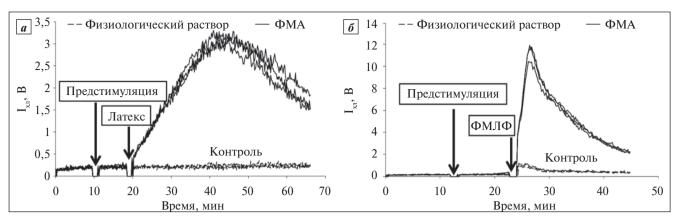


Рис. 4. Влияние предстимуляции Φ MA на XII, индуцированную латексом (a) или Φ MI Φ (6)

XЛ клеток крови у пациентов с различными видами патологии

Учитывая все многообразие подходов и методологий XЛА клеток крови, целесообразно охарактеризовать направления применения клеточной XЛ в клинической практике.

Развитие гнойно-септических осложнений и сепсиса является основной причиной гибели пациентов с тяжелыми травмами, массивной кровопотерей, обширными ожогами, отравлениями химическими веществами и рядом других патологических состояний. Выброс эндогенных продуктов распада приводит к развитию синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), сопровождающегося дискоординацией и супрессией различных звеньев иммунитета. Массивная микробная инвазия и(или) транслокация микроорганизмов из различных компартментов организма в кровяное русло и поврежденные ткани являются частью комплекса факторов, приводящих к септическим осложнениям. Нарушение функции фагоцитов при ССВО проявляется в нарушении бактериального киллинга, изменении уровня секреции интерлейкинов и цитокинов макрофагами, что приводит к активации и дегрануляции нейтрофилов с возникновением оксидативного стресса. Развивается системное повреждение тканей, приводящее к полиорганной недостаточности и гибели пациента. Поэтому определение функции фагоцитов у больных с развивающимся ССВО может оказаться ценным в прогнозе развития гнойно-септических осложнений.

Исследованию функции фагоцитов при сепсисе различной этиологии посвящено большое количество работ. В эксперименте на крысах показано [29] значимое снижение оксидативного метаболизма нейтрофилов периферической крови на начальных этапах острого панкреатита, ткани поджелудочной железы, напротив, характеризовались интенсивным оксидативным стрессом. Это согласуется с данными [32] о снижении окислительного метаболизма периферических нейтрофилов с инфильтрацией и избыточной оксидацией в очаге воспаления при индуцированном

перитоните у крыс. В работе [6] показано снижение ХЛ-ответа фагоцитов периферической крови, индуцированного зимозаном, у больных с сочетанной травмой, осложнившейся ССВО и сепсисом. Продемонстрированы подавление хемотаксиса и угнетение респираторного метаболизма лейкоцитов при ожоговом сепсисе [22]. Показано изменение кинетики ХЛ-ответа при двустадийной стимуляции фагоцитов цельной крови в виде появления медленной вспышки ХЛ у больных с тяжелой термической травмой [2] (рис. 5).

При высоком содержании нейтрофилов недостаточная интенсивность медленной кинетики позволяла прогнозировать тяжелое длительное течение заболевания с вероятностью развития гнойно-септических осложнений и летального исхода.

Отдельного упоминания заслуживают работы, посвященные определению уровня эндотоксина, основанные на регистрации ХЛ нейтрофилов. Этот подход основан на использовании эффекта прайминга нейтрофилов опсонизированными комплементом иммунными комплексами [44]. Существуют официнальные тест-системы [49] для определения уровня эндотоксина методом ХЛ фагоцитов, однако пока опубликованы преимущественно работы, выполненные на животных.

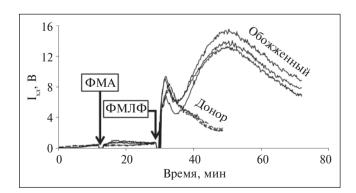


Рис. 5. Типичные хемилюминограммы донора (пунктирная кривая) и пациента с ожогами (сплошная линия)

Исследование ХЛ клеток крови нашло применение в изучении и диагностике иммунодефицитов. ХЛА нейтрофилов стал методом первой линии при диагностике хронической гранулематозной болезни (ХГБ) — наследственного первичного иммунодефицита, характеризующегося рекуррентными инфекциями и обусловленного дефектом структуры НАДФ • Н-оксидазы [14]. ХЛ фагоцитов при других первичных иммунодефицитных состояниях изучена мало, однако существуют данные об отсутствии нарушения оксидативного метаболизма моноцитов и ПЯЛ при ХЛА с использованием дрожжей и ФМЛФ в качестве индуктора у пациентки с общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН) [26].

При аллергической реакции активация ПЯЛ происходит в результате влияния всего многообразного комплекса медиаторов и биологически активных веществ, высвобождающихся из клеток-мишеней в ответ на действие специфического аллергена. Использование аллергенов в качестве клеточных индукторов позволило создать протоколы для выявления сенсибилизации тестируемыми аллергенами [1]. Показано усиление ХЛ-ответа на внесение аллергенов Aspergillus fumigatus, Alternaria alternata, Cladosporium herbarum, Candida albicans у детей с аллергическими заболеваниями легких [9].

Изменение функции фагоцитов периферической крови показано при онкологических заболеваниях. Так, в исследовании [45] на основе данных ХЛА нейтрофилов выявлено усиление базальной продукции АФК вместе с более быстрым ответом на внесение зимозана у больных раком почки по сравнению с контролем (здоровые).

Активированная XЛ применяется для определения влияния различных лекарственных веществ на

кислородный метаболизм моноцитов и нейтрофилов. В работе [42] подробно изучен эффект возрастания дозы и времени инкубации с антибиотиками группы пенициллинов, цефалоспоринов и аминогликозидов на моноциты и ПЯЛ периферической крови. А. Köhnke и соавт. [33] показали угнетение синтеза АФК макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови человека, при воздействии морфина и его производных в дозе выше 10-7 М. Налоксон потенцировал эффект морфина при больших концентрациях и являлся антагонистом при малых. Показано также отсутствие эффекта пропранолола и бупивакаина на ХЛ-ответ макрофагов. В исследовании A. Basile и соавт. [16] на основе результатов ХЛА цельной крови, изолированных ПЯЛ и моноцитов продемонстрировано антиоксидантное действие кумаринов растения Ferulago campestris.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ХЛА клеток крови является высокочувствительным прямым методом анализа, характеризующимся безопасностью, высокой скоростью и простотой выполнения. Использование различных ХЛ-зондов позволяет оценить и общую интенсивность окислительного метаболизма, и синтез конкретных форм АФК. Имеющийся арсенал клеточных индукторов дает возможность исследователям создавать протоколы ХЛА как для оценки функциональной активности ПЯЛ или моноцитов в целом, так и различных ее аспектов. Анализ литературных данных показал многогранность предлагаемых подходов к ХЛА клеток крови, которая открывает широкие перспективы для внедрения метода в различные области клинической лабораторной диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Агафонов В.Е., Митреева Д.Е. Модификация метода хемилюминесцентного анализа для оценки активности фагоцитов цельной крови сенсибилизированных животных // Клиническая лабораторная диагностика. 2004; 3: 47–50.
- 2. Владимиров Ю.А., Годков М.А., Образцов И.В., Проскурнина Е.В. Опыт исследования функциональной активности нейтрофилов у пациентов с тяжелой термической травмой // Материалы XVII Всероссийской научнопрактической конференции «Интеграция в лабораторной медицине». М., 2012.
- 3. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Лекции по медицинской биофизике. – М.: Изд-во МГУ, 2007. – 432 с.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. Т. 49. – 2009. – С. 341–88.
- Вадимиров Ю.А., Литвин Ф.Ф.
 Исследование сверхслабых свечений в биологических системах // Биофизика.

 –1959: 4 (5): 601–5.
- 6. Годков М.А. Хемилюминесцентный

- анализ нейтрофилов неразделенной крови в клинической практике. Дис. канд. мед. наук. М. 1998.
- Земсков В.М. и др. Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток) // Метод. рекомендации. – М... 1988.
- Невмятуллин А.Л. Реактивная хемилюминесценция нейтрофилов человека в системах со стафилококками. – Дис. канд. мед. наук. – Горький. – 1987.
- 9. Семенов А.В., Миненкова Т.А. Мизерницкий Ю.Л. Хемилюминесцентное определение активности нейтрофилов периферической крови при аллергических болезнях легких у детей с грибковой сенсибилизацией // Клин. лаб. диагностика. 2012; 10: 47–50.
- Фролов В.М., Пересадин Н.А., Ларионов Г.М. Применение хемилюминесценции для прогнозирования гнойновоспалительных осложнений при роже и ангине // Клин. лаб. диагностика. – 1993; 3: 29–31.
- 11. Albrecht D., Jungi T. Luminol-enhanced

- chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. // J. of Leukocyte Biology. – 1993; 54: 300–6.
- 12. Allen R., Stemholm R., Steele R. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participatton m bacterial activity // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1972; 47: 679–84.
- Babior B. Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. Blood. – 1984; 64: 959–66.
- Barbouche M., Sghiri R. et al. Chronic septic granulomatous disease. 14 cases // Presse Med. – 1999; Nov 27; 28 (37): 2034–6.
- 15. Bartelt S. et al. The effect of dietary fish oilsupplementation to healthy young men on oxidative burst measured by whole blood chemiluminescence // British J. of Nutrition. – 2008; 99: 1230–8.
- 16. Basile A., Sorbo S. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of Ferulago campestris (Apiaceae) // Molecules. – 2009; Feb 27:14 (3): 939–52.
- **17.** Beloborodova N. et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of

- reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils // J. Biomed. Sci. 2012; Oct 12:19:89.
- 18. Benbarek H. et al. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugson the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils // Vet Res Commun. – 2012; 36: 29–33.
- 19. Bilenko M. et al. Production of Reactive Oxygen Species by Monocyte-Derived Macrophages from Blood of Healthy Donors and Patients with Ischemic Heart Disease. ISSN 1990-7508, Biochemistry (Moscow) Supplement Series B. Biomedical Chemistry. – 2009; 3 (1): 64-70.
- Bjørnsdotfir H., Granfeldt D. et al. Inhibition of phospholipase A(2) abrogates intracellular processing of NADPH-oxidase derived reactive oxygen species in human neutrophils // Exp Cell Res. 2013; Mar 10; 319 (5): 761–74.
- 21. Bukhari S., Jantan I. et al. Synthesis and Effects of Pyrazolines and Isoxazoles on the Phagocytic Chemotaxis and Release of Reactive Oxygen Species by Zymosan Stimulated Human Neutrophils // Med Chem. 2012; Oct 23.
- 22. Calum H., C. Moser et al. «Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection» // Clin. Exp. Immunol. 2009; 156 (1): 102–10.
- Campbell A. Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine // Ellis Horwood series in biomedicine.

 New York. 1988.
- 24. Cathcart M. Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes / Macrophages: Contributions to Atherosclerosis. Arterioscler // Thromb. Vasc. Biol. – 2004; 24: 23–8.
- 25. Dahlgren C., Karlsson A., Bylund J. Measurement of Respiratory Burst Products Generated by Professional Phagocytes // Methods in Molecular Biology, Vol. 412 Neutrophil Methods and Protocols. Humana Press Inc, Totowa, NJ. – 2007.
- 26. Di Renzo M., Pasqui A. et al. Evaluation of some immune functions in a patient affected by common variable immunodeficiency using luminescent techniques // J. Biolumin. Chemilumin. 1997; Jul-Aug; 12 (4): 193–7
- 27. Edwards S. Biochemistry and physiology of

- the neutrophil. Cambridge University Press, U.K. 1994.
- 28. Fujimaki Y., Shimoyama T. et al. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils // J. Clin. Laser Med Surg. – 2003; Jun; 21 (3): 165–70.
- Haé S., Dobosz M., Kaczor J. et al. Neutrophil engagement and septic challenge in acute experimental pancreatitis in rats // World J. Gastroenterol. 2005; Nov 7; 11 (41): 6459–65.
- Halliwell B., Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. Claredon Press, Oxford. – 1985.
- Kapiszewska M., Cierniak A. et al. Lifespan of etoposide-treated human neutrophils is affected by antioxidant ability of quercetin // Toxicol In Vitro. – 2007; Sep; 21 (6): 1020–30
- 32. Khan H. Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence response of circulating and extravasated leukocytes in experimental sepsis // Mediators Inflamm. 2004; Apr; 13 (2): 123–5.
- 33. Köhnke A., Maier C. et al. In vitro investigations of the effect of morphine and its metabolites on the phagocytosis of peripheral mononuclear cells // Schmerz. 1999; Apr 14: 13 (2): 121–6.
- 34. Kuribayashi F., Tsuruta S. et al. Cell adhesion markedly increases lucigenin-enhanced chemiluminescence of the phagocyte NADPH oxidase // Genes Cells. – 2008; Dec; 13 (12): 1249–56.
- 35. Lundqvist H., Kricka L. et al. Influence of different luminols on the characteristics of the chemiluminescence reaction in human neutrophils // J. Biolumzn. – 1995; 10: 353–359.
- 36. Machneva T., Buravlev E. et al. Role of endogenous porphyrins in the effects of low-intensity laser radiation of the red region on free radical processes in the blood of rats under experimental endotoxic shock // Biofizika. 2011; Jul–Aug; 56 (4): 705–13.
- Malinin V., Kazarinov K., Putvinskiĭ A. Mechanism of human blood neutrophil activation by electric field pulses // Biofizika. – 1996; Jul–Aug; 41 (4): 876–86.
- 38. Mokgobu M., Anderson R. et al. Manganese promotes increased formation of hydrogen peroxide by activated human macrophages and neutrophils in vitro //

- Inhal Toxicol. 2012; Aug; 24 (10): 634-44.
- 39. Morel F., Doussiere J., Vignais P. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. Eur. J. Biochem. – 1991; 201: 523–46.
- 40. Nosáí R., Perečko T., Jančinová V. et al. Naturally appearing N-feruloylserotonin isomers suppress oxidative burst of human neutrophils at the protein kinase C level // Pharmacol Rep. – 2011; 63 (3): 790–8.
- 41. Obraztsov I. An Evaluation of Neutrophil Function: a New Approach to the Chemiluminescent Analysis // Immunology. Vol. 137, Issue Supplement s1, 2012. – P. 199.
- Pierce L., Tarnow-Mordi W., Cree I. Antibiotic effects on phagocyte chemiluminescence in vitro // Int J. Clin. Lab. Res. 1995; 25 (2): 93–8
- 43. Rodríguez-Orozco A. et al. Recent Applications of Chemiluminescence Assays in Clinical Immunology // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2010; 10: 1393–400.
- 44. Romaschin A., Walker P. Endotoxin activity in whole blood by neutrophils chemiluminescence – a novel analytical paradigm // Clin. Chem. – 2000; 46: 1504–6.
- 45. Shkapova E., Kurtasova L., Savchenko A. Lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils in patients with renal cancer // Bull Exp Biol Med. – 2010; Aug; 149 (2): 239–41.
- **46.** Sinyakov M., Zhevelev H., Avtalion R. Determinants of pathology in light-irradiated cells // Photochem Photobiol. 2010; Jan-Feb: 86 (1): 123–30.
- 47. Soeiro-Pereira P., Falcai A. et al. BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase agonist, activates human mononuclear phagocytes // Br. J. Pharmacol. – 2012; Jul; 166 (5): 1617–30.
- 48. De Souza Ferreira C., Araújo T.H. et al. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. // Cell. Biochem. Funct. – 2012; Oct; 30 (7): 604–10.
- 49. Spectral Diagnostics Incorporated Endotoxin Activity Assay (EAA[™]) For In Vitro Diagnostic Use Only.
- 50. Vargas F., Rivas C., Perdomo H. et al. Clozapine prevents apoptosis and enhances receptor-dependent respiratory burst in human neutrophils // Pharmazie. – 2005; May; 60 (5): 364–8.

ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ КЛЕТОК: ПУТИ И ВОЗМОЖНОСТИ

М.С. Макаров

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

E-mail: mcsimmc@yandex.ru

В статье анализируются основные подходы к исследованию клеток с помощью флюоресценции, используемые в различных областях биологии и медицины, в том числе в молекулярной медицине; проблемы анализа витально окрашенных клеток, а также пути их решения; дается краткий анализ перспектив применения флюоресцентной микроскопии.

Ключевые слова: флюоресценция, витальное окрашивание, митотрекеры, морфофункциональный анализ

FLUORESCENCE IN CELL RESEARCH: APPROACHES AND POSSIBILITIES M.S. Makarov

Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine, Moscow

A recent literature review presents main approaches of cell fluorescence study in various fields of biology and medicine, including molecular medicine, problems of vital stained cell analysis and the prospect of fluorescent microscopy application.

Key words: fluorescence, vital staining, mitotrackers, morphofunctional analysis

ВВЕДЕНИЕ

В биологии и медицине многие исследования базируются на использовании физических подходов к изучению живых систем — биофизике. Биофизическое направление позволяет изучать морфологию и функции биологических объектов на всех уровнях организации — от субмолекулярных структур до целостного организма [1]. Удобным объектом для биофизического исследования являются клетки животных и микроорганизмов, так как они обладают способностью к постоянному самовоспроизводству, не требуют повышенных материальных затрат и не вызывают этических затруднений. Клетки используют как для фундаментальных исследований, так и в качестве модельных систем для практических разработок [1, 3].

Биофизические подходы в исследовании клеток включают электрохимические (потенциометрия, «patch-clamp», электрофорез), электромагнитные (пульсация клеток, ядерно-магнитный резонанс), радиобиологические и оптические методы [3, 4, 10, 25, 27, 31, 43, 49]. При применении оптических методов изображения клеток и их структур могут быть получены 2 путями:

- с помощью регистрации проходящего или отраженного света денситометрия, деполяризация, проточная цитометрия, фазовоконтрастная и интерференционная морфометрия [2, 4, 5, 9, 11];
- с помощью регистрации индуцированного флюоресцентного света [22, 29, 30].

Флюоресценция клеток достигается за счет применения соответствующих красителей, которые связываются с определенной структурой клетки, сохраняя при этом способность флюоресцировать [19, 29]. Для окрашивания клеток используют как чистые флюорохромы (акридиновый оранжевый, DAPI и т.д.), так и флюорохромы, ассоцированные с определенными веществами (антитела в иммуноцитохимии, одноцепочечные комплементарные ДНК и ДНК-предшественники в цитогенетике). В результате под действием возбуждающего света определенной длины волны можно регистрировать флюоресценцию тех или иных участков исследуемой клетки.

Одно из главных преимуществ флюоресцентных методов исследования — возможность анализа биологической полноценности клеток при непосредственном наблюдении самих клеток и их структур. Флюоресцентная микроскопия позволяет исследовать прикрепленные клетки независимо от оптической плотности субстрата. Другим важным преимуществом является возможность комбинации нескольких флюоресцентных красителей с разной длиной возбуждения флюорохрома, что позволяет проводить параллельный анализ разных структур в одной и той же клетке. Наконец, ряд флюорохромов дает возможность прижизненно окрашивать клеточные компоненты и наблюдать динамические изменения клеток, такие, как внутриклеточный транспорт, секреция, процесс деления [39, 41, 44].

СПОСОБЫ АНАЛИЗА ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК

В клеточной биологии выделяют 2 основных направления использования флюоресцентных методов: 1-й — окрашивание ядерных компонентов (ДНК, РНК, белки хроматина и т.д.), 2-й — окрашивание компонентов цитоплазмы клеток.

Для окраски ядра эукариот часто применяют различные флюорохромы, характеризующиеся избирательным связыванием с нуклеиновыми кислотами (DAPI, Hoechst, бромистый этидий, акридиновые красители), которые позволяют визуализировать контуры интерфазных клеточных ядер, митотических и мейотических хромосом, микроядер [22, 29]. Преимуществами таких красителей являются простота их применения и сравнительная дешевизна. Во многих работах используется флюоресцентное окрашивание ядерной ДНК с помощью DAPI или Hoechst для оценки общей архитектуры исследуемых клеток, а также для подсчета их количества [17, 19, 21]. Однако связывание флюорохромных красителей с ядерной ДНК приводит к необратимым изменениям структуры хроматина клеток [21], что негативно сказывается на их жизнеспособности [21, 50]. Поэтому флюоресцентное окрашивание нуклеиновых кислот применяют в основном для анализа химически фиксированных клеток или их выделенных хромосом (анализ топологии интерфазного хроматина, кариотипирование, трехмерная реконструкция тканей и биотрансплантатов).

В биологической и медицинской цитогенетике активно используют метод FISH (fluorescence in situ hybridization) для флюоресцентного выявления ДНК отдельных хромосом и их фрагментов in situ, т.е. без разрушения клеток [29]. С этой целью применяют меченные флюорохромами одноцепочечные ДНКфрагменты, комплементарные определенным генетическим структурам исследуемых клеток. Такой подход позволяет проводить скрининг хромосомных анэуплоидий и аберраций у диплоидных клеток человека в гематологии, онкологии, трансплантологии; клеток эмбрионов в пренатальный и предымплантационный (в случае экстракорпорального оплодотворения) период; культивируемых клеток человека [38]. Отметим, что метод FISH осуществляют только на фиксированных клетках.

Для флюоресцентной окраски цитоплазмы, а также белковых компонентов ядер клеток широко используют методы иммуноцитохимии, в которых флюорохромный краситель, связанный с антителом или с другим высокоаффинным агентом, позволяет выявить внутриклеточную локализацию белковых молекул определенного типа. В результате представляется возможным оценить как внутреннюю топологию исследуемой клетки, так и ее химический состав [13, 23, 29]. Иммуноцитохимическое исследование позволяет оценить пролиферативную активность и

степень дифференцировки клеток. Это имеет большое значение в хирургии, трансплантологии, гематологии, онкологии, спортивной медицине. Однако для получения достоверных результатов с помощью иммуноцитохимии требуется предварительная химическая фиксация исследуемых клеток. Несмотря на несомненные достоинства, методы флюоресцентного анализа фиксированных клеток не позволяют оценить их биологическую полноценность в динамике.

Перспективным для морфофункционального анализа клеток представляется использование витальных (прижизненных) флюорохромных красителей. Витальные красители – «красители, обладающие минимальной токсичностью, которые используются для выявления различных органелл и анализа их изменений в процессе жизнедеятельности клетки, а также для изучения различных физиологических явлений, происходящих в клетке» [18]. Анализ окрашенных флюорохромами клеток может проводиться в ручном (микроскопия) и автоматическом (проточная флюориметрия) режимах. Автоматический метод позволяет оценить большую выборку клеток (до 500 тыс. за одно наблюдение) и удобен для количественного анализа структуры клеточной популяции, а также для выделения клеток определенного типа [35, 38]. Однако такой подход не является в полной мере морфофункциональным, так как не позволяет оценить функциональную активность наблюдаемых клеток. Поэтому главным способом морфофункционального анализа клеток, окрашенных витальными флюорохромными красителями, по-прежнему остается микроскопия.

Во флюоресцентной микроскопии для витальной окраски клеток чаще используют так называемые митотрекеры (MitoTrackers) — специфические зонды, связанные с флюорохромами. Благодаря своей структуре эти зонды могут взаимодействовать с внутренними компонентами клеточных органелл без нарушения их внутренней структуры, что позволяет наблюдать их в нефиксированных клетках в течение длительного времени [41].

Набор митотрекеров весьма велик – есть специфические красители для выявления цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума (ЭПР), аппарата Гольджи, лизосом, митохондрий и т.д. [26, 36, 41, 44]. В зависимости от целостности органеллы свечение митотрекера будет более или менее интенсивным. Например, прижизненный маркер митохондрий родамин-123 окрашивает только митохондрии с высоким трансмембранным потенциалом (функционально активные митохондрии); при нарушении структуры митохондрий или снижении их функциональной активности свечение родамина-123 исчезает [23, 26]. Существующие методы видеомикросъемки позволяют автоматически оценить миграцию флюоресцентной метки in vivo внутри клеток [30, 37]. Такой подход позволяет оценить динамическую изменчивость клеточных мембран, интенсивность работы вакуолярной системы, процессы внутриклеточного транспорта и энергообразования [7, 24, 37, 40]. Применение митотрекеров особенно эффективно при исследовании культивируемых клеток. Пожалуй, единственное ограничение для использования митотрекеров — их высокая стоимость.

Другим популярным направлением анализа прижизненной флюоресценции клеток служит исследование трансгенных животных и клеточных культур, содержащих гены флюоресцирующего белка GFP (green fluorescence protein) в разных модификациях [15, 45, 48]. Клетки, экспрессирующие ген GFP, под действием возбуждающего света способны флюоресцировать без всякого дополнительного окрашивания [45]. В результате появляется возможность морфофункционального анализа клеток внутри целостного организма на разных стадиях эмбриогенеза [48]. Кроме того, введение в клеточный геном структур, кодирующих GFP-белок, позволяет добиться прижизненной флюоресценции мелких высокодифференцированных клеток с уникальным строением или с малым набором органелл (нефотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли, клетки беспозвоночных) [38, 45]. Однако этот подход не применим для безъядерных клеток – тромбоцитов и эритроцитов млекопитающих, в том числе человека.

В последние десятилетия происходит массовое создание банков клеток, позволяющих хранить в течение длительного времени (с использованием методов криоконсервирования) как стволовые, так и дифференцированные клетки. Особую важность представляет длительное хранение при низких температурах ауто- и аллогенных клеток человека для последующего применения в клинической практике. К ним относятся клетки костного мозга, пуповины, а также тромбоциты и эритроциты.

Тромбоциты человека широко используются в клинической гематологии, трансфузиологии, реаниматологии, травматологии, хирургии, акушерстве и гинекологии, онкологии, в связи с чем возникает проблема оценки качества этих клеток. Такую оценку осуществляют с помощью световой [12, 16], электронной [34] и атомно-силовой микроскопии [6] фиксированных тромбоцитов, однако любая фиксация не позволяет оценить реальную жизнеспособность и функциональную активность исследуемых клеток [18]. Наиболее перспективной представляется интегральная оценка, включающая параллельный анализ целостности структуры тромбоцита и его функциональной активности с использованием методов витального окрашивания.

Однако в тромбоцитах человека большинство органелл, характерных для эукариотических клеток, отсутствуют (ядро, аппарат Гольджи) либо слабо развиты (митохондрии, цистерны ЭПР), а окрасить элементы цитоскелета витальными красителями очень

трудно. Таким образом, проблема выбора витального флюорохромного красителя для тромбоцитов попрежнему актуальна.

ВИТАЛЬНОЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЕ ОКРАШИВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ

Применение витальных красителей для исследования клеток крови человека во флюоресцентном микроскопе описано довольно узко [8, 13, 46]. Во многом это связано с тем, что почти все современные методы микроскопического исследования клеток крови основаны на изучении фиксированных препаратов. Среди широко известных красителей для витального окрашивания клеток крови используют флюорохромы - пропидия йодид (для выявления мертвых клеток) и акридиновый оранжевый (АО). АО применяют для окраски нефиксированных ядросодержащих клеток крови, выявления ретикулоцитов, количественного анализа ДНК и РНК лимфоцитов в зависимости от степени активности хроматина [38, 46, 50]. В настоящее время на примере культуры лимфоцитов, окрашенных АО, исследуют структуру митотических хромосом [50].

В норме тромбоциты не содержат ДНКкомпонентов (исключая кольцевой геном немногочисленных митохондрий), однако в ряде исследований АО используется для работы с тромбоцитами. Так, описана способность тромбоцитов накапливать АО в α-гранулах, что позволяет видеть флюоресценцию этих гранул методом проточной флюориметрии. После активации тромбоцитов тромбином в присутствии Ca²⁺ флюоресценция гранул исчезает, а при действии блокатора активации (аминазина) - сохраняется [39]. Недостаток этого, безусловно, очень ценного наблюдения заключается в том, что все исследования проводились на проточном флюориметре без детального анализа морфологии тромбоцитов. По всей видимости, это было вызвано невозможностью выявить отдельные тромбоциты, окрашенные только АО.

Помимо α-гранул, АО обладает способностью накапливаться в гранулах, содержащих серотонин [39], а также в лизосомах и поздних эндосомах [21, 40]. Считается, что такое избирательное накопление обусловлено пониженным рН в α-гранулах и плотных тельцах, что обусловливает повышенное сродство АО с этими структурами тромбоцитов [39]. Следовательно, АО может быть применен для выявления α-гранул и плотных телец в тромбоцитах. В других исследованиях АО используется в качестве внеклеточного флюоресцирующего зонда, с помощью которого предлагается оценивать интенсивность эндоцитоза тромбоцитов [20]. Описана эндоцитозная активность тромбоцитов [13, 47]; более того, есть данные о способности тромбоцитов к уничтожению опухолевых клеток [28]; однако вряд ли эти функции являются определяющими в оценке биологической полноценности тромбоцитов. Предложенный метод [20] не включает проведение микроскопического исследования и не позволяет оценить морфофункциональные параметры тромбоцитов. Более того, сама структура красителя АО указывает на то, что он способен свободно проникать в живые клетки независимо от уровня их эндоцитозной активности.

Таким образом, АО может быть применен для витального окрашивания гранул тромбоцитов. Этот краситель окрашивает цитоплазму в тот же цвет, что и гранулы, в результате чего в витально окрашенных АО тромбоцитах часто не удается выявить гранулы отдельно от цитоплазмы [50]. Поэтому для витальной окраски тромбоцитов необходим еще один краситель, позволяющий дифференциально окрасить цитоплазму клеток.

Для витального окрашивания цитоплазмы тромбоцитов человека был выбран флюорохром трипафлавин. Как и АО, трипафлавин можно использовать для прижизненной окраски ядер [18], однако при окраске клеток трипафлавином наблюдается также флюоресценция цитоплазмы [3, 18], хотя до сих пор точно не установлено, с какими именно цитоплазматическими структурами взаимодействует трипафлавин. Вероятно, трипафлавином окрашиваются мембранные компоненты, так как другой акридиновый краситель — акридиновый желтый, сходный по структуре с трипафлавином, используется для прижизненной окраски мембран некоторых бактерий [22]. Кроме того, установлено повышенное сродство трипафлавина с глиальными клетками мозга [24] и мышечной тканью [48] при различных патологиях, связанных с накоплением в клетках нейтральных липидов. Таким образом, трипафлавин способен связываться с нейтральными липидами биологических мембран. Это его свойство весьма замечательно, поскольку позволяет использовать трипафлавин для прижизненного окрашивания цитоплазмы клеток.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИТАЛЬНО ОКРАШЕННЫХ ТРОМБОЦИТОВ

На основе трипафлавина и АО был разработан витальный флюорохромный краситель, позволяющий проводить морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью флюоресцентного микроскопа [14]. Цитоплазма окрашенных тромбоцитов имеет зеленое свечение, гранулы – красно-оранжевое. Витально окрашенные тромбоциты разделяются на несколько субпопуляций, различающихся по яркости свечения, количеству гранул на 1 клетку и функциональной активности. Показано, что функционально активными являются клетки, содержащие не менее 3 визуально различимых гранул («клетки с гранулами») – такие клетки способны к адгезии на стекле, а также к агрегации под действием индуктора. Яркость клеток с гранулами варьирует от 40 до 80 фут-кандел и позволяет оценить целостность их внутреннего состава (морфофункциональную активность). Самые яркие клетки с гранулами (60—80 фут-кандел) наиболее устойчивы к действию внешних факторов (изменение рН, снижение температуры, действие токсических веществ) и обладают наиболее выраженной функциональной активностью. Напротив, клетки с яркостью свечения <40 фут-кандел являются функционально неактивными и не проявляют адгезивной и агрегационной активности. Морфология таких тромбоцитов разнообразна — среди них встречаются клетки дисковидные: округлые, с отростками, а также клетки неправильной формы (деградирующие), однако все они не содержат гранул или содержат 1—2 мелкие гранулы, часто связанные с клеточной оболочкой.

Витальное окрашивание трипафлавином-АО позволяет проводить морфофункциональный анализ тромбоцитов человека независимо от их концентрации в пробе. Благодаря этому появляется возможность оценить биологическую полноценность тромбоцитов при разных патологических состояниях, в том числе при тромбоцитопениях и тромбоцитозах, когда стандартные методы клинического анализа тромбоцитов (проточная цитометрия, агрегометрия, тромбоэластография) не могут быть использованы. Кроме того, витальная окраска тромбоцитов позволяет оценить чувствительность тромбоцитов пациентов к различным лекарственным препаратам, и прежде всего к препаратам-антиагрегантам (клопидогрел, ацетилсалициловая кислота и т.д.). Помимо клинико-диагностического применения, предложенный метод может быть использован в клинической и производственной трансфузиологии с целью оценки качества концентрата тромбоцитов.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ: ДАЛЬНЕЙШИЕ НАПРАВЛЕНИЯ

Бурное развитие оптической техники в последние 20-30 лет позволило заметно улучшить качество получаемых флюоресцентных изображений клеток. В результате стало возможным исследовать клетки, витально окрашенные двумя и более флюресцентными красителями, а также получать информацию о клеточных структурах с размером меньше классической разрешающей способности оптического микроскопа [24, 30, 32, 33]. В медицине использование современных методов флюоресцентной микроскопии представляется особенно перспективным в области биотехнологий, связанных с изготовлением биотрансплантатов, их трехмерной реконструкцией и моделированием [15, 17, 42]. Кроме того, использование флюоресцентных методов анализа может быть эффективным способом контроля качества клеток человека, используемых для клинических целей (эритроциты, тромбоциты, мезенхимальные клетки костного мозга, фибробласты и т.д.), а также в области клинической диагностики различных патологий.

Исходя из сказанного, можно заключить, что методы витального флюоресцентного анализа клеток представляют большую ценность как для фундамен-

тальной науки, так и для прикладных исследований; их внедрение может стать существенным вкладом в развитие отечественной биологии и медицины.

ЛИТЕРАТУРА

- **1.** Антонов В.Ф. и др. // Биофизика. М., 2000
- 2. Василенко И.А., Кардашова Д.З., Тычинский В.П. и др. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии // Вестник последипломного медицинского образования. 2009: 3–4: 64–8.
- 3. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции // Пер. с англ. – М.: Мир. 1997.
- Герасимов И.Г., Попандопуло А.Г.
 Оценка жизнеспособности клеток по
 их морфометрическим параметрам на
 примере культивируемых фибробластов
 // Цитология. 2007; 49 (3): 204-9.
- Григорьев И.С., Чернобельская А.А., Воробьев И.А. Количественный анализ движений гранул в поляризованных фибробластах // Биологические мембраны. – 1997; 14 (2): 160–73.
- Донников М.Ю., Орлов С.А., Зиновьева А.В. Качественная оценка морфофункциональной активности тромбоцитов по данным атомносиловой микроскопии // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009; 8: 30–2.
- 7. Зефиров А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Сютдикова Г.Ф. Прижизненное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM 1-43 // Цитология. 2003; 45 (12): 34-40.
- Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. – М.: Триада-X, 1997.
- 9. Колосова Е.Н., Василенко И.А., Ковалева Л.Г. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопеничской пурпурой методом витальной компьютерной морфометрии // Бюллетень СО РАМН. – 2011; 31 (2): 58–63.
- Кудряшов Ю.Б., Перов Ю.Ф., Рубин А.Б. Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения // Учебник для ВУЗов. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2008.
- Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н. Когерентные осцилляции состояния молекул белка в живых клетках // Цитология. – 2005; 47 (4): 348–56.
- **12.** Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011.
- 13. Макаров М.С., Хватов В.Б., Боровкова Н.В. Способ оценки морфофункционального статуса витально окрашенных тромбоцитов // Материалы V юбилейной конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты». М., 2012. С. 80–1.
- Макаров М.С., Боровкова Н.В., Высочин И.В., и др. Медицинский Алфавит // Современная лаборатория. – 2012; 3: 32–4.
- Павлова Г.В., Ревищин А.В., Мирошникова О.А. и др. Влияние чужеродного гена gdnf в ксенотрансплантатах на посттравматические процессы в

- мозге мышей // Молекулярная медицина. 2006; 2: 44–8.
- Погорелов В.М., Медовый В.С., Хазем Г.М., Козинец Г.И. Анализ клеточного изображения // Клинич. лаб. диагн. – 1995; 3: 40–3.
- Пустовалова О.Л., Агапов И.И.,
 Мойсенович М.М. и др. Использование
 метода конфокальной микроскопии
 для изучения биологических свойств
 матрикса из рекомбинантной
 паутины // Вестн. трансплантологии и
 искусственных органов. 2009; 11 (2):
 54-0
- Роскин Г.И., Левинсон Л.Б.
 Микроскопическая техника. М.: Советская наука. 1957.
- Световая микроскопия в биологии.
 Методы / Под ред. А. Лейси: Пер. с англ.
 И.А. Воробьева. М.: Мир, 1992.
- 20. Трунилина Н.Н., Мурина М.А., Рощупкин Д.И. и др. Исследование начальной агрегации и аккумуляции акридинового оранжевого в тромбоцитах при хранении тромбоцитарного концентрата с использованием гипохлорита натрия // Гематология и трансфузиология. 2000; 5: 17–9.
- Фаддева М.Д., Беляева Т.Н. ДНКинтеркаляторы: взаимодействие с ДНК и другими клеточными компонентами и применение в биологических исследованиях // Цитология. – 1991; 33 (10): 3–10.
- Фрайштат Д.М. Реактивы и препараты для микроскопии. – М.: Химия, 1980.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell, 4th edition. – New York, Garland Science 2002.
- 24. Betz W., Mao F., Bewick G. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals // J.
- Neurosci. 1992; 12 (2): 363–75. **25.** Braun F., Hegemann P. Direct measurement of cytosolic calcium and pH in living Chamydomonas reinhardtii cells // Eur. J. Cell. Biol. 1999; 78: 199–208.
- 26. Chazotte B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes // Cold Spring Harb Protoc. 2011; 8: 990–2.
- **27.** Coates P., Lorimore S., Wright E. Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation // Mutat. Res. 2004; 568 (1): 5–20.
- **28.** Gupta G., Massague J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link // J. Clin. Invest. 2004; 114 (12): 1691–3.
- **29.** Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6ed. NY, Molecular Probes 1996.
- Hein B., Willig K., Hell S. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell // Proc Natl Acad Sci USA. – 2008; 105 (38): 14271–6.
- Hennessey T., Kuruvilla H. Electrophysiology of Tetrahymena // Methods Cell. Biol. – 2000; 62: 363–77.
- 32. Hess S., Girirajan T., Mason M. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy // Biophys. J. – 2006; 91: 4258–72.

- Klar T., Jakobs S., Dyba M. et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97 (15): 8206–10.
- 34. Lam W., Chaudhuri O., Crow A. et al. Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening // Nat. Mater. –2011; 10: 61–6.
- Maltsev V. Scanning Flow Cytometry for Individual Particle Analysis // Review of Scientific Instruments. – 2000; 71: 243–55.
- 36. Nakanishi J., Takarada T., Yamaguchi K., Maeda M. Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences //Anal. Sci. – 2008: 24: 67–72.
- Pagano R. Lipid traffic in eukaryotic cells: mechanisms for intracellular transport and organelle-specific enrichment of lipids // Curr. Opin. Cell. Biol. – 1990; 2 (4): 652–63.
- Pollard M., Earnshaw W. // Cell. Biology NY, Elsivier Science 2007.
- Popov E., Mejlumian A., Gavrilov I. et al. Evaluation of the ability of intact platelets to accumulate acridine orange // Experientia. – 1988: 44 (7): 616–8.
- Salzman N., Maxfield F. Quantitative fluorescence techniques for the characterization of endocytosis in intact cells // Subcell. Biochem. – 1993; 19: 95–123.
- Shroff H., Galbraith C., Galbraith J., Betzig E. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics // Nat. Methods. – 2008; 5: 417-23
- 42. Stankus J., Guan J., Fujimoto K., Wagner W. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix // Biomaterials. – 2006; 27: 735–44.
- 43. Sugino K., Tominaga T., Allen R., Naitoh Y. Electrical properties and fusion dynamics in vitro membrane vesicles derived from separate parts of the contractile vacuole complex of Paramecium multimicronucleatum // J. Exp. Biol. – 2005; 208: 3957–69.
- 44. Terasaki M., Loew L., Lippincott-Schwartz J., Zaal K. Fluorescent staining of subcellularorganelles: ER, Golgi complex, and mitochondria // Curr. Protoc. Cell. Biol. – 2001: Chapter 4: Unit 4.4.
- **45.** Tsien R. The green fluorescent protein // Annu Rev. Biochem. 1998; 67: 509–44.
- **46.** Walker H., Hall W., Hurst J. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston, Butterworths. 1990
- **47.** White J. Why human platelets fail to kill bacteria // Platelets. 2006; 17 (3): 191–200
- 48. Willig K., Kellner R., Medda R. et al. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy // Nat. Methods. – 2006; 3: 721–3.
- Yang H., Asaad N., Held K. Mediummediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-rayirradiated normal human fibroblasts // Oncogene. – 2005; 24 (12): 2096–103.
- 50. Zelenin A. Acridine orange as a probe for cell and molecular biology. In: Fluorescent and luminescent probes for biological activity. – London, Acad. Press, 1999.

УДК 616.13-004.6-073.432.19+616.13-004.6-091.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ОЦЕНКЕ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ

Л.С. Коков, член-корреспондент РАМН, профессор, **И.В. Шутихина**, кандидат биологических наук, **И.Е. Тимина**, доктор медицинских наук, профессор

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова E-mail: siv1966@mail.ru

Проведен ретроспективный анализ данных ультразвукового (УЗ) и гистологического исследования 199 фрагментов стенки внутренней сонной артерии, полученных при реконструктивных операциях. Показано, что гипоэхогенная зона, диагностированная при УЗИ в структуре или на поверхности бляшки, соответствует кровоизлиянию, тромбозу и(или) атероматозным массам. Гиперэхогенные включения в структуре бляшки морфологически соответствуют кальцинозу и(или) кристаллам холестерина.

Сопоставление структурных особенностей атеросклеротического поражения стенки артерии со степенью ишемии головного мозга у 121 пациента показало, что у больных с очаговой неврологической симптоматикой (IV степень ишемии головного мозга) бляшки с преобладанием гипоэхогенной зоны без нарушения целостности покрышки и с преобладанием гипоэхогенной зоны в сочетании с нарушением целостности покрышки выявлены соответственно в 92,2 и 91% случаев, в то время как у пациентов с I и III степенью ишемии — в 44,8 и 50% наблюдений, что служит показанием для выполнения каротидной эндартерэктомии у первой группы больных для предотвращения развития очаговой неврологической симптоматики.

У 230 больных с атеросклеротическим стенозом периферических артерий наряду с ангиографией были использованы методы неинвазивного и внутрисосудистого (ВС) УЗ-сканирования: 115 больных при подготовке, проведении и оценке результатов стентирования подвздошных артерий, 70 больных — после эндоваскулярного вмешательства на поверхностных бедренных артериях и 45 больных — до и после стентирования устьев почечных артерий.

Показано, что для выбора тактики лечения необходима подробная информация о гемодинамической значимости стеноза, строении и форме атеросклеротической бляшки, конфигурации просвета сосуда. Поэтому комплексная интраоперационная оценка участка стеноза, полученная при ВСУЗИ (наличие кальцинатов, липидных включений, преобладание фиброзных структур и т.д.), помогает принять правильное решение о необходимости эндоваскулярного лечения и выборе метода, особенно в случае развития рестеноза.

Ключевые слова: ультразвуковое исследование, внутрисосудистое ультразвуковое исследование, морфология атеросклеротической бляшки, стентирование

THE USE OF ULTRASOUND TECHNOLOGIES IN THE ASSESSMENT OF ATHEROSCLEROTIC LESIONS OF THE VESSEL WALL L.S. Kokov, I.V. Shutikhina, I.E. Timina

Sechenov First Moscow State Medical University

Retrospective analysis of data of histological and ultrasound examination of 199 fragments of arterial wall of internal carotid artery obtained during reconstructive operations was conducted. A retrospective analysis of ultrasound data and histological examination of 199 fragments of the wall of the internal carotid artery obtained during reconstructive operations has been performed. Hypoechoic area, diagnosed by ultrasound in the structure or on the surface of the plaque was shown to correspond to hemorrhage, thrombosis and/or atheromatous masses. Hyperechoic inclusions in the plaque structure morphologically correspond to calcinosis and/or cholesterol crystals.

A comparison of the structural features of the atherosclerotic lesion of arterial wall with a degree of cerebral ischemia in 121 patients showed that in patients with focal neurological symptoms (IV degree of cerebral ischemia) plaques with a predominance of hypoechoic area without damaging the caps and with the prevalence of hypoechoic area in conjunction with the disintegration of the cap were revealed in 92,2% and 91% of cases, respectively, while in patients with I and III degrees of cerebral ischemia — in 44,8% and 50% of cases, that is an indication for carotid endarterectomy in the first group of patients for the prevention of the development of focal neurological symptoms.

In 230 patients with atherosclerotic stenoses of the peripheral arteries (including 115 patients in the preparation, implementation and evaluation of the results of iliac artery stenting, 70 patients after endovascular intervention on the superficial femoral arteries and 45 patients before and after stenting of the mouth of the renal artery) along with angiography techniques methods of non-invasive and intravascular ultrasound scan have been used.

It is shown that for the challenge of treatment there is needed precise information concerning the hemodynamic significance of the stenosis, the structure and form of the atherosclerotic plaque, the configuration of the vessel lumen. Therefore, a comprehensive intraoperative assessment of the area of stenosis, obtained by intravascular ultrasound - the presence of calcifications, lipid inclusions, the prevalence of fibrous structures, etc., helps to make the right decision on the need and choice of method of endovascular treatment, especially in the case of the development of restenosis.

Key words: ultrasound examination, intravascular ultrasound, plaque morphology, stenting

ВВЕДЕНИЕ

Развитие хирургических методов лечения сосудов требует все более качественной и детальной визуализации сосудистых структур: строения сосудистой стенки, морфологии атеросклеротической бляшки (АСБ). Получившие большое распространение эндоваскулярные операции сопряжены особыми, более строгими условиями к качеству диагностических данных. Если при открытых ангиохирургических вмешательствах наибольший интерес для хирурга представляет состояние проксимального и дистального участков сосудистого русла, прилежащих к пораженному сегменту, то для рентгенохирургических операций особенно важно оценить собственно пораженный участок сосуда. Помимо степени и протяженности стеноза той или иной артерии необходимо определить морфологию и структуру стенозирующих тканей, провести точное измерение параметров поражения. Таким образом, становится очевидным, что ангиография, до сих пор сохранявшая позиции основного инвазивного метода исследования сосудов, нуждается в дополнении и расширении за счет дополнительных средств визуализации. А все данные, получаемые методами лучевой диагностики, в свою очередь, нуждаются в тщательной морфологической верификации.

В реконструктивной сосудистой хирургии УЗдуплексное сканирование является неинвазивным методом дооперационной оценки состояния артерий при определении показаний к операции и уточнении объема вмешательства. Доказана его высокая диагностическая значимость в оценке всего спектра патологических изменений, начиная с дисфункции эндотелия, ранних атеросклеротических изменений сосудистой стенки и заканчивая окклюзирующими поражениями и оценкой результатов хирургического лечения. Ценность этого метода в определении результатов хирургического лечения возрастает с учетом того, что он позволяет исследовать состояние артериальной стенки при подготовке к хирургическому вме-

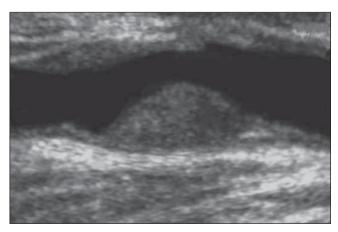


Рис. 1. УЗ-изображение однородной АСТ средней эхо-генности (бляшка 1-го типа)

шательству (в ходе мониторирования), а также в ближайшем и отдаленном послеоперационных периодах.

Специальных методических приемов исследования сосудистого русла этим методом при обсуждении возможности проведения эндоваскулярных операций с учетом их специфики нет. Исследование артерий проводится по стандартной методике дооперационного обследования, принятой в реконструктивной сосудистой хирургии.

Оценка структуры АСБ — одна из важнейших задач, стоящих перед врачом, выполняющим УЗИ. Именно структурные особенности бляшки играют решающую роль в выборе тактики лечения пациента. Благодаря совершенствованию УЗ-техники и появлению таких новых функций, как тканевая гармоника, режим недопплеровской визуализации, 3-мерная реконструкция, диагностическая точность УЗИ в оценке структурных особенностей АСБ все более возрастает.

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ АСБ ВО ВНУТРЕННЕЙ СОННОЙ АРТЕРИИ

В основе существующих классификаций АСБ по данным УЗИ в В-режиме лежат работы L. Reilly и соавт. (1983), дополненные данными A. Gray-Weale и соавт. (1988) [1, 2].

Мы провели предоперационное УЗИ и затем морфологическое исследование структуры 199 фрагментов стенки внутренней сонной артерии (ВСА), удаленных при реконструктивных операциях в отделении сосудистой хирургии (руководитель отделения акад. РАМН, проф. А.В. Покровский). Предоперационное неинвазивное УЗИ АСБ в В-режиме дополняли такими УЗ-технологиями, как тканевая гармоника и режим перекрестного сканирования (Cross Веат). Использование этих технологий в целом давало более высокую контрастность изображения, обеспечивая ряд преимуществ: возможность оценки состояния покрышки при подозрении на нарушение ее целостности, что определяется как прерывистость интимального слоя АСБ; более четкую дифференциацию различных по эхоплотности компонентов АСБ; улучшение визуализации гипоэхогенных компонентов под покрышкой АСБ.

В ряде случаев УЗИ в В-режиме дополняли использованием режима недопплеровской визуализации кровотока (Sie-flow). Использование режима Sie-flow повышает информативность УЗИ в обнаружении мелких тромботических наложений на поверхности бляшки, которые визуализируются как эхонегативные образования на поверхности бляшки или дистальнее ее, обтекаемые форменными элементами крови; небольших эхонегативных бляшек, расположенных на изгибе внутренней сонной артерии; режим более четко, чем цветовое допплеровское картирование (ЦДК) и(или) энергия отраженного

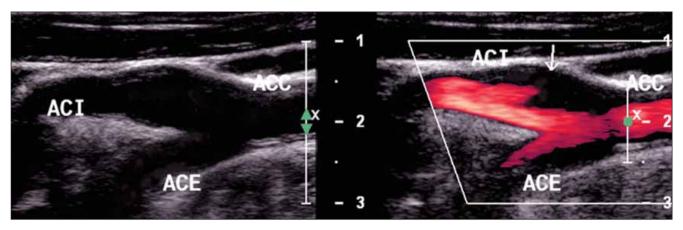


Рис. 2. УЗ-изображение однородной анэхогенной АСБ (бляшка 2-го типа): **a** — в В-режиме бляшка не визуализируется; **б** — в режиме энергии отраженного допплеровского сигнала (ЭОДС) определяется бляшка по передней и задней стенкам сосуда; АСІ — внутренняя сонная артерия; АСЕ — наружная сонная артерия; АСС — общая сонная артерия (здесь и на других рисунках)

допплеровского сечения (ЭОДС), диагностирует нарушение целостности покрышки бляшки и проникновение кровотока в ее полость. Разрешающая способность УЗИ при частоте сигнала 5,5—7,5 МГц для поверхностно расположенных сосудов (таких, как сонная артерия) приближается к десятым долям миллиметра.

В ряде случаев мы считали целесообразным построение 3-мерной реконструкции. Особенно в случае наличия кальциноза на передней стенке артерии, в целях уточнения геометрии бляшки, а также ее структуры.

Для более детального описания структурных особенностей АСБ и последующей верификации данных ультразвукового и морфологического исследований мы выделили следующие УЗ-критерии строения АСБ:

- 1. Однородная АСБ (средней эхогенности, анэхогенная, высокой эхогенности).
 - 2. Неоднородная АСБ:
 - с преобладанием гипоэхогенной зоны без нарушения целостности покрышки;
 - с преобладанием гипоэхогенной зоны в сочетании с нарушением целостности покрышки;

 на фоне чередования ан- и гипоэхогенной зон с преобладанием компонентов высокой эхогенности с наличием или отсутствием акустической тени.

Оценивая гиперэхогенные включения гетерогенных бляшек, мы выделяли: точечные включения, глыбки, массивные включения.

При описании поверхности бляшки оценивали ее как гладкую, шероховатую или с наличием изъязвления.

Анализируя результаты УЗИ, мы выделили 6 типов бляшек в зависимости от их эхоструктуры: однородная бляшка средней эхогенности (тип 1); однородная анэхогенная бляшка (тип 2); однородная бляшка высокой эхогенности (тип 3) — (рис. 1, 2); неоднородная бляшка с преобладанием гипоэхогенной зоны без нарушения целостности покрышки (тип 4); с преобладанием гипоэхогенной зоны в бляшке в сочетании с нарушением целостности покрышки (тип 5) — (рис. 3); неоднородная бляшка на фоне чередования ан- и гипоэхогенной зон с преобладанием компонентов высокой эхогенности с наличием или отсутствием акустической тени (тип 6) — (рис. 4).

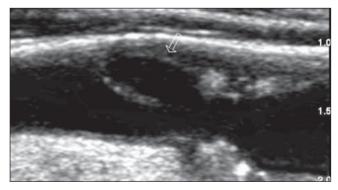


Рис. 3. УЗ-изображение АСБ 5-го типа (бляшка с нарушением целостности покрышки — стрелка)

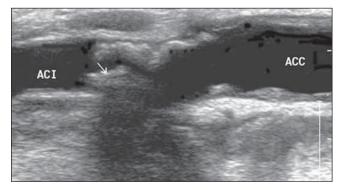


Рис. 4. УЗ-изображение в В-режиме АСБ 6-го типа (стрелка)

СТРУКТУРА АСБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ СТЕНОЗА ВСА

Communication	Стеноз ВСА				
Структура бляшки	60% и менее	65-75%	75-90%	>90%	Bcero
Однородная бляшка средней эхогенности (тип 1)	7	1	_	_	8
Однородная анэхогенная бляшка (тип 2)	6	1	_	_	7
Однородная бляшка высокой эхогенности (тип 3)	8	2	_	_	10
Неоднородная бляшка с преобладанием гипоэхогенной зоны без нарушения целостности покрышки (тип 4)	2	22	33	20	77
С преобладанием гипоэхогенной зоны в бляшке в сочетании с нарушением целостности покрышки (тип 5)	-	7	12	15	34
Неоднородная бляшка на фоне чередования ан- и гипоэхогенной зон с преобладанием компонентов высокой эхогенности с наличием или отсутствием акустической тени (тип 6)	13	20	21	11	65

Связь УЗ-морфологии АСБ и степени стеноза ВСА представлены в табл. 1. Из 199 исследованных АСБ гетерогенные бляшки диагностированы в 176 (88,4%) наблюдениях, гомогенные — в 23 (11,6%). Среди гомогенных бляшек мягкая или анэхогенная АСБ (2-й тип) диагностирована в 6 случаях, АСБ средней эхогенности (1-й тип) и высокой эхогенности (3-й тип) — соответственно в 8 и 9 наблюдениях. Из гетерогенных АСБ чаще диагностированы неоднородные бляшки с преобладанием гипоэхогенной зоны без нарушения целостности покрышки, т.е. бляшки 4-го типа (43,8%). При гемодинамически значимых стенозах в преобладающем большинстве случаев выявляли гетерогенные бляшки (80,4%).

Мы сопоставили структурные особенности АСБ, выявленные по данным УЗИ, с клиническими проявлениями ишемии головного мозга до хирургической коррекции стеноза ВСА у 121 больного (табл. 2).

Из приведенных данных видно, что у пациентов с проявлениями очаговой неврологической симптоматики в виде ишемического инсульта или транзиторных ишемических атак в стенке сонных артерий преобладали АСБ 4-го и 5-го типов, которые были диагностированы нами в 93% наблюдений. Особо следует отметить, что бляшки 5-го типа с нарушением целостности

покрышки диагностированы у пациентов с транзиторными ишемическими атаками в 7 (63,6%), а у больных с ишемическим инсультом — в 17 (33,3%) случаях. Это говорит о крайней эмбологенной опасности АСБ такого типа. Бляшки с преобладанием компонентов высокой эхогенности у больных с проявлениями очаговой неврологической симптоматики диагностированы лишь в 5 наблюдениях. В то же время гомогенные бляшки и бляшки 6-го типа преобладали у больных с бессимптомным течением заболевания (44,8%). У пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией практически в равном соотношении представлены бляшки 4-го и 6-го типов. Однородные бляшки высокой эхогенности диагностированы только у пациентов с I и III степенью ишемии головного мозга.

В 122 наблюдениях сопоставлены результаты дуплексного сканирования с данными, полученными при макроскопическом интраоперационном исследовании удаленной бляшки (табл. 3).

На первый взгляд, приведенные в таблице данные о расхождении результатов УЗИ: на фоне количественного преобладания УЗ-заключений о наличии в стенке сонных артерий неоднородной АСБ с преобладанием гипоэхогенной зоны без нарушения целостности покрышки (тип 4), макроскопическое

Таблица 2 СОПОСТАВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ АСБ ПО ДАННЫМ УЗИ

C	Степень ишемии головного мозга				
Структура бляшки	I	II	III	IV	
Однородная (типы 1, 2 и 3)	3	_	4	_	
Тип 4	9	3	13	30	
Тип 5	4	7	2	17	
Тип 6	13	1	11	4	
Всего	29	11	30	51	

СО СТЕПЕНЬЮ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

интраоперационное исследование чаще свидетельствовало о наличии фиброзной бляшки с неровной поверхностью. Выявленные расхождения могут объясняться тем, что при визуальном исследовании обращают внимание на наличие целостной фиброзной покрышки, под которой на фоне фиброза могут располагаться очаги атероматоза и кровоизлияния, чего нельзя обнаружить при интраоперационной визуальной оценке удаленной бляшки.

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МАКРОСКОПИЧЕСКОГО И УЗ-ИССЛЕДОВАНИЯ В ОЦЕНКЕ СТРУКТУРЫ АСБ

Структура	Макроскопическое исследование АСБ						
бляшки	фиброзная		aranawaraa	атероматоз	атероматоз, кровоизлияние,	vo w www.popowyo.g	
по данным УЗИ	гладкая	неровная	атероматоз	с кровоизлиянием	изъязвление	кальцинированная	
Тип 1	1	3	_	_	_	3	
Тип 4	2	13	22	18	1	_	
Тип 5	_	1	4	5	20	_	
Тип 6	2	5	_	_	-	22	
Всего	5	22	26	23	21	25	

Дальнейшему гистологическому исследованию с последующим сопоставлением с данными комплексного УЗИ подвергнуты 25 фрагментов стенки артерий, содержащих АСБ. По данным предоперационного УЗИ были диагностированы 7 однородных и 18 неоднородных бляшек. Во всех 7 наблюдениях однородные АСБ были образованиями с четкими ровными контурами, средней эхогенности, с наличием единичных точечных гиперэхогенных включений, не дающих акустических теней. Целостность покрышки была сохранена.

При гистологическом исследовании однородных АСБ определялись следующие варианты:

- фиброзная бляшка с точечными включениями кальция (n=2);
- фиброзная бляшка с отложением кристаллов холестерина (n=1);
- фиброзная бляшка с точечными включениями кальция и кристаллами холестерина (n=2);
- фиброзная бляшка с очагами гиалиноза и точечными включениями кальция (n=2).

В 7 наблюдениях из 18 неоднородные бляшки были представлены образованиями средней эхогенности, с наличием гипо- или анэхогенной зоны, занимающей большую площадь бляшки. В 3 случаях из 7 вся площадь бляшки была гипоэхогенной с наличием каркаса средней эхогенности по контуру бляшки. В 6 случаях в структуре бляшки определялись гиперэхогенные включения различного размера в виде точечных включений, глыбок или массивных гиперэхогенных включений с отсутствием или наличием акустической тени. Нарушение целостности покрышки бляшки диагностировано в 3 наблюдениях.

Результаты гистологического исследования неоднородных АСБ были такими:

- фиброзная бляшка с кровоизлиянием и включением кристаллов холестерина (n=1);
- фиброзная бляшка с пристеночным тромбозом, отложения солей кальция и кристаллов холестерина в толще бляшки (n=1);
- фиброзная бляшка с массивным атероматозом, гиалинозом, включениями солей кальция в виде пыли (n=1);

- фиброзная бляшка с атероматозом, фиброзом и множественными включениями кристаллов холестерина (n=1);
- бляшка в одном участке фиброзная с очагом кальциноза, в другом определяется слоистый тромб, базальные слои которого гиалинизированы, на поверхности свежий тромб (n=1);
- бляшка с обширным очагом атероматоза, пропитанным гемолизированной кровью (n=1);
- бляшка с атероматозом, внутрибляшечным кровоизлиянием в виде гематомы и пропитыванием гемолизированной кровью, гиалинозом, включениями кристаллов холестерина и участков кальциноза (n=1).

В остальных 11 бляшках основную площадь занимали гиперэхогенные включения с акустической тенью на фоне чередования анэхогенных, гипоэхогенных зон и участков средней эхоплотности. Нарушение целостности покрышки выявлено в 1 наблюдении.

При морфологическом исследовании бляшек были выявлены следующие варианты:

- фиброзная бляшка с обширным гиалинозом, включениями кальция и атероматозом (n=2);
- фиброзная бляшка с наличием атероматоза, кристаллов холестерина, массивных участков обызвествления (n=3);
- фиброзная бляшка с отложением кристаллов холестерина, солей кальция и диффузной лимфоидной инфильтрацией (n=1);
- фиброзная бляшка с массивным кальцинозом и атероматозом (n=5).

Таким образом, как показало сопоставление результатов ультразвукового и гистологического исследований, средняя эхогенность компонентов бляшки соответствует гиалинозу и фиброзу.

Мы провели градацию часто встречающихся гиперэхогенных структур в составе АСБ. Так, гиперэхогенные включения в толще атеросклеротической бляшки были представлены в виде:

1) точечных включений (при гистологическом исследовании могут соответствовать кристаллам холестерина, солям извести в виде пыли);

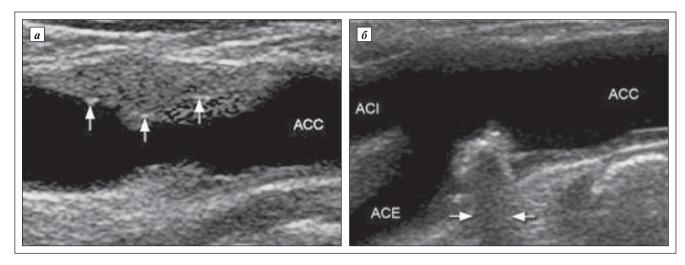


Рис. 5. Гиперэхогенные структуры в составе бляшки: \mathbf{a} — кристаллы холестерина; $\mathbf{б}$ — глыбки кальция, дающие акустическую тень

2) глыбок — с акустической тенью (при гистологическом исследовании могут соответствовать участкам кальциноза); без акустической тени (при гистологическом исследовании могут соответствовать участкам фиброза, гиалиноза, отложениям кальция);

3) массивных включений (при гистологическом исследовании могут соответствовать участкам массивных очагов обызвествления).

Следует отметить, что крупные включения кальция дают широкую акустическую тень, которая, как правило, отсутствует у кристаллов холестерина (рис. 5 а, б). Гипоэхогенные зоны в составе бляшки в наших наблюдениях морфологически соответствовали атероматозу, кровоизлиянию в бляшку, лимфоидной инфильтрации, слоистому тромбу.

Резюмируя собственные исследования и публикации, посвященные изучению морфологической структуры удаленных бляшек, мы можем сделать вывод, что однородная анэхогенная бляшка представляет собой фиброзно-жировое образование, расположенное в субинтимальном слое артериальной стенки,

Таблица 4 ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ РАННИХ РЕСТЕНОЗОВ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА ВСА, СО СРОКОМ НАБЛЮДЕНИЯ ДО 3 ЛЕТ

Степень рестеноза, % Вид операции на ВСА окклюзирующий 75-99 50-60 60 - 70тромбоз Артериотомия с пластикой 4(8,3)4(8,3)1(2,1)1(2,1)заплатой (n=48) Эверсионная эндартерэктомия 3(5,2)1(1,7)5 (8,6) 2(3,4)Стентирование BCA (n=31) 1 (3) 1 (3) 1 (3) **Примечание.** В скобках -%.

содержащее большое количество липидов, и это коррелирует с высоким содержанием липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови [3, 4].

Однородная бляшка средней эхогенности морфологически соответствует фиброзной бляшке, содержащей большое количество коллагена. Больше сложностей возникает при оценке компонентов гетерогенной бляшки. Согласно опубликованным данным, таким морфологическим находкам, как некрозы, геморрагии, липидные отложения и тромботические наложения, соответствуют гипо- и анэхогенные зоны. Однако даже при использовании новых режимов, которые повышают качество УЗ-изображения, не обнаружено дополнительных УЗ-критериев в интерпретации гипо- и анэхогенных зон, формирующих неоднородную бляшку [5, 6].

Крупные гиперэхогенные включения, по данным J. Hunt и соавт. [7], соответствуют кальцинозу и наличию костной ткани в бляшке.

Проведенное нами сопоставление результатов ультразвуковых и гистологических исследований позволяет детализировать классификацию A. Gray-

Weale и соавт. [8], добавив оценку гиперэхогенных структур по их величине (точечные, в виде глыбок, массивные включения) и интенсивности (наличие или отсутствие акустической тени), а также ввести оценку состояния покрышки бляшки. Однако даже при использовании новых режимов У3-сканирования, которые повышают качество изображения, мы не обнаружили дополнительных УЗ-критериев в интерпретации гипо- и анэхогенных зон, формирующих неоднородную структуру АСБ.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО И УЗ-ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ЭНДОВАСКУЛЯРНОГО СТЕНТИРОВАНИЯ И РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА СОННЫХ АРТЕРИЯХ

Проанализированы результаты УЗИ 142 больных, перенесших реконструкцию сонных артерий, со сроком после операции до 3 лет (табл. 4).

Несмотря на значительную техническую и методологическую разницу в выполнении открытых и эндоваскулярных вмешательств, в обоих случаях при оценке ближайших и отдаленных результатов оперативного лечения следует учитывать интраоперационное повреждение сосудистой стенки. В зоне операции в большей или меньшей степени нарушается целостность всех слоев артериальной стенки, часть клеток погибает. Восстановление сосудистой стенки сопровождается формированием новой внутренней оболочки — неоинтимы. В восстанавливающейся интиме происходит гиперплазия клеток, интима утолщается, что иногда приводит к рестенозу или окклюзии сосуда.

После реконструктивного или эндоваскулярного вмешательства пациенты нуждаются в обязательном регулярном наблюдении за состоянием артериальной стенки на месте удаленной или покрытой стентом бляшки. УЗИ — идеальный метод динамического наблюдения этих больных.

В норме в ближайшем послеоперационном периоде в зоне выполнения каротидной эверсионной атероэктомии стенка сонной артерии представлена лишь адвентицией (рис. 6), а после эндоваскулярного вмешательства все слои артериальной стенки сохранены, визуализируется стент (рис. 7).

УЗИ в ближайшем послеоперационном периоде позволяет диагностировать такие дефекты оперативного вмешательства, как гемодинамически незначимый резидуальный стеноз, изгиб артерии, флотация остатков интимы (после реконструктивных операций), неполное расправление стента, неполное по-

Рис. 7. УЗ-изображение в В-режиме. В просвете сосуда визуализируется стент

крытие атеросклеротической бляшки после эндоваскулярного вмешательства (рис. 8, 9) и т.д.

Эти ситуации требуют динамического наблюдения, поскольку могут стать причиной развития раннего рестеноза или тромбоза (рис. 10).

В ряде случаев даже нормальное течение позднего послеоперационного периода может осложниться развитием рестеноза. В литературе приводится множество определений рестеноза, однако наиболее часто рестенозом называют повторное сужение внутреннего просвета артерии на 50% и более. Рестеноз нельзя рассматривать как неудачу хирургического лечения, скорее, это естественный динамический процесс, развивающийся в сосудистой стенке на месте удаленной АСБ (рис. 10 а, б).

При каротидной эверсионной атероэктомии на участке поврежденной артериальной стенки начинаются репаративные процессы, заключающиеся в пролиферации гладкомышечных клеток медии. Пролиферация появляется примерно через 1 нед и закан-

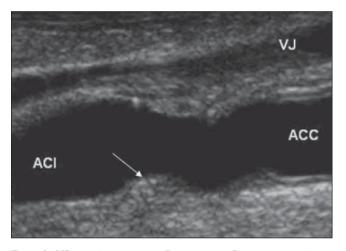


Рис. 6. УЗ-изображение в В-режиме. Стенка сонной артерии в зоне реконструкции представлена адвентицией; VJ — яремная вена

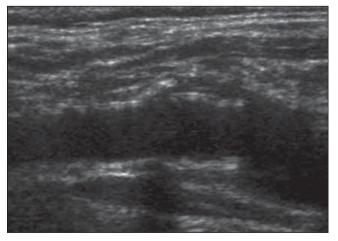


Рис. 8. УЗ-изображение стента в ВСА. Неполное расправление стента



Рис. 9. Макропрепарат. Рестеноз стента BCA через 6 мес после имплантации

чивается к концу 1-го года после операции. Анализ сроков развития рестеноза у оперированных показал, что в достаточно короткие сроки после операции возможны спонтанное прогрессирование и утолщение внутренней оболочки реконструированной артерии. Более того, именно в течение 1-го послеоперационного года риск развития рестеноза наиболее велик [9].

Процесс прогрессирующего утолщения стенки оперированной артерии получил название неоинтимальной гиперплазии. Описаны механизмы гиперплазии интимы в эксперименте. Причем этот процесс отмечается как после эндартерэктомии, так и после стентирования артерии [10]. Показано, что гладкомышечные клетки мигрируют из медии в интиму после нарушения целостности эндотелия. Этому процессу предшествует адгезия тромбоцитов на поврежденной поверхности сосуда. В процессе адгезии тромбоциты вырабатывают не только вазоактивные вещества (серотонин, аденозинтрифосфат, фибриноген, фактор Виллебранда), но и факторы роста. Далее происходит миграция гладкомышечных клеток в интиму.

Экспериментальные данные, полученные на крысах, свидетельствуют о том, что пролиферативная активность 30-40% клеток отмечается через 1 сут после повреждения, а на 2-4-е сутки начинается их миграция в интиму. По некоторым данным, максимальная пролиферация наблюдается на 2-е сутки после операции, а на 7-е сутки наступает реэндотелизация. К концу 1 нед митотический индекс возвращается к исходному. Другие исследователи сообщают, что регенерация и развитие интимальной гиперплазии начинаются на 5-е сутки после операции, к 15-му дню гиперплазия охватывает зону анастомоза, а к 28-м суткам гладкомышечные клетки густо покрывают зону анастомоза или заплаты и распространяются в трансплантат на глубину 2 мм. К 140-му дню происходит полная реэндотелизация поврежденной поверхности. Факторы роста контролируют завершение процесса и останавливают пролиферативную активность [9–11].

В клинической практике рестеноз формируется в течение первых 2 лет. В этот период на участке рестеноза сосудистая стенка представляет собой гладкую поверхность с морфологически выраженным фиброзом, скоплением гладкомышечных клеток и экстрацеллюлярного матрикса (рис. 11 а, б). Позднее в зонах рестеноза обнаруживают скопления липидов, кристаллы кальция, мелкие тромбы, располагающиеся на внутренней поверхности артерии. По мнению некоторых исследователей, эндотелий, появившийся в результате миграции гладкомышечных клеток, наиболее подвержен аккумуляции липидов. Пролиферативная активность субэндотелиальных клеток и повышенный синтез компонентов экстрацеллюлярного матрикса объединяют интимальную гиперплазию различного генеза и процессы развития атеросклеротических поражений [9].

УЗ-картина позднего рестеноза характеризуется наличием в просвете сосуда структуры, во многом

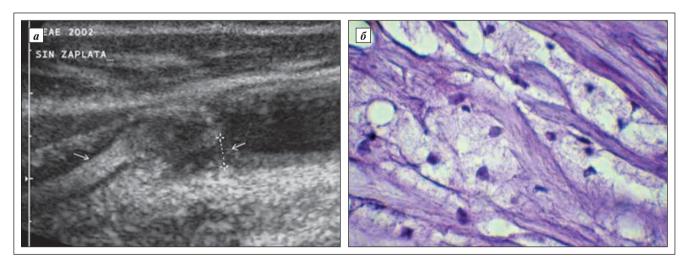


Рис. 10. Состояние после каротидной эверсионной эндартерэктомии. Рестеноз. Циркулярное сужение просвета ВС: **a** — УЗ-изображение в режиме недопплеровской визуализации раннего рестеноза (стрелка); **б** — микропрепарат. Видны фибробласты и тонкие коллагеновые волокна

сходной с гетерогенной АСБ, большая часть которой имеет пониженную эхогенность. Целостность покрышки может быть сохранена либо нарушена.

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ АСБ В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ АРТЕРИЯХ

В последние 15 лет одним из самых востребованных диагностических методов, существенно дополняющим данные неинвазивного УЗ-дуплексного сканирования и ангиографии, оказывающим значительное влияние на ход эндоваскулярных вмешательств, стало внутрисосудистое УЗИ (ВСУЗИ).

При этом исследовании УЗ-датчик находится внутри сосуда. Поэтому не имеют значения факторы, влияющие на ангиографическое изображение (изгиб сосуда, наложение других сосудов, неадекватное позиционирование). Благодаря высокой частоте УЗсигнала (от 12 до 40 МГц) появляется возможность более тонкого исследования элементов сосудистой стенки, чем при неинвазивном методе УЗ-сканирования. Разрешающая способность такого сканирования приближается к сотым долям миллиметра. Это позволило некоторым разработчикам именовать данный вид исследования «виртуальной гистологией».

Обе методики сканирования нами применены у 230 больных с атеросклеротическими поражениями периферических артерий: у 115 — при подготовке, проведении и оценке результатов стентирования по поводу атеросклеротических сужений подвздошных артерий; у 70 больных, перенесших эндоваскулярное вмешательство на поверхностных бедренных артериях и у 45 — до и после стентирования устьев почечных артерий. Результаты ангиопластики и стентировния стенозов подвздошных артерий приближаются к таковым открытых реконструктивных операций в аортоподвздошном сегменте. 5-летняя проходимость стентированных артерий составляет 80 90%. Непосредственный успех стентирования артерий в бедренно-подколенном сегменте, по нашим данным, составляет 90%. Однако при длительных сроках наблюдения показатели проходимости снижаются до 60%.

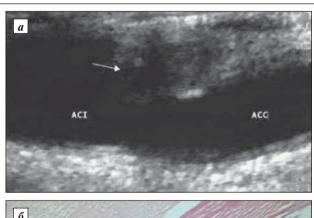
У всех 230 больных со стенозом периферических артерий УЗ-сканирование было проведено до стентирования и в различные сроки после операции вплоть до 3 лет наблюдения. ВСУЗИ использовали у 22 больных и только на интраоперационном этапе в случаях сложной морфологии атеросклеротической бляшки или при противоречивых данных ангиографии для точного определения размеров применяемого стента и оценки непосредственных результатов стентирования.

Для выбора тактики лечения требуется подробная информация о гемодинамической значимости стеноза, строении и форме АСБ, конфигурации просвета сосуда. Поэтому комплексная интраоперационная оценка геометрии и композиции участка стеноза, полученная при ВСУЗИ (наличие кальцинатов, липидных включе-

ний, преобладание фиброзных структур и т.д.), помогает принять окончательное решение о необходимости эндоваскулярного лечения и в выборе метода.

Повторные ВСУЗИ выполнены у 10 больных с рестенозами в стентах, имплантированных в подвздошные артерии: у 8 — со стенозом стентов бедренных артерий и у 2 — с рестенозом стентированных почечных артерий.

УЗ-критерием гиперплазии неоинтимы как основной морфологической структуры рестеноза в стенте считается циркулярное, как правило, пролонгированное утолщение стенки артерии, имеющее гипоэхогенную неоднородную структуру, локализующееся в зоне реконструкции, толщиной $\geq 3,0\,$ мм. Следует подчеркнуть, что в диагностике рестенозов имеются некоторые особенности. В частности, учитывая их гипоэхогенную структуру и зачастую сложную геометрическую форму, помимо продольного, обязательно необходимо поперечное сканирование зоны реконструкции как в В-режиме, так и в режиме ЦДК (рис. 12).



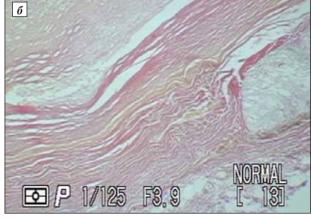


Рис. 11. Поздний рестеноз в дистальном отделе общей сонной артерии с распространением на область дистального анастомоза через 11 лет после оперативного вмешательства: a — УЗ-изображение в В-режиме. Стрелкой отмечено нарушение целостности покрышки; б — гистологическая картина соответствует наличию грубой фиброзной ткани с обильными видоизмененными коллагеновыми волокнами, с наличием атероматоза у просвета сосуда

О гемодинамической значимости рестеноза, обусловленного неоинтимальной гиперплазией, следует говорить при наличии сужения просвета артерии, локализующегося непосредственно в зоне оперативного вмешательства или внутри стента, стенозирующего просвет сосуда более чем на 50%, как по данным ангиографии (рис. 13, 14), так и по соответствующим изменениям спектра допплеровского сдвига частот [12, 13].

Такой же комплекс лучевых методов диагностики необходим в оценке степени рестеноза после стентирования почечных артерий. Ангиография позволяет оценить степень и протяженность сужения внутреннего просвета стентированного участка (рис. 15). Уда-

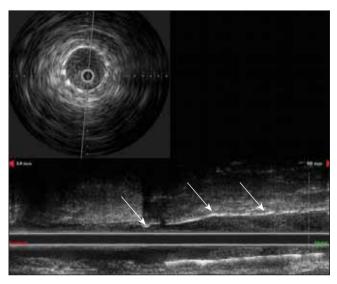


Рис. 12. ВСУЗИ стентированного участка артерии. Поперечный срез и продольная реконструкция бедренной артерии. В просвете артерии визуализируется пролонгированная АСБ (1-й тип), прикрытая имплантированным стентом (стрелки)

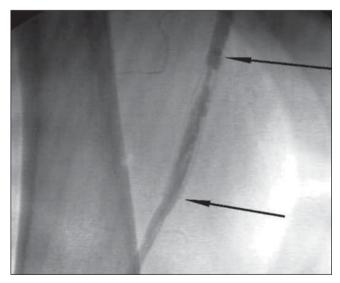


Рис. 13. Ангиограмма. Гиперплазия интимы в стентированной бедренной артерии (стрелки)

ется оценить положение самого стента, степень его раскрытости и иногда толщину гиперплазированной неоинтимы. С учетом разрешающей возможности метода можно достаточно точно измерить лишь просвет артерии и диаметр стента.

Неинвазивное УЗИ позволяет более дифференцированно исследовать просвет и стенку почечной артерии, определить геометрические параметры и морфологические характеристики гиперплазированной неоинтимы. Режим допплеровской оценки кровотока на уровне рестеноза в стенте и дистальнее его позволяет определить степень сужения (рис. 16). Для более детальной оценки положения стента по отношению к первичной АСБ, степени утолщения неоинтимы и точного выбора места повторного стентирования необходимо использование ВСУЗИ (рис. 17). У всех больных с рестенозом стентированного участка периферических артерий выполнено повторное стентирование «стент в стент».

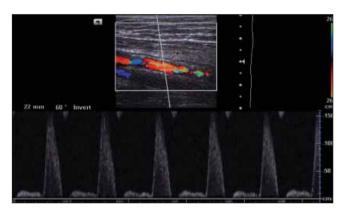


Рис. 14. УЗ-изображение в режиме ЦДК бедренной артерии. Определяется пристеночный дефект окрашивания потока (гиперплазия интимы). Кровоток соответствует рестенозу до 50%



Рис. 15. Ангиограмма. Рестеноз в стенте почечной артерии >50%

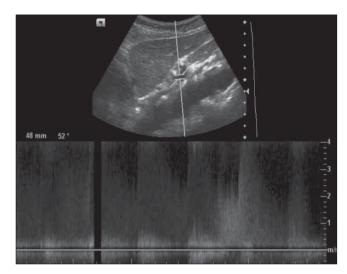


Рис. 16. У3-изображение в В-режиме почечной артерии через 12 мес после стентирования. Кровоток соответствует рестенозу 90% в стенте

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ретроспективный анализ данных ультразвукового и гистологического исследования фрагментов стенки ВСА, полученных при реконструктивных операциях, показал, что гипоэхогенная зона, диагностированная при УЗИ в структуре или на поверхности бляшки, соответствует кровоизлиянию, тромбозу и(или) атероматозным массам. Гиперэхогенные включения в структуре бляшки морфологически соответствуют кальцинозу и(или) кристаллам холестерина.

Сопоставление структурных особенностей атеросклеротического поражения стенки артерии со степенью ишемии головного мозга показало, что у больных с очаговой неврологической симптоматикой (IV степень ишемии головного мозга) бляшки с преобладанием гипоэхогенной зоны без нарушения целостности покрышки и с преобладанием гипоэхогенной зоны в сочетании с нарушением целостности покрышки выявлены соответственно в 92,2 и 91%

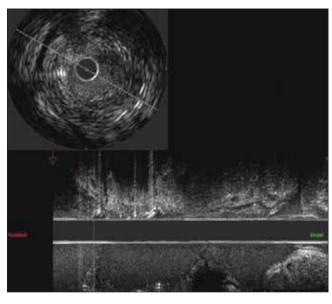


Рис. 17. ВСУЗИ. Рестеноз 90%

случаев, в то время как у пациентов с I и III степенью ишемии — в 44.8 и 50%, что является показанием для выполнения каротидной эндартерэктомии у первой группы больных для предотвращения развития очаговой неврологической симптоматики.

Для выбора тактики лечения атеросклеротических стенозов и рестенозов периферических артерий требуется подробная информация о гемодинамической значимости стеноза, строении и форме АСБ, конфигурации просвета сосуда. Такая информация может быть получена не только с помощью ангиографии и неинвазивного УЗ-сканирования, но и при применении ВСУЗИ. Комплексная интраоперационная оценка участка стеноза, полученная при ВСУЗИ (наличие кальцинатов, липидных включений, преобладание фиброзных структур и т.д.), помогает принять правильное решение о необходимости эндоваскулярного лечения и выборе метода, особенно в случае развития рестеноза.

ЛИТЕРАТУРА

- Reily L., Lusby R., Hughes L. et al. Carotid plaque histology using real-time ultrasonography: clinical and therapeutic implications. // Am. J. Surg. – 1983; 146: 188–93.
- Gray-Weale A., Graham J., Burnett J. et al. Carotid artery atheroma; comparision of preoperative B-mode ultrasound appearance with carotid endarterectomy specimen pathology // J. Cardiovasc. Surg. – 1988; 29: 676–81.
- AbuRahma A., Wulu J., Crotty B. Carotid plaque ultrasonic heterogeneity and severity of stenosis // Stroke. – 2002; 33: 1772–5
- Pedro L., Fernandes e Fernandes J., Pedro M. Ultrosonographic risk score of carotid plaques // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2002; 24; 492–8.
- Schulte-Altedorneburg G., Droste D., Haas N. et al. Preoperative B-mode ultrasound

- plaque appearance compared with carotid endarterectomy specimen pathology // Acta Neurol. Scand. – 2000; 101 (3): 188–94.
- Тимина И.Е., Скуба Н.Д., Бурцева Е.А. и соавт. Сопоставление структуры атеросклеротической бляшки в сонной артерии по данным комплексного ультразвукового и гистологического исследований // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2004; 3: 81–7.
- Hunt J., Fairman R., Mitchell M. et al. Bone formation in carotid plaque. A clinicopathological study // Stroke. – 2002; 33: 1014-0
- Gray-Weale A., Graham J., Burnett J. et al. Carotid artery atheroma; comparision of preoperative B-mode ultrasound appearance with carotid endarterectomy specimen pathology // J. Cardiovasc. Surg. – 1988; 29: 676–81.

- Keberly M. et al. Tree-Demensional Power Doppler Sonography in Screening for Carotid Artery Disease // Clin. Ultrasound. – 2000; 28: 441–51.
- 10. Коков Л.С., Капранов С.А., Долгушин Б.И., Троицкий А.В., Протопопов А.В., Мартов А.Г. Руководство – Под ред. М.: Издательский дом «ГРААЛЬ», 2003. – 384 с.
- Clowes A., Schwartz S. Significance of quiescent smooth migration in the injured rat carotid artery // Circ. Res. – 1985; 56: 139–45.
- 12. Шутихина И.В., Зятенков А.В., Коков Л.С. Современные подходы к диагностике и лечению вазоренальной гипертензии. Часть 1 // Диагностическая и интервенционная радиология. 2012; 6 (1): 79-86.
- 13. Шутихина И.В., Коков Л.С. Ультразвуковые технологии в эндоваскулярной хирургии В кн. «Рентгеноэндоваскулярная хирургия в неотложной практике». – 2012; 70–3.

ОДНОФОТОННАЯ ЭМИССИОННАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ ТОМОГРАФИЯ С 99МТС-МИБИ И 199ТІ-ХЛОРИДОМ В ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ ПЕРВИЧНЫХ И РЕЦИДИВНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОРТАНИ И ГОРТАНОГЛОТКИ

В.И. Чернов, доктор медицинских наук, профессор, **Р.В. Зельчан**, **А.А. Тицкая**, кандидат медицинских наук, **И.Г. Синилкин**, кандидат медицинских наук, **С.Ю. Чижевская**, кандидат медицинских наук, **Е.Л. Чойнзонов**, академик РАМН

Научно-исследовательский институт онкологии СО РАМН, Томск

E-mail: r.zelchan@yandex.ru

Целью исследования были оценка эффективности однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с ^{99m}Tc-МИБИ в комплексной диагностике и оценке эффекта неоадъювантной химиотерапии злокачественных опухолей гортани и гортано-глотки, а также изучение возможности применения ¹⁹⁹Tl-хлорида для визуализации первичных и рецидивных опухолей гортани.

В исследовании участвовали 60 больных раком гортани и гортаноглотки $T_{_{1-4}}N_{_{0-1}}M_{_0}$, а также 5 пациентов с рецидивом рака гортани, которым проводились однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОЭКТ) с 99m Tc-МИБИ на этапе первичной диагностики и после 2 курсов неоадъювантной химиотерапии, а также ОЭКТ с 199 Tl-хлоридом с целью визуализации первичных и рецидивных опухолей гортани и гортаноглотки.

Чувствительность ОЭКТ с 99m Тс-МИБИ, по нашим данным, составила 97,5%; чувствительность ОЭКТ с 199 Тl-хлоридом в диагностике первичных опухолей гортани и рецидивов — 100%. При вычислении в раннюю фазу исследования количественных показателей получены следующие результаты: для 99m Тс-МИБИ среднее значение индекса опухоль/подчелюстная слюнная железа=0,62 \pm 0,25, опухоль/околоушная железа=0,58 \pm 0,35, опухоль/скальп=5,64 \pm 3,52; для 199 Тl-хлорида соответственно 0,94 \pm 0,4, 1,10 \pm 0,6 и 4,69 \pm 3,06.

Данное исследование показало, что ОЭКТ с ^{99m}Tc-МИБИ может стать не только одним из дополняющих методов диагностики рака гортани и гортаноглотки, но и объективным методом оценки эффективности неоадъювантной химиотерапии. Кроме того, в данном исследовании впервые продемонстрирована возможность применения ¹⁹⁹Tl-хлорида для диагностики как первичных, так и рецидивных опухолей гортани.

Ключевые слова: однофотонная эмиссионная компьютерная томография, ^{99т}Tc-МИБИ, ¹⁹⁹Tl-хлорид, рак гортани

SINGLE PHOTON EMISSION COMPUTED TOMOGRAPHY WITH 99MTc-MIBI AND 199TI-CHLORIDE IN THE DIAGNOSIS AND EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF CHEMOTHERAPY OF PRIMARY AND RECURRENT TUMORS OF THE LARYNXAND HYPOPHARYNX

V.I. Chernov, R.V. Zelchan, A.A. Titskaya, I.G. Sinilkin, S.Yu. Chizhevskaya, E.L. Choynzonov Tomsk cancer research institute of the Russian Academy of Medical Sciences

Purpose: to study the potency of single-photon emission computed tomography (SPECT) with ^{99m}Tc-MIBI in the diagnosis and assessment of laryngeal and laryngopharyngeal cancer response to neoadjuvant chemotherapy as well as to investigate the feasibility of ¹⁹⁹Tl-chloride for visualization of primary and recurrent laryngeal tumors.

Materials and Methods: The study included 60 patients with stage $T_{1-4}N_{0-1}M_0$ laryngeal and laryngopharyngeal cancers and 5 patients with recurrent laryngeal cancer who were undergone both SPECT with 99m Tc-MIBI at the stage of the primary diagnosis and after two courses of neoadjuvant chemotherapy and SPECT with 199 Tl-chloride for visualization of primary and recurrent laryngeal tumors.

Results: Sensitivity of SPECT with 99m Tc-MIBI was found to be 97% and sensitivity of SPECT with 199 Tl-chloride was 100%. Calculation of quantitative parameters showed that for 99m Tc-MIBI the mean value of the tumor/mandibular glad/early index was 0,62±0,25, the mean value of the tumor/parotid gland/early index was 0,58±0,35 and the mean value of the tumor/scalp/early index was 5,64±3,52. For 199 Tl-chloride, the mean values of the tumor/mandibular gland/early index, tumor/parotid gland/early index and tumor/scalp/early index were 0,94±0,4, 1,10±0,6 and 4,69±3,06, respectively.

Conclusion: This study has shown that SPECT with ^{99m}Tc-MIBI can be considered as not only the one of the additional methods in diagnosis of laryngeal and laryngopharyngeal cancers but also as a method of assessing the effect of neoadjuvant chemotherapy. Also, the present study has shown that ¹⁹⁹Tl-chloride SPECT can be one of the auxiliary methods in detection of primary and recurrent laryngeal tumors.

Key words: single-photon emission computed tomography, 99m Tc-MIBI, 199 Tl-chloride, laryngeal and laryngopharyngeal cancer

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется более 10 млн впервые выявленных случаев злокачественных новообразований. Смертность от онкологических заболеваний в 2011 г. заняла 2-е ранговое место после заболеваний сердечно-сосудистой системы, опередив смертность в результате травм и несчастных случаев. [7]. По современным литературным данным, на долю рака гортани и гортаноглотки приходится 5-6% всех злокачественных новообразований, при этом данная локализация составляет 60-70% от злокачественных опухолей верхних дыхательных путей. В настоящее время среди впервые выявленных больных раком гортани частота I-II стадии составляет 35,3%, а рак *in situ* -6%. В преобладающем большинстве случаев (60-70%) злокачественные опухоли гортани диагностируют в III-IV стадии [8].

На современном этапе развития онкологии диагностика рака гортани и гортаноглотки является комплексной и включает ларингоскопию, фиброларингоскопию, компьютерную томографию (КТ) и(или) магнито-резонансную томографию (МРТ), радионуклидные методы исследования.

Оправданность применения методов ядерной медицины в диагностике рака гортани и гортаноглотки несомненна. Несмотря на достижения современной эндоскопической техники, фиброларингоскопия является инвазивным методом, проводится под местной анестезией, и нередко адекватный осмотр зоны интереса является весьма непростой задачей. При обследовании пациентов с данной патологией методами КТ и МРТ возникают сложности дифференциальной диагностики постлучевых фиброзных изменений и рецидива опухоли, особенно после комбинированного органосохраняющего лечения. Кроме того, ни один из перечисленных методов диагностики рака гортани не позволяет предсказать и адекватно оценить эффект от проводимого химиотерапевтического лечения. Повысить качество диагностики рака гортани и гортаноглотки, а также привнести дополнительную информацию о состоянии первичного опухолевого очага и зон регионарного лимфооттока могут методы ядерной медицины, поскольку они являются функциональными и отражают метаболические процессы, происходящие в опухолевой ткани. Наиболее изученным и получившим широкое распространение радиофармпрепаратом (РФП) для визуализации опухолевой ткани с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОЭКТ) является 99тСметоксиизобутилизонитрил (99m Tc-МИБИ) [2–4, 6]. В эксперименте показано, что наиболее интенсивно 99тТс-МИБИ накапливается в митохондриях жизнеспособных атипичных клеток, отражая тем самым интенсивность обменных процессов в опухолевой ткани и уровень кровотока в ней [9,11, 13].

С середины 80-х годов для визуализации опухолевой ткани стал применяться ²⁰¹Tl. Механизм накопления этого изотопа клетками организма связан с тем, что он является биологическим аналогом калия. Учитывая, что опухолевая ткань отличается интенсивным энергетическим обменом, ²⁰¹Tl активно накапливается в опухолевом узле [10]. В экспериментальных исследованиях показано, что ²⁰¹Tl характеризуется наиболее высоким, чем другие РФП, индексом накопления в злокачественных новообразованиях [5]. Основным недостатком этого нуклида является длительный период полураспада – 72 ч и, как следствие, высокая экспозиционная доза облучения, что ограничивает возможность проведения повторных исследований у одного больного во время лечебных мероприятий, например в процессе химиотерапии.

Указанных недостатков лишен другой изотоп таллия — ¹⁹⁹Tl. Опубликовано немало работ, посвященных использованию этого радионуклида для перфузионной сцинтиграфии миокарда [1]. Механизм накопления его в клетках такой же, как и ²⁰¹Tl. Однако ¹⁹⁹Tl является короткоживущим изотопом с периодом полураспада 7,4 ч, что значительно снижает дозовую нагрузку в целом на пациента и на критические органы [5]. Однако анализ литературы свидетельствует о том, что ни за рубежом, ни в нашей стране работы по изучению возможности применения ¹⁹⁹Tl для диагностики злокачественных опухолей гортани и гортаноглотки не выполняются.

Нами изучены эффективность ОЭКТ с ^{99m}Тс-МИБИ в комплексной диагностике и оценке эффекта неоадъювантной химиотерапии злокачественных опухолей гортани и гортаноглотки, а также возможности применения ¹⁹⁹ТІ-хлорида для визуализации первичных и рецидивных опухолей гортани и гортаноглотки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 60 больных раком гортани и гортаноглотки $T_{1-4}N_{0-1}M_0$, а также 5 пациентов с рецидивом рака гортани, находившиеся на лечении в НИИ онкологии СО РАМН Томска. Наиболее многочисленной была группа с опухолью T3 - 36 (60%) пациентов, следующей по частоте была группа с опухолью T2 - 16 (26,6%), реже встречались T1-4 (6,7%) больных и T4-4 (6,7%) больных. По данным цитологического исследования биопсийного материала, у 11 (18,3%) пациентов были выявлены метастазы в регионарные лимфатические узлы (N1), у 49 (81,7%) метастатического поражения лимфатических узлов не обнаружено. На момент обследования ни у одного из пациентов не было признаков отдаленного метастазирования. В основной группе 20 больных были обследованы повторно с помощью ОЭКТ с ^{99m}Тс-МИБИ, после проведения 2 курсов неоадъювантной химиотерапии по схеме: паклитаксел 175мг/м²/карбоплатин AUC-6 с интервалом 3 нед.

Контрольную группу составили 20 женщин, проходивших обследование по поводу рака молочной железы.

Всем пациентам были выполнены: ларингоскопия, УЗИ шеи, фиброларингоскопия с осуществлением биопсии для морфологического исследования, КТ — органов шеи. ОЭКТ с ^{99m}Тс-МИБИ проведена 40 пациентам, исследование со ¹⁹⁹Тl-хлоридом — 20. Комбинированное лечение предполагало обязательное выполнение хирургического вмешательства в радикальном объеме с последующим морфологическим и иммуногистохимическим исследованием операционного материала, если после консервативного лечения отмечались стабилизация или регресс опухоли <50%.

ОЭКТ гортани проводили на 2-детекторной гамма-камере E.CAM 180 (Siemens, Германия). Исследование с ¹⁹⁹Tl выполняли с использованием высокоэнергитических коллиматоров для энергии 360 КэВ, с 99тТс-технетрилом (МИБИ, Диамед, Москва) применяли коллиматоры для энергии 140 КэВ. РФП вводили в локтевую вену: 199 Tl — в дозе 260 МБк, 99m Tc-Технетрил – 740 МБк. Через 15–20 мин и 2 ч после введения РФП выполняли ОЭКТ. Исследование проводилось в положении пациента лежа на спине. В поле зрения детектора входили область головы и шеи, трахея до бифуркации. Проводили запись 32 проекций (каждая — по 30 c) в матрицу 64×64 пикселя без аппаратного увеличения. Полученные данные обрабатывали на компьютере с использованием специализированной системы E.Soft (Siemens, Германия) и получением сагиттальных, поперечных и коронарных срезов. Томосцинтиграммы оценивали визуально, определяли накопление препарата в проекции гортани и зон регионарного лимфооттока. Сравнивались контралатеральные области, при этом патологически измененными считали асимметричные участки гиперфиксации индикатора. Кроме этого, вычисляли следующие индексы накопления в опухоли РФП в раннюю фазу исследования: опухоль/подчелюстная слюнная железа (о/п), опухоль околоушная слюнная

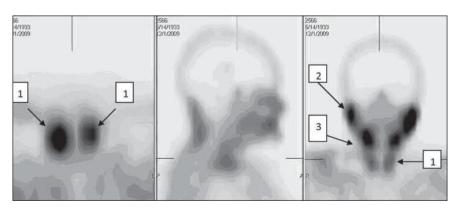


Рис. 1. Физиологическое распределение 99m *Tc-МИБИ*: 1- щитовидная железа; 2- околоушная слюнная железа; 3- подчелюстная слюнная железа

железа (о/о) и опухоль/скальп (о/с). Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакета программ STATISTICA компании «StatSoft.Inc», версия 6.0, с использованием описательной статистики (Descriptive statistics) и методом Манна—Уитни для оценки значимости внутригрупповых различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У обследованных контрольной группы визуализировалось физиологическое накопление препарата в проекции щитовидной железы, мышц шеи, слизистой оболочке носовой полости и различных групп слюнных желез. В проекции гортани участков гиперфиксации индикатора не определялось (рис.1).

При проведении фиброларингоскопии и КТ первичный очаг был выявлен у 100% больных раком гортани или гортаноглотки. При исследовании с ^{99m}Tc-МИБИ очаги асимметричной гиперфиксации индикатора в проекции гортани визуализировались у 39 (97,5%) из 40 пациентов. При использовании ¹⁹⁹Tl-хлорида — у всех 20 (100%) пациентов с первичной опухолью и 5 (100%) — с рецидивной.

Таким образом, чувствительность ОЭКТ с 99тС-МИБИ, по нашим данным, составила 97,5%, ОЭКТ с ¹⁹⁹Tl-хлоридом в диагностике первичных опухолей гортани и рецидивов – 100%. В единственном случае при использовании 99тТс-МИБИ получен ложноотрицательный результат, хотя по данным КТ определялась больших размеров опухоль с обширным местным распространением. Отсутствие накопления препарата в проекции опухоли в данном случае, наиболее вероятно, было связано с нарушением кровоснабжения опухолевой ткани, поскольку известно, что выраженность кровотока играет ключевую роль в интенсивности включения индикатора в опухоль [13]. В таких ситуациях повысить информативность исследования помогает примененная нами методика совмещения ОЭКТ- и КТ-изображений, позволившая визуализировать злокачественное новообразование у 60 (100%) пациентов (рис. 2). По данным Т. Leitha,

при совмещении ОЭКТ- и КТ-изображений чувствительность и специфичность методик приближается к 100% в диагностике как первичной опухоли, так и рецидивов [12].

Следует отметить, что при общепринятых ограничениях метода в визуализации новообразований размером <10 мм, в нашем исследовании более чем в 90% случаев визуализировались опухоли <10 мм в наибольшем измерении, а самое малое обнаруженное образование составило 4 мм. При вычислении количе-

ственных показателей получены следующие результаты: для 99m Tc-МИБИ среднее значение индекса $o/n=0,62\pm0,25,~o/o=0,58\pm0,35~$ и $o/c=5,64\pm3,52;~$ для 199 Tl-хлорида соответственно $0,94\pm0,4,~1,10\pm0,6$ и $4,69\pm3,06.~$ Однако какой-либо связи вычисленных показателей с гистологическим типом опухоли, степенью ее дифференцировки или стадией процесса мы не обнаружили.

При проведении ОЭКТ с ¹⁹⁹Tl-хлоридом с целью диагностики рецидива количественные показатели не рассчитывались, а томосцитиграммы оценивали визуально. Состояние зон регионарного лимфооттока оценивали путем морфологического исследования материала, полученного с помощью тонкоигольной биопсии под контролем УЗИ, при этом в 18,3% случаев было диагностировано метастатическое поражение лимфатических узлов шеи. При исследовании с 99mTc-МИБИ лишь в 2 (18,1%) случаях выявлено накопление индикатора в проекции метастатически пораженных лимфатических узлов. При проведении ОЭКТ с 199Tl-хлоридом метастатически пораженные лимфатические узлы удалось визуализировать в 75% случаев. В группе пациентов, которых обследовали повторно после проведения химиотерапии в неоадъювантном режиме, у 16 обследованных визуально отмечалось выраженное снижение накопления индикатора в опухолевой ткани (рис. 3). Этот факт был расценен как положительный эффект лечения, что подтверждалось данными КТ и фиброларингоскопии, при выполнении которых визуально отмечалось уменьшение размеров опухоли. Кроме того, при морфологическом исследовании биопсийного материала у этих больных отмечался лекарственный патоморфоз III-IV степени. При этом индекс о/п уменьшился с 0.66 ± 0.3 до 0.41 ± 0.25 (p<0.05), o/o $-c 0,60\pm0,4$ до 0,42±0,14 (p=0,11), o/c – c $4,93\pm2,87$ до $4,77\pm3,55$ (p=0.88), что свидетельствует о

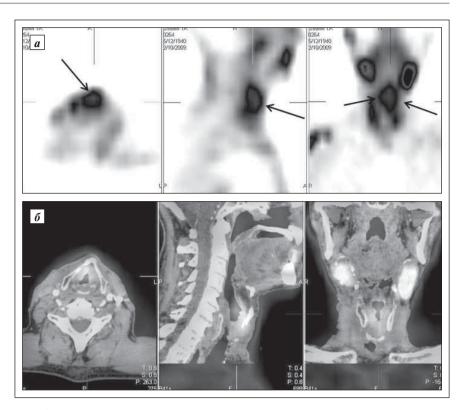


Рис. 2. Сцинтиграмма пациента с диагнозом рака гортани *ТЗN0M0*: а — гиперфиксация индикатора в проекции гортани; б — (стрелка) совмещенное *ОЭКТ-* и *КТ-изображение*

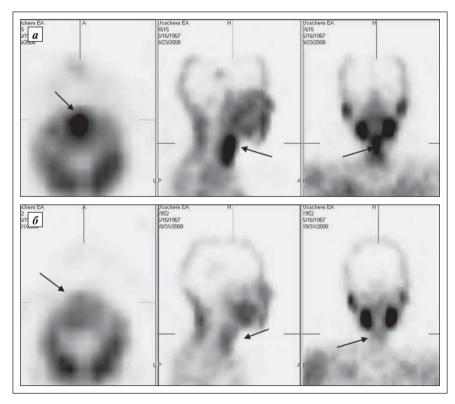


Рис. 3. $O \ni KT c^{99m} Tc$ -МИБИ пациента с диагнозом рака гортани T3N0M0: a- do химиотерапевтического лечения (опухоль обозначена стрелкой): индекс o/n=1,41, o/o=1,77, o/c=5,64; 6- после 2 курсов неоадъювантной химиотерапии (индекс o/n=0,47, o/o=0,61, o/c=4,93)

возможности использования индекса о/п для оценки эффективности неоадъювантной химиотерапии. В 4 случаях интенсивность накопления препарата в проекции опухоли оставалась на исходном уровне или отмечалось некоторое усиление гиперфиксации индикатора, что можно было расценить как прогрессирование процесса (факт подтвердился при контрольной фиброларингоскопии и КТ).

Данное исследование показало, что ОЭКТ с ^{99m}Тс-МИБИ может применяться в диагностике зло-качественных опухолей гортани. Однако необходимо определить место этого метода в диагностическом алгоритме и четко сформулировать показания и противопоказания к его проведению. У преобладающего большинства обследованных нам удалось обнаружить накопление индикатора в проекции новообразования, что свидетельствует о высокой чувствительности метода.

Хотя группа пациентов, получавших химиотерапевтическое лечение, была немногочисленной, в ней четко прослеживалось снижение накопления индикатора в опухоли после химиотерапии: у 80% пациентов — в среднем на 30%.

Согласно результатам наших исследований, ОЭКТ с ^{99m}Тс-МИБИ практически не несет дополнительной информации о состоянии зон регионарного лимфооттока. В большей степени это связано с тем, что физиологическая гиперфиксация РФП в

проекции щитовидной железы экранирует область регионарного лимфатического коллектора. Этого недостатка практически лишен ¹⁹⁹Tl-хлорид, и это позволяет в большем проценте случаев визуализировать метастазы в регионарные лимфатические узлы. Обращает на себя внимание и более интенсивное (в среднем на 22—32%) накопление ¹⁹⁹Tl-хлорида в опухолевой ткани по сравнению с ^{99m}Tc-МИБИ, что может свидетельствовать о более выраженных туморотропных свойствах ¹⁹⁹Tl-хлорида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ОЭКТ с 99тТс-МИБИ может стать не только одним из дополняющих методов диагностики рака гортани и гортаноглотки, но и объективным методом оценки эффективности неоадъювантной химиотерапии. При этом наиболее информативным полуколичественным показателем определения результатов лечения является динамика индекса о/п. Кроме того, в данном исследовании впервые продемонстрирована возможность применения ¹⁹⁹Tl-хлорида для диагностики как первичных, так и рецидивных опухолей гортани. При этом следует отметить, что ОЭКТ с ¹⁹⁹Tl-хлоридом имеет определенные преимущества перед ОЭКТ с 99mTc-МИБИ в диагностике злокачественных опухолей гортани, особенно в визуализации метастазов в регионарные лимфатические узлы.

ЛИТЕРАТУРА

- Лишманов Ю.Б., Чернов В.И., Кривоногов Н.Г. Перфузионная сцинтиграфия с 199П хлоридом в эксперименте // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 1988; №3: 13-6.
- 2. Суркова П.В., Фролова И.Г., Чойнзонов Е.Л., Черемисина О.В., Величко С.А., Чижевская С.Ю., Зельчан Р.В. Возможности спиральной компьютерной томографии в оценке эффективности предоперационной химиотерапии у больных раком гортани и гортаноглотки // Сибирский онкологический журнал. 2011; 2 (44): 39–44.
- 3. Тицкая А.А., Чернов В.И., Слонимская Е.М., Синилкин И.Г. Сравнение результатов маммосцинтиграфии с 99mTc- Технетрилом в планарном и томографическом режиме // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2008; 5: 53–7.
- Тицкая А.А., Чернов В.И., Слонимская Е.М. и др. Маммосцинтиграфия с 99mTc-МИБИ в диагностике рака молочной

- железы // Сибирский медицинский журнал. 2010; 4 (25): 92–5.
- 5. Тицкая А.А., Чернов В.И., Слонимская Е.М., Синилкин И.Г. Маммосцинтиграфия с 1991 в диагностике рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. 2008: 6 (30): 5–10.
- Чернов В.И., Зельчан Р.В., Тицкая А.А., Синилкин И.Г., Чижевская С.Ю., Суркова П.В., Чойнзонов Е.Л. Применение гамма-сцинтиграфии с 99mTc-метоксиизобутилизонитрилом в комплексной диагностике и оценке эффективности неоадъювантной химиотерапии злокачественных опухолей гортани и гортаноглотки // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2011; 2 (56): 38–43.
- Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2011 г. (заболеваемость и смертность). М., ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2012. – 289 с.
- Чиссов В.И., Старинский В.В.,
 Петрова Г.В. Состояние онкологической

- помощи населению России в 2010 г. М., ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2011. – 188 с.
- Keberle M., Kenn W., Hahn D. Current concepts in imaging of laryngeal and hypopharyngeal cancer // Eur Radiol. 2002; 12 (7): 1272–83.
- Koizumi K., Toyama K., Araki T. Uptake of Tc-99m tetrafosmin, Tc-99m MIBI and 201Tl in tumor cell line // J. Nuc. Med. – 1996; 37: 1551–6.
- 11. Komori T., Narabayashi I., Tatsu Y. et al. Evolution of uptake and release of technecium-99m MIBI SPECT of pulmonary and mediastinal lesions // Ann. Nucl. Med. – 1997; 11: 227–32.
- Leitha T., Glaser C., Pruckmayer M. et al. Technetium-99m-MIBI in Primary and Recurrent Head and Neck Tumors: Contribution of Bone SPECT Image Fusion // J. Nucl. Med. – 1999: 38: 1652–7.
- 13. Scopinaro F., Schillaci O., Ussov W. et al. A three center study on the diagnostic accuracyof99mTc-MIBIscintimammography// Anticancer. Res. – 1997; 17: 1631–4.

КОМПЬЮТЕРНО-ТОМОГРАФИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СОПОСТАВЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ОЧАГОВОЙ УЗЛОВОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ ПЕЧЕНИ

У.Н. Туманова^{1, 2}, **Е.А. Дубова**², кандидат медицинских наук, **Г.Г. Кармазановский**¹, доктор медицинских наук, профессор, **А.И. Щеголев**², доктор медицинских наук, профессор ¹Институт хирургии им. А.В. Вишневского МЗ РФ,

 2 Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва **E-mail:** u.n.tumanova@gmail.com, patan777@gmail.com

Спиральная компьютерная томография (CKT) с контрастным усилением позволяет изучить изменения денситометрических показателей в разные фазы исследования и тем самым получить информацию об особенностях васкуляризации очагового образования печени, что лежит в основе дифференциальной диагностики опухолей.

Проведен сравнительный анализ особенностей васкуляризации очаговой узловой гиперплазии (OVI) различного размера при компьютерно-томографическом (KT) и морфологическом исследовании 15 больных (4 мужчин и 11 женщин в возрасте 14—68 лет). На дооперационном этапе всем больным проводили СКТ с болюсным контрастным усилением (по 4 фазам исследования). На гистологических (окрашенных гематоксилином и эозином) и иммуногистохимических (реакция с CD34) препаратах резецированной ткани ОУГ морфометрическими методами определяли количество и суммарную площадь просвета ветвей артерий и синусоидов.

При денситометрическом анализе томограмм установлены изменения средней КТ-плотности ткани ОУГ в зависимости от фазы исследования и размера образования. Практически для всех образований характерен прирост КТ-плотности ткани ОУГ только в артериальную фазу, наиболее выраженный в небольших по размеру опухолях. На гистологических препаратах в малых опухолях определяются наибольшие значения количества и суммарной площади синусоидов, а также наибольшие значения площади поперечного сечения ветвей артерий и общей площади сосудов, характеризующие степень васкуляризации ткани. Напротив, самыми низкими были прирост показателей КТ-плотности, количества синусоидов и степени васкуляризации в крупных опухолях.

Ключевые слова: васкуляризация, компьютерная томография, морфометрия, очаговая узловая гиперплазия

COMPUTED TOMOGRAPHY AND MORPHOLOGICAL COMPARISONS THE DEGREE OF VASCULARIZATION OF FOCAL NODULAR HYPERPLASIA OF THE LIVER

U.N. Tumanova^{1, 2}, E.A. Dubova², G.G. Karmazanovsky¹, A.I. Shchegolev²

¹Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow,

²Academician V.I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Moscow

Spiral computed tomography (CT) with contrast enhancement allows both to study changes of densitometric parameters in different phases of research and to get information about the features of vascularization in the focal formation of liver, which underlies the differential diagnosis of tumors.

There was carried out as well comparative analysis of the characteristics of vascularization of focal nodular hyperplasia (FNH) of different size as computed tomography and morphological study of 15 patients (4 males and 11 females aged 14–68 years). All patients were undergone spiral CT with bolus contrast enhancement (on four phases of the study) preoperatively. With morphometric methods there were determined the number and total area of the lumen of branches of arteries and sinusoids on histological (stained with hematoxylin and eosin) and immunohistochemical (reaction with CD34) preparations of resected tissue from FNH

With the densitometric analysis of tomograms there were established changes of the average CT density of FNH tissue depending on the phase of the research and size of FNH. For almost all the structures the increase CT density of FNH tissue was typical only in the arterial phase, most pronounced in small tumors. On histological preparations they were also determined the highest values of the number and total area of the sinusoids, and the highest values of the cross section of branches of arteries and total area of the blood vessels, which characterize the degree of vascularization of the tissue. The lowest increase of CT density, the number of sinusoids and the degree of vascularization were registered in large tumors.

Key words: vascularization, computed tomography, morphometry, focal nodular hyperplasia

ВВЕДЕНИЕ

Очаговая узловая гиперплазия (ОУГ, фокальная нодулярная гиперплазия — Φ H Γ), согласно современной Международной гистологической классификации опухолей печени [19], относится к группе доброкачественных новообразований печени и занимает 2-е по частоте место. Считается, что ОУГ развивается в условиях локального повышения притока крови в области артериальной мальформации и характеризуется, как правило, бессимптомным течением [15]. Традиционно ОУГ рассматривалась как опухолеподобное поражение без признаков злокачественной трансформации [5], и даже считался возможным регресс заболевания [22]. В этой связи больные с ОУГ подлежат лишь динамическому наблюдению с использованием лучевых методов исследования, желательно неионизирующих [9].

Наиболее четко ОУГ выявляется при компьютерной томографии (КТ) с контрастным усилением. В этом случае анализ томограмм проводится в нативную, артериальную, венозную (портальную) и отсроченную (интерстициальную) фазы, что позволяет изучить изменения денситометрических показателей в разные фазы исследования и тем самым получить информацию об особенностях гемодинамики в очаговом образовании и окружающей паренхиме [1].

При КТ и магнитно-резонансной томографии (МРТ) в большинстве наблюдений ОУГ выявляется как гипо- или изоденсное по отношению к прилежащей ткани печени образование. При больших размерах в ней может выявляться так называемый центральный рубец. В артериальную фазу КТ-исследования наблюдается повышение плотности, свидетельствующее о гиперваскулярном образовании [13]. Однако подобные изменения характерны и для гепатоцеллюлярного рака [2, 4]. Более того, центральный рубец как специфичный признак ОУГ визуализируется в 32—60% наблюдений [11, 12]. А в 20% случаев ОУГ, особенно малых размеров, отмечается атипичная КТ-картина [6].

Цель настоящего исследования: сравнительный анализ особенностей васкуляризации ОУГ различного размера при КТ и морфологическом исследовании.

Таблица 1 КТ-ПЛОТНОСТЬ (ед.Н) ОУГ В ДИНАМИКЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (М±m)

Фаза КТ-исследования				
нативная	артериальная	венозная	отсроченная	
$58,7\pm7,2$	$157,3\pm10,3$	130±6,9	$93,0\pm 9,0$	
48,0±4,8	131,5±16,1	115,3±14,9	84,5±2,6	
$46,3\pm3,4$	$103,8\pm14,7$	$98,9 \pm 10,6$	$73,6\pm4,7$	
	58,7±7,2 48,0±4,8	нативнаяартериальная58,7±7,2157,3±10,348,0±4,8131,5±16,1	нативнаяартериальнаявенозная58,7±7,2157,3±10,3130±6,948,0±4,8131,5±16,1115,3±14,9	

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа основана на клинико-морфологических сопоставлениях у 15 больных (4 мужчин и 11 женщин в возрасте 14—68 лет), оперированных в Институте хирургии им. А.В. Вишневского по поводу ОУГ печени.

На дооперационном этапе всем больным проводилась мультиспиральная компьютерная томография (MCKT) с болюсным контрастным усилением (Philips Brilliance 64 CT). Инъекцию контрастного препарата выполняли с помощью 2-головчатого автоматического инъектора OptiVantage DH (Mallinckrodt; Inc) со скоростью 4 мл/с. Для запуска сканирования использовали программный пакет «bolus tracking» («погоня за болюсом»). Анализировали 4 фазы: нативную, артериальную, венозную, отсроченную. Для получения артериальной и венозной фаз исследования сканирование начинали через 10 и 30 с после достижения порогового контрастирования аорты. Отсроченную фазу изучали у всех пациентов через 4-5 мин после введения контрастного препарата. На полученных КТ-сканах определяли локализацию, размеры, границы и денситометрические показатели паренхимы образования. В зависимости от размеров ОУГ были выделены группы: с малым (<2 см) диаметром (n=3), средним - от 2 до 5 см (n=4) и большим - от 5 до 10 cм (n=8) диаметром.

Полученный после резекции операционный материал подвергали комплексному макро- и микроскопическому исследованию. Гистологическое исследование проводили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования использовали готовые к употреблению моноклональные мышиные антитела к CD34 (клон QBEnd/10) и полимерную систему детекции производства Spring Bioscience. Предварительную демаскировку антигена проводили путем кипячения образцов в растворе цитратного буфера с рН 6,0. Блокирование эндогенной пероксидазы осуществляли обработкой срезов 0,3% раствора перекиси водорода в течение 15 мин. В качестве фонового красителя использовали гематоксилин.

Морфометрический анализ гистологических и ИГХ-препаратов проводили с помощью систе-

мы анализа изображения на базе микроскопа «Axio Imager M1» с использованием программы AxioVision (Carl Zeiss). Определяли количество и суммарную площадь просвета ветвей артерий и синусоидов. Измерение артерий проводилось при малом увеличении микроскопа (×100), синусоидов — при большом (×400). При статистической обработке результатов использован программный

пакет «Statistica 6.0». Рассчитывали среднее значение (М), стандартное отклонение (SD), ошибку среднего (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерными КТ-признаками ОУГ печени в нативную фазу являются четкие контуры и неоднородность структуры образования за счет наличия зоны пониженной плотности, чаще звездчатой формы. При контрастном усилении наблюдается быстрое и интенсивное по всей площади (за исключением зон соединительнотканного рубца) накопление препарата с последующим снижением уровня контрастирования в венозную и отсроченную фазы.

При денситометрии паренхимы ОУГ на томограммах нами установлены изменения средней КТплотности ее ткани в зависимости от фазы исследования и размера образования (табл. 1). Наиболее высокие показатели плотности в нативную фазу отмечаются в малых (диаметром <2 см) ОУГ, превышающие таковые в средних и больших образованиях на 22,3% и 26,8% соответственно (рис. 1). В артериальную фазу наблюдается повышение значений плотности, наиболее выраженное в ткани ОУГ средних размеров (на 164,2% по сравнению с нативной фазой) (рис. 2). В венозную и отсроченную фазы происходит снижение КТ-плотности в ткани ОУГ. Наиболее выраженное снижение при сравнении отсроченной и артериальной фаз отмечено в малых ОУГ (на 33,9%). Наиболее низкие значения плотности в отсроченную фазу наблюдаются в больших образованиях (рис. 3). При этом во всех наблюдениях показатели плотности в отсроченную фазу превышают таковые нативной фазы: наибольшие различия (76,0%) зарегистрированы в ОУГ средних размеров.

Выявленные нами изменения КТ плотности ткани ОУГ в целом соответствуют приводимым в литературе. В большинстве КТ- и МРТ-исследований показано повышение плотности образования в артериальную фазу и снижение — в венозную [10, 18]. Именно благодаря такой динамике чувствительность и специфичность КТ-диагностики ОУГ достигают соответственно 83 и 92% [14].

На основании полученных денситометрических значений ОУГ нами были рассчитаны показатели прироста КТ-плотности в разные фазы исследования, а также максимальный прирост плотности (табл. 2), позволяющие судить об объеме крови, проходящей через сосуды образования и несущей контрастный препарат, а также оценить особенности васкуляризации узла того или иного размера. В расчет принимали только положительные значения изменения плотности при контрастировании, свидетельствующие о притоке крови по сосудистой системе. Отрицательные показатели, свидетельствующие об оттоке, были приняты за 0 и исключены из расчета.

Практически во всех изученных нами наблю-

дениях прирост КТ-плотности ткани ОУГ отмечается только в артериальную фазу, причем в малых опухолях он был на 71,7 и 45,2% больше, чем соответственно в больших и средних образованиях. Небольшой прирост плотности в венозную фазу, отмеченный у 2 пациентов с большими новообразованиями, видимо, может быть связан с наличием

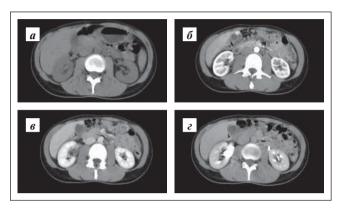


Рис. 1. KT-характеристики малой ОУГ: a — нативная фаза, δ — артериальная, ϵ — венозная, ϵ — отсроченная (здесь и на рис. 2, 3)

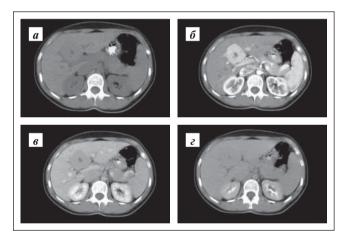


Рис. 2. КТ-характеристики средней ОУГ

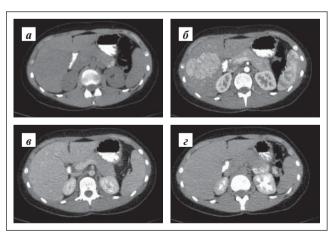


Рис. 3. КТ-характеристики большой ОУГ

соустий между синусоидами ОУГ и окружающей паренхимы печени и, соответственно, поступлением по ним крови. Рассчитанный нами максимальный прирост КТ-плотности в малых ОУГ на 55,2 и 31,3% превышает таковой в опухолях больших и средних размеров. Подобные изменения обусловлены тем, что кровоснабжение и, следовательно, поступление контрастного вещества происходит исключительно по ветвям печеночной артерии.

Действительно, ОУГ представляет собой скопления гепатоцитов и пролиферирующих желчных протоков вокруг аномальной ветви печеночной артерии. Характерные для нормальной ткани печени портальные тракты с ветвями воротной вены в структуре ОУГ отсутствуют. Именно поэтому кровоснабжение образования осуществляется лишь по артериальным ветвям, проходящим в центральном рубце и в отходящих от него фиброзных септах (рис. 4, а, б). В связи с этим при допплеровском исследовании может наблюдаться специфичная картина: крупная приносящая артерия и отходящий от нее

 $\label{eq: 2.1} \mbox{ Таблица 2 } \mbox{ KT-ХАРАКТЕРИСТИКИ ОУГ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗМЕРА (ед.H; M<math>\pm m$)

Диаметр	Прирост КТ-плотности				
ОУГ, см	артериальная фаза венозная фаза		max		
<2	$157,3\pm10,3$	130±6,9	$93,0\pm 9,0$		
2-5	131,5±16,1	115,3±14,9	84,5±2,6		
5-10	$103,8\pm14,7$	$98,9 \pm 10,6$	73,6±4,7		

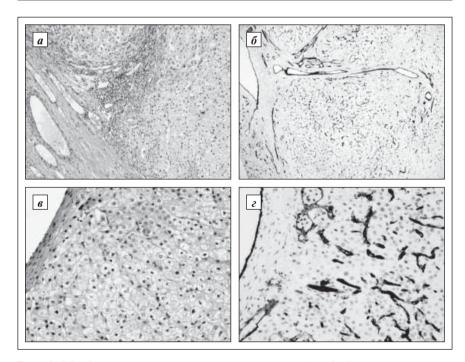


Рис. 4. Морфологические характеристики артерий в фиброзных септах (a, δ) и синусоидов (b, ϵ) в ткани ОУГ: a, b — окраска гематоксилином и эозином, b, ϵ — экспрессия CD34; b, ϵ — ×100, b, ϵ — ×40, b, ϵ — ×200.

звездообразный рисунок. Убедительные данные приводят и Y. Fukukura и соавт. [8]: окрашенный желатин, введенный во время аутопсии в печеночную артерию, появлялся в аномальных артериях, а также в капиллярах и синусоидах ОУГ. В то же время проведение КТ и артериальной портографии не выявило признаков портального кровотока в их структуре.

Согласно проведенным исследованиям, максимальный прирост КТ-плотности в ткани ОУГ нами установлен для образований размером <2 см, а наименьший — в опухолях >5 см. Т.е. малые ОУГ являются более васкулярными, чем большие, что несколько противоречит суждению Р. Виетом и соавт. [7] о сочетанном увеличении размеров ОУГ и росте ее артериального русла.

В этой связи нами было проведено морфометрическое определение количества и суммарной площади просвета артерий и синусоидов в ткани ОУГ на гистологических и ИГХ-препаратах (табл. 3). При микроскопическом изучении препаратов ткани ОУГ в

эндотелии всех приносящих артерий отмечена положительная экспрессия СD34 (рис. 4, б). В связи с этим морфометрия артерий проводилась на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, вне зоны основного центрального рубца. Наибольшее количество артерий в поле зрения наблюдалось в ткани средних опухолей, что соответственно на 24.2 и 5.1% больше значений для малых и больших образований. Суммарная площадь их просветов максимальная также в средних опухолях и превышает аналогичные показатели в малых и крупных узлах соответственно на 3,2 и 31,9%.

При морфометрическом анализе синусоидов на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, установлено, что их количество в поле зрения уменьшается с ростом размеров ОУГ. Так, в малых (диаметром <2 см) образованиях их на 59,8 и 107,4% больше, чем соответственно в средних (от 2 до 5 см) и крупных (>5 см) ОУГ (рис. 4, в). Суммарная площадь синусоидов в поле зрения также имеет наибольшие значения в малых образованиях: на 51,8% выше, чем в средних, и на 110,3% — чем в крупных опухолях.

На основании значений площадей поперечного сечения ар-

терий и синусоидов (при окраске гематоксилином и эозином) нами была определена общая площадь сосудистого русла. Наибольшие ее значения установлены в малых ОУГ, превышающие показатели для средних и больших опухолей соответственно на 33,7 и 82,2%.

При морфометрии ИГХ-препаратов максимальное количество синусоидов с положительной экспрессией CD34 отмечается также в малых узлах (рис. 4, г), а наименьшее — в опухолях среднего размера. Самые большие значения суммарной площади просвета синусоидов зарегистрированы в средних образованиях (превышали показатели в малых и крупных узлах соответственно на 34,0 и 4,2%).

Анализируя данные табл. 3, следует подчеркнуть, что морфометрические показатели синусоидов на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, отличаются от значений, полученных при изучении ИГХ-препаратов с использованием антител к CD34. Основной причиной подобных отличий являются, на наш взгляд, имеющиеся в литературе разногласия по методам морфологического анализа степени васкуляризации тканей.

Действительно, по данным литературы, изучение ангиогенеза и васкуляризации новообразований проводится путем оценки плотности микрососудов, их общей удельной площади, изучения особенностей сосудистого рисунка, а также экспрессии ангиогенных факторов. В свою очередь, плотность микрососудов (microvessel density – MVD) определяется как общее их количество либо как удельная площадь их просвета на определенной площади ткани (в поле зрения микроскопа) [3, 17, 20]. Более того, определение плотности микрососудов рекомендуется проводить методом «горячей точки» (hot spot) [21]. Последний заключается в том, что на препаратах ИГХ-методами выявляют кровеносные сосуды с маркерами эндотелиальных клеток. Под малым увеличением микроскопа определяют участки ткани с максимальной васкуляризацией (наибольшим числом сосудов), в которых затем под большим увеличением производят подсчет их количества в поле зрения.

С учетом подобных разногласий нами определена степень васкуляризации ткани ОУГ путем морфометрического анализа синусоидов и на гистологических, и на ИГХ-препаратах. Определение количества и суммарной площади синусоидов на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, проводили в случайно выбранных полях зрения при большом увеличении микроскопа. При этом исключали поля с участками кровоизлияния, некроза, выраженного стеатоза, а также в области пролиферации желчных протоков и вблизи нее.

При ИГХ-исследовании нами использованы антитела к CD34 (панэндотелиальный маркер, который реагирует с большинством эндотелиальных клеток). Подсчет количества и определение суммарной площади синусоидов на ИГХ-препаратах проводили описанным методом «горячей точки», т.е. в местах максимального числа окрашенных сосудов.

Отметим, что с помощью CD34 выявлялась лишь часть синусоидов. Экспрессия CD34 наблюдалась, как правило, в синусоидах на периферии узелков вблизи от центрального рубца и отходящих от него фиброзных лучей, что согласуется с данными литературы [16]. Данное обстоятельство является, на наш взгляд, основной причиной несоответствия морфометрических показателей синусоидов на гистологических и ИГХ-препаратах.

Действительно, на ИГХ-препаратах морфометрии подвергались лишь синусоиды с положительной экспрессий СD34. Вместе с тем применение данного маркера позволяет выявлять отдельные и небольшие группы эндотелиальных клеток, не различимые при окраске гематоксилином и эозином. Именно поэтому большие значения количества и суммарной площади сосудов получены нами при морфометрии ИГХ-препаратов.

В то же время, характеризуя КТ-семиотику на разных фазах контрастного исследования и морфологические показатели ОУГ, следует подчеркнуть

Таблица 3 КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОСУДОВ В ТКАНИ ОУГ РАЗНОГО РАЗМЕРА ($M\pm m$)

Manyon	Диаметр ОУГ, см	Артерии		Синусоиды		Сосудистое
Маркер		n	S, mkm ²	n	S, mkm ²	русло, мкм ²
	<2	$3,3\pm0,3$	$10356,9\pm942,1$	$27,8\pm2,1$	2065,5±209,0	43404,9±965,0
г-э	2-5	4,1±0,2	10690,9±978,5	17,4±0,6	1360,7±183,3	32461,2±995,0
	>5	$3,9\pm0,2$	8105,1±926,2	$13,4\pm1,0$	982,2±119,1	23830,3±933,8
	<2	_	_	32,2±3,2	2489,1±184,8	_
CD34	2-5	_	_	$28,0\pm1,5$	3334,8±264,5	_
	>5	_	_	31,2±2,5	3201,1±217,3	_

Примечание. n -количество артерий, S -площадь просвета.

определенную их взаимосвязь. Наиболее выраженная зависимость отмечена при сравнении данных морфометрии гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Максимальные показатели прироста КТ-плотности, свидетельствующие о наиболее выраженном кровотоке, установлены для малых образований: на гистологических препаратах в них определяются наибольшие значения количества и суммарной площади синусоидов, а также площади сосудистого русла. Напротив, наименьшие показатели прироста КТ-плотности, количества синусоидов

и степени васкуляризации зарегистрированы в больших опухолях.

Таким образом, проведение СКТ с контрастным усилением позволяет оценить особенности васкуляризации ОУГ. В результате сравнительного исследования установлено, что кровоснабжение опухоли происходит исключительно по ветвям печеночной артерии. По мере увеличения размеров ОУГ отмечается снижение уровня притока крови, что сочетается с уменьшением числа сосудов и площади их просвета в ткани новообразования.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Бурякина С.А., Кармазановский Г.Г. Печеночная гемодинамика и ее роль в болюсном контрастном усилении при диференциальной диагностике образований в печени // Диагностическая и интервенционная радиология. 2011; 4: 103–10.
- 2. Туманова У.Н., Кармазановский Г.Г., Щеголев А.И. Денситометрические характеристики гепатоцеллюлярного рака при спиральной компьютерной томографии // Медицинская визуализация. – 2012; 6: 42–50.
- Białas M., Okoń K., Czopek J. Assessing microvessel density in gastric carcinoma: a comparison of three markers // Pol. J. Pathol. – 2003; 54: 249–52.
- Bolog N., Andreisek G., Oancea I., Mangrau A. CT and MR imaging of hepatocellular carcinoma // J. Gastrointestin. Liver Dis. – 2011; 20: 181–9.
- Bonney G., Gomez D., Al-Mukhtar A. et al. Indication for treatment and long term outcome of focal nodular hyperplasia // HPB. – 2007; 9: 368–72.
- Brancatelli G., Federle M., Grazioli L. et al: Focal nodular hyperplasia: CT findings with emphasis on multiphasic helical CT in 78 patients // Radiology. – 2001; 219: 61–68.
- Buetow P., Pantongrag-Brown L., Buck J. et al. Focal nodular hyperplasia of the liver: radiologic-pathologic correlation // Radiographics. – 1996; 16: 369–88.
- 8. Fukukura Y., Nakashima O., Kusaba A. et al.

- Angioarchitecture and blood circulation in focal nodular hyperplasia of the liver // J. Hepatol. 1998; 29: 470–5.
- Grazioli L., Morana G., Kirchin M., Schneider G. Accurate differentiation of focal nodular hyperplasia from hepatic adenoma at gadobenate dimeglumine-enhanced MR imaging: prospective study // Radiology. – 2005; 236: 166–77.
- Hussain S., Terkivatan T., Zondervan P. et al. Focal nodular hyperplasia: findings at state of the art MR imaging, US, CT, and pathologic analysis // RadioGraphics. – 2004; 24: 3–19.
- Kamaya A., Maturen K., Grace A. et al. Hypervascular Liver Lesions // Semin. Ultrasound. CT MRI. – 2009; 30: 387–407.
- Kehagias D., Moulopoulos L., Antoniou A. et al. Focal nodular hyperplasia: Imaging findings // Eur. Radiol. – 2001; 11: 202–12.
- 13. Lin M., Tsay P., Ko S. et al. Triphasic dynamic CT findings of 63 hepatic focal nodular hyperplasia in 46 patients: Correlation with size and pathological findings // Abdom. Imaging. – 2008; 33: 301–7.
- 14. Luo W., Numata K., Morimoto M. et al. Focal liver tumors: characterization with 3D perflubutane microbubble contrast agent-enhanced US versus 3D contrastenhanced multidetector CT // Radiology. – 2009; 251: 287–95.
- Maillete de Buy Wenniger L., Terpstra V., Beuers U. Focal nodular hyperplasia and hepatic adenoma: epidemiology and

pathology // Dig. Surg. – 2010; 27: 24–31.

16. Ruck P., Xiao J., Kaiserling E. Immunore-activity of sinusoids in hepatocellular carcinoma. An immunohistochemical study using lectin UEA-1 and antibodies against

endothelial markers, including CD34 //

Arch. Pathol. Lab. Med. - 1995; 119: 173-8.

- 17. Sharma S., Sharma M., Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis // Histopathology. 2005; 46: 481–9.
- 18. Šilva A., Evans J., McCullough A. et al. MR imaging of hypervascular liver masses: A review of current techniques // Radio-Graphics. 2009; 29: 385–402.
- Theise N., Curado M., Franceschi S. et al. (Eds.) WHO classification of tumours of the digestive system. – Lyon: IARC, 2010; 205–16
- 20. Tretiakova M., Antic T., Binder D. et al. Microvessel density is not increased in prostate cancer: digital imaging of routine sections and tissue microarrays // Hum. Pathol. – 2012; pii: S0046-8177(12)00228-6.
- 21. Vermeulen P., Gasparini G., Fox S. et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors // Eur. J. Cancer. – 2002; 38: 1564–79.
- **22.** Weinberg A., Finegold M. Primary hepatic tumors of childhood // Human pathol. 1983; 14: 512–37.

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

В.Н. Андреев¹, доктор химических наук, **А.К. Евсеев**², кандидат химических наук, **Г.Р. Гараева**², кандидат химических наук, **М.М. Гольдин**², доктор химических наук, профессор

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва ²Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва **E-mail:** anatolevseev@gmail.com

Разработан электрохимический метод определения уровня антиоксидантов в биологических средах. Сопоставлены данные анализа редокс-потенциала и антиоксидантной активности сыворотки крови у практически здоровых людей (n=31). Исследовано влияние на величину редокс-потенциала растворов альбумина, содержания некоторых антиоксидантов и окислителей. Найдена корреляция величин редокс-потенциала и уровня антиоксидантов сыворотки крови у практически здоровых. Показана возможность применения комплексного анализа для мониторинга состояния пациентов после трансплантации почки.

Ключевые слова: редокс-потенциал, уровень антиоксидантов, сыворотка крови, платиновый электрод, трансплантация

BLOOD SERUM REDOX POTENTIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY COMPARISON

V.N. Andreev¹, A.K. Evseev², G.R. Garaeva², M.M. Goldin²

¹A.N. Frumkin Institute of Physical chemistry and Electrochemistry RAS, Moscow; ²N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow

Electrochemical method of antioxidants level determination in biological media was developed. The comparison of the blood serum redox potential and antioxidant activity for practically health people (n=31) was carried out. The effect of added antioxidants and oxidants to level of human albumin solution redox potential was investigated. Correlation between blood serum redox potential value with antioxidants level for practically health people was found. Simultaneous monitoring of redox potential with antioxidants level in patients after kidney transplantation was done.

Key words: redox potential, antioxidants level, blood serum, platinum electrode, transplantation

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к оценке баланса про- и антиоксидантной систем организма обусловлен возможностями использования этих данных для разработки диагностических и прогностических критериев оценки состояния пациентов с различными патологическими состояниями.

При исследовании баланса про- и антиоксидантной систем внимание, как правило, уделяется оценке одной из них. Общепринятым маркером процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) является малоновый диальдегид [4]. Существуют также методы определения антиоксидантов, которые различаются по типу источника окисления, самого окисляемого соединения и способу его детектирования [7]. Однако большинство из этих методов нельзя использовать для определений в биологических средах, кроме того, несовершенство методов создает трудности при сравнении результатов, полученных разными исследователями [9].

С электрохимической точки зрения, процессы, характерные для про- и антиоксидантной систем, можно описать суммой окислительно-восстановительных ре-

акций [15]. Интегральным отражением окислительновосстановительных процессов, протекающих в организме, является величина редокс-потенциала (РП) биологических сред организма (кровь, плазма крови, сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость и др.) [19]. Суть электрохимического метода определения РП заключается в измерении разности потенциалов между инертным измерительным электродом (платина, золото) и электродом сравнения [2].

Первые попытки измерения РП в биологических средах человека относятся к 1930-м годам [11, 26], однако лишь в конце 60-х годов прошлого века была найдена корреляция РП с некоторыми биохимическими показателями [12, 13, 21, 22]. Поиск корреляций величины РП с указанными факторами продолжается до настоящего времени. Например, корреляция РП с ПОЛ обнаружена в 2006 г. и подтверждена лишь в 2009 г. [14, 16, 20]. К настоящему времени установлены взаимосвязи величины РП с возрастом пациента [25], гипо- и гипертеродными состояниями [17], онкологическими заболеваниями [24], туберкулезом [24], инфекционными заболеваниями [3], геморра-

гическим шоком [6, 27], нейротравмой [19], мультиорганной недостаточностью [23], проведением операции коронарного шунтирования [18], терапией с применением гипербарической оксигенации [1].

Однако несмотря на простоту и достаточно широкое распространение электрохимического метода измерения РП, имеются трудности при проведении измерений в биологических средах. Эти трудности связаны с тем, что в окислительно-восстановительных системах, характерных для биологических сред, необходимо учитывать не только окислительно-восстановительные свойства исследуемой среды, но и состояние поверхности электрода [5].

Таким образом, с помощью измерения величин редокс-потенциалов плазмы и сыворотки крови появляется возможность определять состояние баланса про- и антиоксидантных систем организма и связанных с этим процессов. Данные измерения являются аналитическим инструментом для разработки диагностических и прогностических критериев при мониторинге состояния пациентов с различными патологическими состояниями. Поскольку величина РП, как указано выше, является интегральным показателем, отражающим состояние равновесия между про- и антиоксидантами в организме, представляется полезным параллельно с ее измерением определять также антиоксидантную активность тестируемой среды.

Однако отсутствие унифицированного методического подхода к измерению редокс-потенциала, затрудняет, а порой делает невозможным сопоставление данных, полученных разными авторами. Ранее [15] нами была разработана унифицированная методика электрохимического определения РП.

Целью данного исследования стали разработка электрохимического метода определения уровня антиоксидантов в биологических средах и сопоставление данных одновременных измерений РП и антиоксидантной активности (AOA) сыворотки крови у

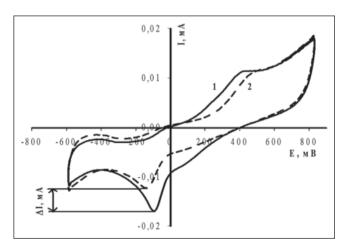


Рис. 1. Вольтамперная кривая смеси n-бензохинон/ гидрохинон: 1 — фоновый раствор; 2 — при добавлении сыворотки крови

практически здоровых людей для выявления влияния уровня антиоксидантов на величину РП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОЛЫ

В работе использованы сульфат натрия (Лабтех, «хч»), сульфит натрия (Лабтех, «хч»), альбумин человеческий (Октафарма, 20% раствор), L-аскорбиновая кислота (Sigma Aldrich, 99%), персульфат натрия (Лабтех, «хч»), п-бензохинон (Диаэм, «ч»), гидрохинон (Мегск, 99%).

Измерения РП проводили, согласно [15], с помощью гладкого поликристаллического платинового электрода с рабочей площадью 3,3 • 10⁻² см², хлорсеребряный электрод использовали в качестве электрода сравнения. Величину РП и ее изменения в течение 30 мин фиксировались в непрерывном режиме с помощью потенциостата IPC-Compact (НПФ «Вольта»). Объем образцов для исследования составлял 2 мл.

Сыворотку крови получали центрифугированием цельной крови практически здоровых людей (n=31) и пациентов после трансплантации почки (n=5) при 1500 об в течение 15 мин в центрифуге CR 3.12 (Jouan).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения АОА тестируемой среды было предложено использовать метод циклической вольтамперометрии. К 4 мл водного раствора медиаторной пары п-бензохинон/гидрохинон (2,5 мМ/2,5 мМ) в фосфатном буфере (рН 7,4) добавляли 1 мл исследуемой пробы. Фиксировали изменение величины спада тока восстановления на поляризационной кривой (рис. 1).

При исследовании РП сыворотки крови 31 практически здорового человека было обнаружено, что величина показателя смещается во времени в отрицательную область (рис. 2). Детальный анализ показал, что зависимость РП от времени является логарифмической [8].

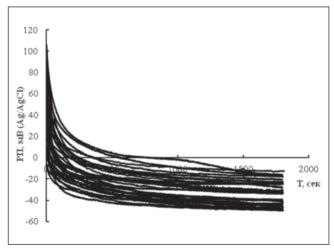


Рис. 2. *РП сыворотки крови 31 практически здорового человека*

Одной из причин сдвига потенциала в отрицательную область может являться адсорбция белков сыворотки крови. Действительно, сообщалось [10] об адсорбции сывороточного альбумина на поверхности платинового электрода. В рамках настоящего исследования обнаружено, что при добавлении альбумина к физиологическому раствору величина РП смещается во времени в область положительных потенциалов (рис. 3). Данные, представленные на рис. 2, указывают, таким образом, на противоположную направленность сдвига РП во времени для сыворотки крови по сравнению с таковой в водных растворах. Следовательно, можно сделать вывод, что сдвиг РП в сторону более отрицательных значений в сыворотке крови не связан с адсорбцией альбумина на поверхности электрода.

Еще одной из причин смещения РП в отрицательную область потенциалов может быть присутствие в сыворотке крови антиоксидантов. Действительно, добавление аскорбиновой кислоты к водным растворам альбумина привело к смещению величины РП в отрицательную область (рис. 4).

Таким образом, можно предположить, что сдвиг РП в отрицательную область значений связан с наличием в сыворотке крови антиоксидантов. Чтобы проверить это утверждение, было решено нейтрализовать действие антиоксидантов сыворотки крови с помощью добавок оксиданта к сыворотке крови. Было показано, что добавление к сыворотке крови персульфата натрия обусловливает отсутствие сдвига величины РП, а более высокие его концентрации приводят к сдвигу величины РП в область положительных значений потенциала (рис. 5). Приведенные данные доказывают, что величина РП действительно отражает состояние баланса про- и антиоксидантной систем организма.

Далее были измерены величины РП и AOA в образцах сыворотки крови 31 практически здорового человека. Сравнение полученных данных (рис. 6) по-

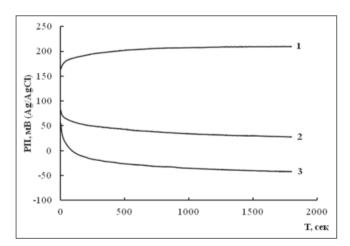


Рис. 4. РП 10% раствора альбумина от концентрации аскорбиновой кислоты: 1 -исходный раствор; $2 - 5,7 \cdot 10^{-4}$ M аскорбиновой кислоты; $3 - 2,8 \cdot 10^{-3}$ M аскорбиновой кислоты

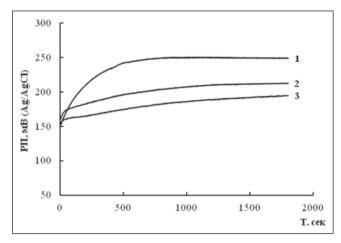


Рис. 3. Зависимость РП растворов альбумина от концентрации: 1-0.9% NaCl, 2-10% раствора альбумина, 3-20% раствора альбумина

казало, что во всех случаях направление и величина сдвига РП совпадают с таковыми АОА, что свидетельствует о непосредственной связи РП с уровнем АОА биологической среды. На основании этих данных также можно выделить области величин РП и АОА, соответствующие коридорам референсных значений уровня антиоксидантов и величин РП плазмы у практически здоровых людей.

Важно было выяснить вопрос о связи уровня антиоксидантов с патологическими состояниями различной этиологии. Особый интерес представляют пациенты после трансплантации органов, которые постоянно находятся на поддерживающей терапии иммуносупрессивными препаратами.

При исследовании пациентов после трансплантации почки было выявлено, что, как правило, РП коррелирует с AOA сыворотки крови. Однако в ряде случаев была обнаружена противоположная динамика.

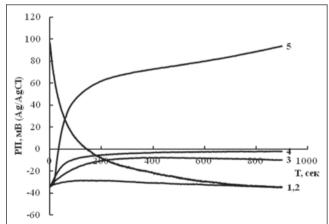


Рис. 5. Влияние добавок персульфата натрия на РП сыворотки крови. 1- сыворотка крови, $2-10^6$ М $Na_2S_2O_8$, $3-10^5$ М $Na_2S_2O_8$, $4-10^4$ М $Na_2S_2O_8$, $5-10^3$ М $Na_2S_2O_8$

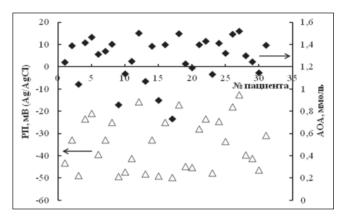


Рис. 6. Сравнение РП (обозначено треугольниками) и AOA (ромбы) у практически здоровых обследованных (n=31)

Так, у пациента С. (рис. 7) с 8-х по 12-е сутки обнаружено смещение РП в отрицательную область потенциалов, что сопровождалось падением АОА. Возможно, данное явление связано с проводимым в послеоперационном периоде лечением. Подобные наблюдения могут сигнализировать о дисбалансе функционирования АОА и прооксидантной систем пациента и необходимости коррекции его лечения. Обнаруженный эффект требует дополнительных исследований.

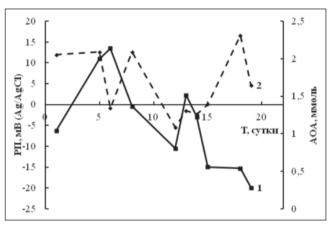


Рис. 7. Данные РП (1) и AOA (2) сыворотки крови паииента С. с трансплантированной почкой

выводы

- 1. Разработан электрохимический метод определения АОА биологических сред с использованием медиаторной пары п-бензохинон/гидрохинон.
- 2. Обнаружена корреляция величин РП и уровня антиоксидантов сыворотки крови у практически здоровых людей.
- 3. Предположено, что отсутствие корреляции величин РП и содержания антиоксидантов в сыворотке крови пациентов после трансплантации почки может быть связано с необходимостью коррекции лечения.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Гольдин М.М., Ромасенко М.В., Евсеев А.К., Левина О.А., Петриков С.С., Алещенко Е.И., Крылов В.В. Оценка эффективности использования гипербарической оксигенации при острой церебральной патологии с помощью электрохимической методики // Нейрохирургия. – 2010; 4: 33–9.
- Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Цирлина Г.А. Электрохимия. – М.: Химия, Колосс, 2008, 672 с.
- 3. Джикия И.В., Рижвадзе М.А., Джангидзе М.А. Окислительно-восстановительный потенциал крови и состоятельность системы энергообеспечения при цитомегаловирусной инфекции у беременных // Georgian medical news. 2006; 5 (134): 28–31.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006, 556 с.
- 5. Михаэлис Л. Окислительновосстановительные потенциалы и их физиологическое значение. Под ред. Скадовского С.Н., М.: ГХТИ, 1932, 160 с.
- 6. Серов В.И. Изменения кровотока, напряжения и диффузии кислорода, окислительновостановительного потенциала в коре головного мозга при геморратическом шоке и гипербарической оксигенации // Бюллетень гипербарической биологии и медицины. Воронеж: Воронеж, гос. мед. акад. 1994; 2: 5-9.
- Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. – 2004; 3: 63–75.
- Хубутия М.Ш., Евсеев А.К., Чжао А.В., Александрова И.В., Гольдин М.М., Салиенко А.А. Мониторинг редокс потенциала сыворотки крови для диагностики осложнений при лечении пациентов с трансплантированной печенью // Транс-

- плантология. 2012; 1–2: 60–4.
- Яшин Я.И., Яшин А.Я. Проблема определения содержания антиоксидантов // Компетентность. 2009: 69 (8): 50–53.
- Anzai J., Guo B., Osa T. Electrochemically accelerated adsorption of serum albumin on the surface of platinum and gold electrodes // Chem Pharm Bull (Tokyo). – 1994; 42 (11): 2391–3.
- Bembe C., Dietrich S. Zur Messung oxydoreductiver Potentiale im Blut // Zeitschrift für Die Gesamte Experimentelle Medizin. – 1941; 109: 546–65.
- 12. Bernard C., Gallinet J., Conde C. et al. Interrelation between the blood redox potential and exercise induced variations of the biochemical characteristics of blood // Bioelectrochemistry and Bioenergetics. – 1991; 25: 45-70.
- Grosz H., Farmer B. Reduction–Oxidation Potential of Blood as a Function of Partial Pressure of Oxygen // Nature. – 1967; 213 (5077): 717–8.
- **14.** Kolls J. Oxidative stress in sepsis: a redox redux // J. Clin. Invest. 2006; 116 (4): 860–3.
- Khubutiya M., Evseev A., Kolesnikov V. et al. Measurements of Platinum Electrode Potential in Blood and Blood Plasma and Serum // Russian J. of Electrochemistry. – 2010; 46 (5): 537–41.
- 16. Margină D., Grădinaru D., Mitrea N. Development of a potentiometric method for the evaluation of redox status in human serum // Revue Roumaine de Chimie. – 2009; 54 (1): 45-8.
- Marmasse C., Grosz H. Direct Experimental Evidence of a Functionally Active Electron Transport System in Human Blood // Nature. -1964; 202 (4927): 94.
- Rae S., Palazzo R., Metz H. et al. Redox Potential Measurements of Plasma in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft and Its Clinical Significance // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 1997; 38: 151–6.

- Rael L., Bar-Or., Mains C. et al. Plasma Oxidation-Reduction Potential and Protein Oxidation in Traumatic Brain Injury // J. of neurotrauma. – 2009; 26: 1203–11.
- 20. Rael L., Bar-Or., Salottolo K. et al. Injury severity and serum amyloid A correlate with plasma oxidation-reduction potential in multitrauma patients: a retrospective analysis // Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine. – 2009; 17: 57.
- Rael L., Bar-Or, Aumann R. et al. Oxidationreduction potential and paraoxonasearylesterase activity in trauma patients // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2007; 361: 561–5.
- 22. Taniguchi S. The significance of arterial redox potential measurement by Vincent's method in evaluating the hemorrhagic shock state of rabbits // Masui. – 1993; 42 (3): 387–93.
- Taniguchi S., Kodama K., Matsuyama H. et al. Contribution of Arterial redox potential measurement to the care of critically ill patients // J. of Anesthesia. – 1987; 1 (2): 125–31
- 24. The Redox Potential of the Blood in Vivo and in Vitro / Ziegler E. – Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publisher. – 1965; 196.
- Van Rossum J., Schamhart D. Oxidationreduction (redox) potentiometry in blood in geriatric conditions: A pilot study // Experimental Gerontology. – 1991; 26 (1): 37–43.
- Waterman N. Ueber Aenderungen des Redoxpotentials im Serum durch Röntgenbestrahlung // Z. Krebsforsch. – 1933; 38; 301.
- 27. White N., Collinson M., Boe R. et al. Redox Monitoring Reveals Increased Susceptibility of Whole Blood to Oxidative Stress During Hemorrhagic Shock // Circulation (Resuscitation Science Symposium). – 2008; 118:S 1488, Abstract 198.

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Н.В. Боровкова, доктор медицинских наук, **И.В. Александрова**, доктор медицинских наук, **В.В. Валетова**, кандидат медицинских наук, **Е.Н. Кобзева**, кандидат медицинских наук

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

E-mail: Borovkovanv@vandex.ru

C целью оценки содержания апоптотических лимфоцитов венозной крови в норме и при патологии обследованы 40 первичных доноров, 14 пострадавших с закрытой травмой живота, осложнившейся острой кровопотерей не менее 30% объема циркулирующей крови, и 49 пациентов с сепсисом. Относительное количество лимфоцитов крови на ранних и поздних стадиях апоптоза определяли с помощью Annexin V-FITC/7AAD Kit (Beckman Coulter). Выявлено, что физиологический уровень лимфоцитов венозной крови, вступающих в апоптоз, составляет $2,74\pm0,23\%$, лимфоцитов, погибших в результате апоптоза, $-0,08\pm0,01\%$. Массивная кровопотеря у пострадавших приводит к увеличению концентрации лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели, что обусловлено гипоксией. У пациентов с сепсисом отмечается усиление апоптоза лимфоцитов, что коррелирует с тяжестью состояния больных, оцениваемого по шкале APACHE II, а содержание клеток, уже погибших в результате апоптоза, -c исходом заболевания. Определение концентрации апоптотических лимфоцитов в венозной крови у пострадавших с массивной кровопотерей и у больных с сепсисом может быть использовано для прогноза течения и исхода заболевания.

Ключевые слова: апоптоз лимфоцитов, сепсис, массивная кровопотеря

BLOOD LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN NORM AND PATHOLOGY

N.V. Borovkova, I.V. Aleksandrova, V.V. Valetova, E.N. Kobzeva Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow

With the purpose to determine the content of apoptotic lymphocytes of venous blood in norm and pathology there were examined 40 primary donors of blood, 14 patients with closed abdominal trauma complicated by acute blood loss of at least 30% of circulating blood volume and 49 patients with severe sepsis. The relative amount of lymphocytes in the early and late stages of apoptosis was determined with the use of Annexin V-FITC/7AAD Kit (company Beckman Coulter). It is revealed, that a physiological level of lymphocytes of venous blood, entering in apoptosis, accounts for $2,74\pm 0,23\%$, lymphocytes, died as a result of apoptosis $-0,08\pm 0,01\%$. Massive blood loss in victims leads to an increase in the concentration of lymphocytes entering into the process of apoptotic death that is caused by hypoxia.

In patients with sepsis there is noted an enhancement of lymphocyte apoptosis, which correlates with the severity of the condition of the patients, assessed on a scale of APACHE II, and the content of the cells have already died as a result of apoptosis — with the outcome of the disease. Determination of the concentration of apoptotic lymphocytes in the venous blood in patients with massive blood loss and in patients with sepsis can be used for predicting the course and outcome of the disease.

Key words: blood lymphocyte apoptosis, sepsis, massive blood loss

ВВЕЛЕНИЕ

Под апоптозом понимают активный программируемый процесс, приводящий к элиминации клеток из организма [1, 3–5]. Выделяют 3 фазы апоптоза: начальную, эффекторную и фазу деградации [3, 5]. В начальную фазу клетка получает сигнал, запускающий процесс, в эффекторную – активируются механизмы апоптоза, но процесс остается обратимым. В фазу деградации изменения необратимы, и клетка подвергается дезинтеграции. Продолжительность апоптоза занимает от 12 до 24 ч [2, 3, 5].

В наиболее яркой и массовой форме апоптоз реализуется в процессе развития лимфоцитов. Покоящиеся зрелые лимфоциты апоптозу не подвержены. Однако они становятся чувствительными к индук-

ции апоптоза после активации. По этому механизму гибнут основная часть лимфоцитов в процессе развертывания иммунного ответа и все эффекторные клетки после завершения выполнения своих функций. Таким образом, в иммунной системе апоптоз играет важную роль. В период становления и развития клеток апоптоз служит регулятором численности клеточных популяций и фактором их селекции. С помощью апоптоза осуществляется контроль интенсивности иммунного ответа и элиминации уже «отработавших» эффекторных клеток. Апоптоз лимфоцитов также служит основным регуляторным механизмом, препятствующим появлению в организме аутореактивных и злокачественных клонов [5].

В то же время появляется все больше работ, посвященных участию апоптоза иммунокомпетент-

ных клеток в развитии синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) и сепсиса [6, 7, 10, 11, 14]. Возникновение апоптоза при сепсисе было доказано в экспериментах на животных; наряду с другими факторами его считают ответственным за тяжесть течения заболевания [6, 10, 11, 14]. Одним из механизмов, запускающих апоптоз лимфоцитов у септических больных, является действие глюкокортикоидов, концентрация которых увеличивается вследствие стресса. Кроме того, выявлено, что апоптотические клетки индуцируют выработку противовоспалительных цитокинов, что приводит к снижению ответа на патоген, т.е. индуцирует анергию. Несмотря на то, что в настоящее время исследованию апоптоза у больных уделяется много внимания, данные о содержании апоптотических лимфоцитов в циркулирующей крови больных с хирургическими заболеваниями и с хирургическим сепсисом мало-

Цель настоящего исследования — оценить содержание апоптотических лимфоцитов венозной крови доноров, пациентов с закрытой травмой живота, осложненной кровопотерей и сепсисом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование апоптоза проведено в нескольких группах. Обследованы 40 первичных доноров крови в возрасте от 20 до 45 лет до и после кроводачи, а также 14 пострадавших (12 мужчин и 2 женщины; средний возраст 37±4,6 года) с закрытой травмой живота, осложнившейся острой кровопотерей на догоспитальном этапе (не менее 30% объема циркулирующей крови). Суммарная кровопотеря составила 2643±290 мл на 1 больного, тяжесть травмы по ISS - от 17 до 35 баллов. Пациенты оперированы в экстренном порядке. Анестезия была стандартной (кетамин, фентанил, нимбекс в рекомендованных дозировках), больным проводили искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) с высокими фракциями кислорода (0,8-1,0). Интраоперационная инфузионно-трансфузионная терапия включала коллоидные и кристаллоидные среды, свежезамороженную плазму, донорские эритроциты и клеточный компонент аутокрови, получаемый с помощью интраоперационной аппаратной реинфузии на непрерывной аутотрансфузионной системе CATS (Fresenius). Тканевый метаболизм во время операции в динамике оценивали по газам и показателям кислотно-основного состояния артериальной и смешанной венозной крови, уровню лактата, гликемии, содержанию калия и натрия в плазме крови. Исследование апоптоза проводили при поступлении в операционную, на момент хирургической остановки кровотечения и в конце операции. Общая продолжительность послеоперационного наблюдения пострадавших составила 28±6 койко-дней.

Течение основного заболевания у 49 пациентов

(38 мужчин и 11 женщин в возрасте от 25 до 64 лет) осложнилось развитием сепсиса: в связи с тяжелой сочетанной травмой (у 15), перитонитом (13), тяжелым острым панкреатитом (8), острым гнойным медиастинитом (10), другими причинами (3). Наличие сепсиса и выраженность ССВР определяли на основании критериев ACCP/SCCM [8]. Тяжесть состояния больных оценивали по шкале АРАСНЕ II [12], тяжесть органной недостаточности - по шкале SOFA [15]. Комплекс лечебных мероприятий больных сепсисом включал хирургическую санацию очага инфекции. В послеоперационном периоде проводили продленную ИВЛ, деэскалационную антибактериальную терапию, нутритивную поддержку, иммуномодулирующую терапию, применяли экстракорпоральные методы гемокоррекции. Средняя длительность пребывания больных в стационаре составила 63,7±42,5 сут. Из 49 больных умерли 13. Основной причиной смерти были септический шок и полиорганная недостаточность. Исследование апоптоза проводили в момент постановки диагноза «сепсис» и затем через 3 и 7 сут.

Относительное количество апоптотических лимфоцитов крови определяли с помощью Annexin V-FITC/7AAD Kit (фирма Beckman Coulter). На ранней стадии апоптоза целостность клеточной мембраны сохраняется, однако происходит перестройка ее фосфолипидных компонентов, и на поверхности клетки появляется фосфатидилсерин. Аннексин V способен связываться фосфотидилсерином в присутствии кальция. Одновременное окрашивание клеток витальным ДНК-специфичным красителем 7 аминоактиномицина D (7AAD) позволяло отдифференцировать клетки на ранних стадиях апоптоза (Annexin $V^+/7AAD^-$, ранний апоптоз) от клеток, уже погибших в результате апоптоза (Annexin $V^+/7AAD^+$, поздний апоптоз) [9, 13].

Статистическую обработку материала проводили с помощью статистического пакета IBM SPSS Statistics 19 (IBM Inc., USA). Определяли среднюю величину (М), среднее квадратичное отклонение (δ) и стандартную ошибку средней величины (т). С помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка выявлено, что распределение количественных признаков не отличалось от нормального, поэтому показатели представлены в виде М±т. При сравнении количественных признаков использовали коэффициент Стьюдента. Корреляционные связи между показателями оценивали с помощью критерия Пирсона. Качественные признаки также оценивали с помощью критерия χ2 (приведены значения критерия, его двусторонняя значимость). Вычисляли относительный риск смерти (OR), для чего применяли регрессионную модель Кокса с пропорциональными рисками. В качестве порогового уровня статистической значимости принято значение вероятности p=0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Относительное содержание апоптотических лимфоцитов (Annexin $V^+/7AAD^-$) у 40 доноров варьировало в широком диапазоне: от 0,6 до 9,2%. Распределение доноров по содержанию в венозной крови лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза представлено на рис. 1. Кривая распределения доноров имела 2 пула. У 34 (83%) доноров количество лимфоцитов, вступающих в апоптоз, регистрировалось в пределах 0.6-5.5% (в среднем $-2.74\pm0.23\%$), у 7 (17%) обследованных оно было повышено и варьировало от 6,4 до 9,2% (в среднем $8,17\pm0,35\%$). Феномен апоптоза является результатом действия различных факторов: неспецифических (температура, свободные радикалы, гипоксия, УФ-излучение) и специфических (глюкокортикоиды и др.). Полагаем, повышенное содержание апоптотических лимфоцитов у 17% доноров обусловлено эмоциональным стрессом на предстоящую кроводачу или воздействием других факторов, индуцирующих апоптоз. Таким образом, за физиологический уровень в венозной крови лимфоцитов, вступающих в апоптоз, мы приняли $2,74\pm0,23\%$ клеток. У 7 доноров выявлено повышенное содержание апоптотических лимфоцитов, и у 3 человек - пониженное.

Для оценки влияния кроводачи на уровень апоптотических лимфоцитов в венозной крови обследованы 13 доноров крови. Выявлено, что у 5 из них содержание лимфоцитов, вступающих в апоптоз, увеличивалось с 2,8 до 4,5% клеток, тогда как у 7 доноров повышенное до кроводачи относительное количество апоптотических лимфоцитов (6,2%) понизилось после нее до 3,8%. Таким образом, при физиологическом уровне апоптоза лимфоцитов даже незначительная потеря крови (не более 450 мл) при кроводаче в 38 % случаев сопровождается их активацией и увеличением доли апоптотических клеток. Напротив, лимфоциты на ранних стадиях апоптоза могут эффективно элиминироваться из организма во время кроводачи при изначально повышенном их содержании в крови.

Содержание уже погибших лимфоцитов (Annexin V⁺/7AAD⁺) в венозной крови доноров было незначительным и варьировало от 0.01 до 0.12%, (в среднем $0.08\pm0.01\%$). Кроводача не вызывала каких-либо изменений в содержании лимфоцитов, находящихся на поздних стадиях апоптоза.

Массивная кровопотеря у пострадавших также сопровождалась увеличением содержания апоптотических лимфоцитов. При поступлении у всех пациентов имелись убедительные гемодинамические признаки гиповолемии: частота сердечных сокращений (ЧСС) 106 ± 2.7 в мин, среднее АД 75 ± 1.3 мм рт.ст., центральное венозное давление (ЦВД) 0.5 ± 0.09 мм рт.ст., а также анемии средней тяжести (содержание гемоглобина — Нь 84 ± 8.7 г/л, гематокрит — Ht $25.9\pm2.72\%$). Снижение транспорта кис-

лорода при поступлении сопровождалось венозной гипоксемией — PvO_2 был ниже референтных значений и составлял $41,9\pm4,24$ мм рт.ст. Повышались уровень лактата (до $4,18\pm0,94$ ммоль/л) и гликемия (до $9,13\pm0,97$ ммоль/л). Концентрация лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели, на момент поступления превышала нормальные значения и составила $6,87\pm1,24\%$ (норма — $2,74\pm0,23\%$). Среднее содержание лимфоцитов, уже погибших в результате апоптоза, соответствовало значениям физиологической нормы. Установлено, что у пострадавших с массивной острой кровопотерей высокое содержание лимфоцитов, находящихся в позднем апоптозе, коррелирует (r=0,812; p=0,008) с длительностью пребывания в стационаре.

На момент остановки кровотечения активная инфузионная терапия и начало компенсации утраченных эритроцитов сопровождались стабилизацией показателей гемодинамики, уровня Hb (91±5,8 Γ/π) и Ht (27,6±1,67%), однако существенного улучшения показателей тканевого метаболизма не произошло. Сохранялась венозная гипоксемия (PvO $44,3\pm3,23$ мм рт.ст.), гипергликемия $(8,83\pm0,55)$ ммоль/л) и гиперлактатемия $(4,63\pm1,17 \text{ ммоль/л})$. К моменту остановки кровотечения концентрация лимфоцитов на стадии раннего апоптоза составляла $7,33\pm0,81\%$. Усиленный апоптоз иммунокомпетентных клеток можно связать со стресс-реакцией (повышением уровня эндогенных глюкокортикоидов и(или) их введением). Неспецифическим индуктором апоптоза у пострадавших с массивной острой кровопотерей могла служить гипоксия вследствие указанной кровопотери. Это подтверждает достоверная обратная корреляция содержания в венозной крови лимфоцитов на ранних стадиях апопто-

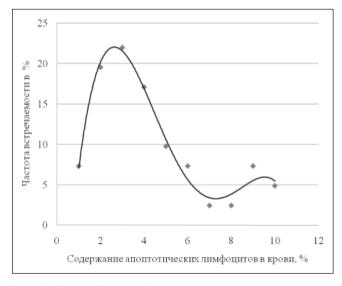


Рис. 1. Распределение доноров крови в зависимости от содержания в венозной крови лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели

за с уровнем Hb (r=-0.65; p=0.016) и Ht (r=-0.67; p=0.014).

Всего за время операции было введено 5610±161 мл на 1 больного инфузионных и трансфузионных сред. Своевременная хирургическая остановка кровотечения и адекватное интраоперационное восполнение гиповолемии способствовали стабилизации гемодинамики у большинства пациентов. Отмечена тенденция к повышению PvO до 47,2±5,1 мм рт.ст., дальнейшему росту гликемии $(10,99\pm1,74 \text{ ммоль/л})$ и содержания лактата $(4,8\pm0,96)$ ммоль/л). Таким образом, несмотря на проводимую терапию, компенсацию утраченных эритроцитов и восстановление нормоволемии у большинства больных, к концу операции сохранялись биохимические маркеры тканевой ишемии. Содержание лимфоцитов в раннем и позднем апоптозе в этот период было повышенным и составляло соответственно 11,05±3,76 и 0,65±0,14%. При этом в раннем послеоперационном периоде высокую концентрацию иммунокомпетентных клеток на ранних стадиях апоптоза можно рассматривать как физиологическую реакцию на травматический шок и кровопотерю. Так, при высокой концентрации апоптотических лимфоцитов (от 15 до 30%) у 3 пациентов длительность пребывания в стационаре составила в среднем 12,3 дня, тогда как при уровне апоптоза от 2,5 до 3,5% лимфоцитов у 3 больных она возросла до 29 дней за счет развития гнойносептических осложнений.

Таким образом, у пострадавших с массивной кровопотерей на фоне развития гипоксемии усиливается апоптоз лимфоцитов венозной крови, что можно рассматривать как физиологическую реакцию на травматический шок и кровопотерю. При этом концентрацию лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза

мы предлагаем использовать в качестве прогностического критерия неблагоприятного течения послеоперационного периода.

Известно, что одним из ведущих патогенетических механизмов, способствующих дефициту лимфоцитов у больных с сепсисом, является апоптотическая гибель клеток [1, 7, 10, 11]. Обследованы 49 пациентов, у которых на основании критериев АССР/ SCCM диагностирован сепсис. Тяжесть состояния пациентов по шкале APACHE II составила $21,1\pm4,8$ балла; тяжесть органной дисфункции по шкале SOFA $-8,6\pm4,2$ балла, выраженность ССВР $-3,2\pm0,4$ балла, что свидетельствовало о наличии у больных полиорганной дисфункции и выраженного системного воспаления.

На момент постановки диагноза сепсиса содержание в венозной крови лимфоцитов, на ранних стадиях апоптоза, возрастало до 7,41±0,67% (норма $2,74\pm0,23\%$). При этом выявлена корреляционная зависимость (r=0,396; p=0,023) между содержанием лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза и тяжестью состояния больных, оцениваемого по шкале АРАСНЕ II. Концентрация апоптотических лимфоцитов в венозной крови у выживших пациентов была несколько ниже $(6,7\pm0,7\%)$, чем у умерших $(8,8\pm1,3\%)$. Проведенный анализ с построением регрессионной модели Кокса позволил установить, что при увеличении концентрации лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза в венозной крови больных с сепсисом риск смерти достоверно возрастал (OR=1,33). На момент постановки диагноза сепсиса в венозной крови больных концентрация лимфоцитов, уже погибших в результате апоптоза, также возрастала и составляла 0,58±0,15%. У выживших пациентов этот показатель варьировал от 0.03 до 1.14% (в среднем 0.22 ± 0.06), а у умерших —

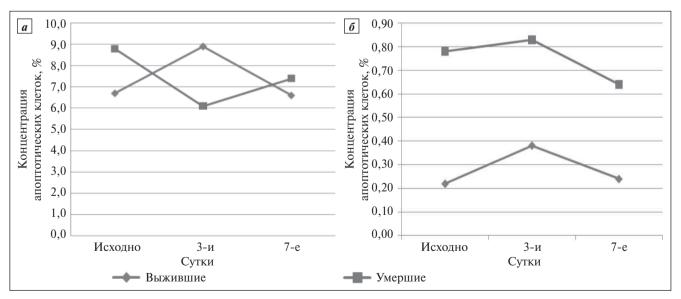


Рис. 2. Динамика показателей концентрации лимфоцитов, на ранних (а) и поздних (б) стадиях апоптоза в венозной крови больных с сепсисом

от 0,2 до 3,52% (в среднем $0,78\pm0,25\%$; рис 2, 6). Выявлена корреляция между концентрацией погибших лимфоцитов в крови и исходом заболевания (r=0,311; p=0,024).

Через 3 сут на фоне проводимого лечения у выживших пациентов отмечалось увеличение содержания в крови лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза до $8,9\pm0,9\%$. У умерших пациентов, наоборот, оно имело тенденцию к снижению до $6,1\pm1,0\%$ (рис. 2, a). Концентрация лимфоцитов на поздних стадиях апоптоза существенных изменений не претерпевала (рис. 2, 6). К 7-м суткам наблюдения содержание апоптотических лимфоцитов в венозной крови выживших пациентов возвращалось к исхолным значениям.

Одним из потенциальных механизмов апоптоза лимфоцитов у больных с сепсисом является активация клеток бактериальными агентами в условиях, при которых не может быть реализован полный активационный сигнал [4, 5]. Усиленный апоптоз лимфоцитов также может быть обусловлен неспецифическими факторами, такими, как температура, бактериальные токсины, гипоксия, оксиданты, свободные радикалы и др. При этом развитие апоптоза или некроза клеток зависит от интенсивности их воздействия. В настоящем исследовании отмечено, что у больных с сепсисом возрастает не только количество клеток, вступающих в процесс апоптотической гибели, но и значительно увеличивается содержание уже погибших лимфоцитов.

Таким образом, сочетанное действие неспецифических (температура, бактериальные токсины и др.) и специфических (недостаток ростовых факторов, повышение концентрации ряда цитокинов и др.)

индукторов апоптоза приводит к увеличению концентрации апоптотических лимфоцитов в венозной крови пациентов с сепсисом.

Повышение содержания лимфоцитов на разных стадиях апоптоза отражает степень тяжести состояния, оцениваемого по шкале APACHE II, и служит предвестником неблагоприятного исхода заболевания.

выволы

- 1. Физиологический уровень лимфоцитов венозной крови, вступающих в апоптоз, составляет $2,74\pm0,23\%$, лимфоцитов, погибших в результате апоптоза, $-0,08\pm0,01\%$.
- 2. Массивная кровопотеря (2643 ± 290 мл) у пострадавших приводит к увеличению концентрации лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели, до $6.87\pm1.24\%$, что обусловлено гипоксией. Выявлена корреляция между содержанием в венозной крови лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза и уровнем Hb (r=-0.65; p=0.016) и Ht (r=-0.67; p=0.014).
- 3. У пациентов с сепсисом отмечается усиление апоптоза лимфоцитов, при этом концентрация клеток на ранних стадиях апоптоза возрастает до $7,41\pm0,67\%$ и коррелирует (r=0,396; p=0,023) с тяжестью состояния больных, оцениваемого по шкале APACHE II, а содержание клеток, уже погибших в результате апоптоза, с исходом заболевания.
- 4. Определение концентрации апоптотических лимфоцитов в венозной крови у пострадавших с массивной кровопотерей и у больных с сепсисом может быть использовано для прогноза течения и исхода заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Аруин Л.И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения // Клиническая медицина. 2000; 78 (1): 5–10.
- 2. Боровкова Н.В., Хватов В.Б., Александрова И.В. и др. Апоптоз мононуклеаров и содержание погибших лейкоцитов в венозной крови больных с сепсисом // Вестн. РАМН. – 2009; 8: 33–6.
- Князькин И.В. Апоптоз в онкоурологии. -СПб: Наука, 2007. – 240 с.
- 4. Пальцев М.А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук // Вестн. РАН. 2002; 72 (1): 13–21.
- Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. – 608 с.
- Antonopoulou A., Raftogiannis M., Giamarellos-Bourboulis E. et al. Early apoptosis of blood monocytes is a determinant of survival in experimental sepsis by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa // Clin. Exp. Immunol. 2007; 149 (1): 103–8.
- 7. Bommhardt U., Chang K.C., Swanson P.E.

- et al. Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis // J. Immunol. – 2004; 172 (12): 583–91.
- Bone R., Sibbald W., Sprung C. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure // Chest. – 1992; 101 (6): 1481-3.
- Darzynkiewicz Z. at al. Methods for analisis of apoptosis by flow cytometry // Manual of Clinical Laboratory Immunology, B. Deetrick Eds. N. Roes at al. – ASM PRESS, Washington. – 1997. – P. 334–45.
- 10. Giamarellos-Bourboulis E., Routsi C., Plachouras D. et al. Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock? // Crit. Care. 2006; 10 (3): 76.
- Hotchkiss R., Tinsley K., Karl I. Role of apoptotic cell death in sepsis // Scand J. Infect Dis. – 2003: 35 (9): 585–92.
- Knaus W., Draper E., Wagner D. Zimmerman APACHE II: a severity of disease classification system // Crit. Care Med. – 1985; 13

- (10): 818-29.
- 13. Lecoeur H., Leudu E., Prevost M. et al. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods // J. of Immunological Methods. – 1997; 209 (2): 111–23.
- 14. Papathanassoglou E., Moynihan J., Ackerman M. Does programmed cell death (apoptosis) play role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework // Crit. Care Med. 2000; 28 (2): 537–49.
- 15. Vincent J., Moreno R., Takala J. et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/ failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European SocietyofIntensiveCareMedicine//Intensive Care Med. – 1996; 22 (7): 707–10.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПО ДАННЫМ ПЕРФУЗИОННОЙ СЦИНТИГРАФИИ ЛЕГКИХ

- Е.В. Мигунова, кандидат медицинских наук, Н.Е. Кудряшова, доктор медицинских наук,
- **О.В. Никитина**, кандидат медицинских наук, **Э.А. Береснева**, доктор медицинских наук, профессор, **И.М. Гольдина**, доктор медицинских наук, **О.А. Забавская**, кандидат медицинских наук,
- **О.Г. Синякова**, кандидат технических наук, **И.П. Михайлов**, доктор медицинских наук, профессор, **Д.А. Косолапов**, кандидат медицинских наук, **Е.В. Кунгурцев**, доктор медицинских наук

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

E-mail: emigunovasklif@mail.ru

Оценка эффективности тромболитической и антикоагулянтной терапии проведена у 92 больных с тромбоэмболией легочной артерии (ТЭЛА) в возрасте от 22 до 88 лет (в среднем 59,3±13,9 года). В соответствии с принятым в нашем лечебном учреждении алгоритмом диагностики ТЭЛА комплекс методов включал: рентгенологическое исследование легких (для исключения хронических заболеваний или повреждений легких), УЗИ вен нижних конечностей и нижней полой вены, перфузионную сцинтиграфию легких и в ряде случаев мультиспиральную компьютерную томографию-ангиографию легких при сохраняющихся сомнениях в диагнозе. Определение дефицита перфузии и оценку восстановления легочной перфузии проводили радионуклидным методом. Исследование показало более значительный эффект тромболитической терапии (по сравнению с антикоагулянтной), которая в 92,1% случаев способствовала полному восстановлению или улучшению перфузии легких при обращении пациентов в течение первых 9 сут от начала заболевания.

Ключевые слова: тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА), тромболитическая терапия, перфузионная сцинтиграфия легких

ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF THROMBOLYTIC THERAPY
OF PULMONARY TROMBOEMBOLISM BY LUNG PERFUSION SCANNING
E.V. Migunova, Kudryashova N.E., Nikitina O.V., Beresneva E.A., Gol'dina
I.M., Zabavskaya O.A., Sinyakova O.G., Mikhaylov I.P., Kosolapov D.A., Kungurtsev E.V.
Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow

Assessment of the effectiveness of thrombolytic and anticoagulation therapies was performed in 92 patients with pulmonary tromboembolism (PTE), aged from 22 to 88 years (average age is $59,3\pm13,9$ years). In accordance with the diagnostics algorithm of PTE, accepted in our hospital, complex of methods included: x-ray of lungs (for the exception of chronic diseases or damage of the lungs), ultrasound examination of veins of lower extremities and v. cava inferior, lung perfusion scanning (LPS), and in some cases — CTPA of the lungs in continuing doubts about the diagnosis. The detection of the perfusion deficit and assessment of the recovery of the lung perfusion were performed with radionuclide method. The study showed that if compared with anticoagulant a thrombolytic therapy had a significant effect, which contributed to the total restoration or improvement of perfusion in the pulmonary circulation in 92,1% of patients sought for medical advice within the first nine days after onset of the disease.

Key words: pulmonary tromboembolism (PTE), thrombolytic therapy, lung perfusion scanning (LPS)

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) — одно из наиболее частых и грозных осложнений острых заболеваний и травм, требующее экстренной диагностики и своевременной адекватной тромболитической терапии (ТЛТ) [3, 4, 12]. На современном этапе лидирующее место в диагностике ТЭЛА принадлежит мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ)-ангиографии легких [7, 16]. Высокая лучевая нагрузка, нефротоксическое действие контрастных веществ, аллергические осложнения

ограничивают применение КТ-ангиографии, особенно при необходимости частого динамического повторения [6, 9]. Перфузионная сцинтиграфия легких (ПС) остается одним из основных методов для оценки дефицита перфузии (особенно при субсегментарной локализации тромбоэмбола) и контроля эффективности проводимого лечения благодаря невысокой лучевой нагрузке при многократных повторных исследованиях и отсутствию побочных реакций. Точность ПС при исключении ТЭЛА достигает 100% [8, 10, 12, 15].

ПС легких основана на микроэмболизации капилляров легочной артерии (ЛА) микросферами или макроагрегатами альбумина, меченными 99m Тс, что позволяет выявлять дефекты перфузии при окклюзии легочных сосудов любого калибра. Типичным сцинтиграфическим признаком ТЭЛА является наличие краевых клиновидных дефектов перфузии с обращенным к плевре основанием, повторяющихся во всех стандартных проекциях и свидетельствующих об отсутствии регионального легочного кровотока. Для определения суммарного дефицита перфузии каждый дефект накопления площадью, равной сегменту, принимают за дефицит перфузии в 5%, равной нижней доле — 25%, площадью, равной правому легкому — 55%, левому — 45% [5].

При наличии клинической картины ТЭЛА, повышенном уровне D-димера и нормальном рентгеновском снимке можно ограничиться проведением ПС для постановки окончательного диагноза [9]. В пользу применения сцинтиграфии следует отнести и тот факт, что на фоне лечебных мероприятий при ТЭЛА часто приходится осуществлять неоднократный диагностический контроль восстановления перфузии, а при повторных МСКТ лучевая нагрузка на пациента существенно выше. В случаях выявления при рентгенографии значительных изменений легочной ткани, в том числе у больных с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и пневмосклерозом (если нет противопоказаний к введению контрастных веществ), все же следует отдавать предпочтение МСКТангиографии легких, так как интерпретация сцинтиграмм в данной ситуации затруднена [7, 11, 16].

По мнению ряда зарубежных специалистов, каждое медицинское учреждение принимает индивидуальную диагностическую стратегию при подозрении на ТЭЛА и формирует четкий алгоритм обследования, в котором радионуклидный метод, характеризующийся высокой информативностью и низкой лучевой нагрузкой на пациента, является одним из основных диагностических тестов [9, 10, 12, 15]. В условиях многопрофильного стационара с оказанием неотложной помощи при большом потоке больных наилучшим образом зарекомендовал себя следующий алгоритм диагностики ТЭЛА:

- рентгенологическое исследование легких (для исключения хронических заболеваний легких, пневмоторакса и повреждений грудной клетки):
- УЗИ вен нижних конечностей и нижней полой вены (для выявления источника тромбоэмбола);
- перфузионная сцинтиграфия легких;
- МСКТ-ангиография легких при сохраняющихся сомнениях в диагнозе, а также перед проведением интервенционных ангиографических вмешательств, которые требуют определения четкой локализации тромбоэмбола, его размеров и протяженности.

Целью исследования было определение эффективности ТЛТ по данным перфузионной сцинтиграфии легких.

Проанализированы результаты обследования 92 больных с ТЭЛА (44 мужчины и 48 женщин в возрасте от 22 до 88 лет; средний возраст $59,3\pm13,9$ года), которым проведена антитромботическая терапия.

Антитромботическая терапия в условиях реанимационного отделения проводилась всем пациентам. Использовали 2 метода: введение прямых антикоагулянтов и системный тромболизис. Показанием для ТЛТ считали наличие дефицита перфузии >35-40%, выявленного при ПС, и клинических проявлениях острой дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности. При дефиците перфузии <35-40%, клинически компенсированной острой дыхательной недостаточности и стабильной гемодинамике ограничивались антикоагулянтной терапией, которая применялась также во всех случаях противопоказаний к ТЛТ [4, 14]. У 76 пациентов (1-я группа) проведена ТЛТ актилизе в дозе 100 мг или стрептокиназой в дозе 1,5 млн ЕД, при необходимости – повторно, с последующим назначением антикоагулянтов (гепарин в дозе 1000-1300 ЕД/ч). 2-ю группу (группа сравнения) составили 16 пациентов, которым была проведена только антикоагулянтная терапия. Дефицит перфузии до и после лечения определяли с помощью ПС.

Применявшийся комплекс диагностических методов включал ЭКГ, рентгенографию грудной клетки, УЗИ вен нижних конечностей и нижней полой вены, ПС легких, КТ-ангиографию легких в трудных диагностических ситуациях. В ряде случаев, учитывая тяжелое состояние больных, ПС опережала УЗИ вен. Эхокардиографию (ЭхоКГ) выполняли при подозрении на наличие тромбоэмбола в правых отделах сердца.

Радионуклидное исследование выполняли через 5 мин после внутривенного введения на глубоком вдохе 100 МБк $^{99\text{m}}$ Тс-макротеха (лучевая нагрузка составляла 1,1 мЗв) по стандартному протоколу в 4 проекциях (передняя, задняя, 2 боковые) в режиме статической записи 500 тыс. импульсов на 1 кадр в матрице 256×256 . Контрольное сцинтиграфическое исследование на фоне лечения выполняли в интервале 2-5-е сутки.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA, версия 7 (фирма Statsoft Jnc, США) для изучения нормальности распределения выборочных данных с использованием критериев Лиллиефорса и Шапиро—Уилка. Межгрупповое и внутригрупповое сравнение проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона для зависимых групп и Манна—Уитни — для независимых групп. Корреляционный анализ проводили непараметрическим методом Спирмена. Показатели центральной

тенденции и вариации представлены в виде среднего значения и стандарного отклонения M(SD), а также медианы и средних квартилей [1кв, Ме, 3кв]. Достоверность различия долей определяли с помощью точного критерия Фишера и критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У всех обследованных по данным ПС были множественные краевые дефекты перфузии. Отсутствие рентгенологических изменений отмечалось у 41 (44,5%) больного, обеднение легочного рисунка — у 10 (10,9%), участки пониженной прозрачности легоч-



Рис. 1. Прямая рентгенограмма грудной клетки. Определяется негомогенное затемнение в латеральных отделах правого легочного поля треугольной формы с основанием, примыкающим к ребрам на уровне III—IV ребра (счет спереди). На остальном протяжении легочные поля прозрачные. Признаки инфаркта легкого



Рис. 2. Флотирующий тромб в общей бедренной вене

ной ткани — у 31 (33,7%), ателектаз и инфаркт легкого (рис. 1) — у 10 (10,9%). Дополнительно у 10 больных выявлено расширение правых отделов сердца. При наличии рентгенологических признаков ТЭЛА дефекты перфузии по данным ПС были более многочисленными и обширными.

По степени нарушения перфузии больные распределились следующим образом: І степень, легкая (\leq 29%) — у 6 (6,5%) пациентов; ІІ степень, среднетяжелая (30–44%) — у 33 (35,9%); ІІІ степень, тяжелая (45–59%) — у 32 (34,8%); ІV степень, крайне тяжелая (\geq 60%) — у 21 (22,8%) пациента.

При УЗИ вен нижних конечностей признаки острого венозного тромбоза выявлены у 69 (75%) пациентов, флотирующего тромба — у 33 (47,8%) больных (рис. 2), из них у 11 (15,9%) был имплантирован кава-фильтр. По локализации тромбоза пациенты были распределены следующим образом: тромбоз бедренно-подколенного сегмента — у 18 (26%), подвздошной и нижней полой вен — у 16 (23,2%), вен голени — у 16 (23,2%), бедренной вены — у 8 (11,6%), подвздошно-бедренного сегмента — у 7 (10,3%), нижней полой вены — у 3 (4,3%), нижней полой вены и вен голени — у 1 (1,4%). Зависимости степени нарушения перфузии от локализации источника тромбоэмбола не выявлено (г=-0,15). Нарушений сердечного ритма в данной группе не было.

Источник ТЭЛА не выявлен у 23 (25%) пациентов. Предполагаемые причины отрицательных результатов УЗИ вен, согласно данным литературы, связаны с ограничением возможностей метода (в 25-56% случаев) у пациентов, страдающих ожирением или выраженным отеком конечности [2, 13]. Кроме того, трудности диагностики могут быть объяснены образованием сегментарных и пристеночных тромбов, которые невозможно диагностировать, если вена не осматривается на всем протяжении [2]. Однако чаще ограничение возможностей метода обусловлено трудностью выявления тромбов в венах голени, если исследование проведено не в полном объеме, т.е. когда из протокола УЗИ вен исключены малые берцовые, камбаловидная и медиальные икроножные мышцы. В этом случае ложноотрицательные результаты могут достигать соответственно 14; 37 и 63% [1].

У 9 (9,8%) больных с длительным легочным анамнезом (ХОБЛ) возникли трудности при интерпретации сцинтиграмм, и им была рекомендована КТ-ангиография легких. Из них у 5 больных диагноз ТЭЛА при КТ-ангиографии был подтвержден (рис. 3), у 3 больных были противопоказания к введению контрастного вещества (выполнено КТ без контрастного усиления; достоверной верификации получено не было). Кроме того, у 1 пациентки с подтвержденным диагнозом рака яичника имелись расхождения между данными ПС и КТ-ангиографии легких. Клиническая картина и динамическое наблюдение

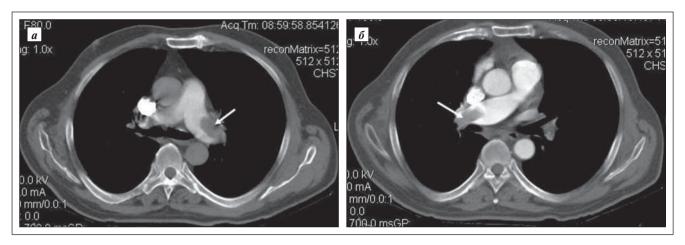


Рис. 3. Визуализация тромбов легочных артерий на KT-ангиопульмонографии: отмечаются дефекты контрастирования правой и левой легочных артерий на уровне их деления на долевые ветви

не позволили у этих 4 больных исключить диагноз ТЭЛА, им была проведена ТЛТ с положительным эффектом.

Пациенты 1-й группы обратились в стационар за помощью на 1-9-е сутки от момента заболевания. Дефицит перфузии в этой группе по данным ПС до начала лечения в среднем составил 48,6 (12,7)% [40,0; 48,6; 60]. При контрольном исследовании на 2-5-е сутки после ТЛТ дефицит перфузии уменьшился на 20,0 (13,2)% [10,0; 20,0; 37,5] и составил 28,6 (13,2)% [20,0; 28,6; 37,5] (критерий Вилкоксона, p<0,0001). Профилактику осложнения от ТЛТ в виде желудочно-кишечного кровотечения проводили назначением Н2-блокаторов или блокаторов протонной помпы в средних терапевтических дозах. У 6 (8%) пациентов этой группы (4 обратились в 1-е сутки, 1 — на 3-и и 1 — на 7-е) эффекта от ТЛТ не отмечалось (рис. 4). Тем не менее зависимости эффекта ТЛТ от сроков начала терапии не получено (r=-0,17), что указывает на целесообразность ТЛТ при обращении вплоть до 9-х суток от начала заболевания. Всего в 1-й группе значимый эффект от ТЛТ отмечен у 70 (92,1%) больных.

В группе сравнения пациентам с сопутствующими заболеваниями и противопоказаниями к ТЛТ была проведена антикоагулянтная тера-

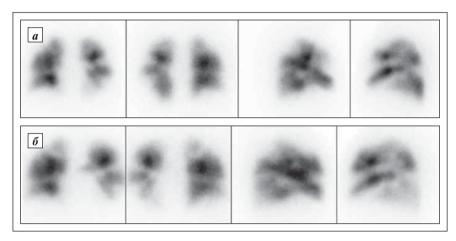


Рис. 4. Отсутствие эффекта ТЛТ у пациента с двусторонней ТЭЛА сегментарных и субсегментарных ветвей: а— сцинтиграммы в передней, задней и 2 боковых проекциях до назначения ТЛТ, суммарный дефицит перфузии 45%; б— сцинтиграммы в тех же проекциях на 3-и сутки после ТЛТ, суммарный дефицит перфузии 45%

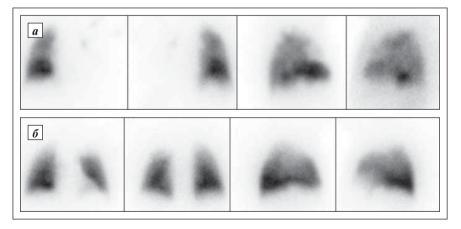


Рис. 5. Восстановление перфузии легких на фоне ТЛТ у пациента с двусторонней ТЭЛА с вовлечением левой главной ветви ЛА: а— сцинтиграммы в передней, задней и 2 боковых проекциях до назначения ТЛТ, суммарный дефицит перфузии 50%; б— сцинтиграммы в тех же проекциях после ТЛТ, суммарный дефицит перфузии 10%

пия гепарином на 1-6-е сутки от момента приступа. Дефицит перфузии до лечения во 2-й группе составил в среднем 34,7 (10,6)% [30,0; 34,7; 40,0], что достоверно отличалось от более тяжелых перфузионных расстройств в 1-й группе (р=0,00006; U-тест Манна— Уитни); при контрольном исследовании к 5-7-м суткам он уменьшился на 13,1 (13,5)% [0; 13,1; 22,5] и составил 21,6 (13,6)% [15,0; 21,6; 35,0]. Достоверность различий составила р=0,004 (критерий Вилкоксона). У 6 (38%) больных, обратившихся в 1-е сутки от момента приступа, эффекта антикоагулянтной терапии не наблюдалось. Результаты эффективности лечения по данным ПС во 2-й группе, как и в 1-й, продемонстрировали отсутствие корреляционной связи между эффектом антикоагулянтной терапии и временем ее начала (r=-0,18). Во 2-й группе значимый эффект терапии отмечен в 10 (62,5%) случаях (p=0,07 для Δ и р=0,082 для абсолютных значений).

После проведенного лечения полное восстановление перфузии в обеих группах отмечалось у 10 (10,9%) пациентов, дефицит перфузии уменьшился до легкой степени нарушения — у 53 (57,6%) и средней — у 19 (20,6%) больных. Процент восстановления перфузии у 8 (8,7%) больных был низким ($11,8\pm5,5\%$), а в 2 (2,2%) случаях, несмотря на ТЛТ, улучшения перфузии не отмечено, по-видимому, из-за позднего обращения пациентов за медицинской помощью.

Таким образом, исследование показало, что при проведении ТЛТ легочная перфузия восстанавливает

эффективнее (рис. 5). Достоверность различий между группами в полученных позитивных исходах составила p=0,005 (точный критерий Фишера) и p=0,005 (χ^2 -критерий). Отношение шансов (OR) составило 7,00 (доверительный интервал [1,59; 31,71]), т.е. получена сильная положительная ассоциация, ТЛТ достоверно сопряжена с клинически значимым улучшением легочной перфузии. При назначении ТЛТ вероятность быстрого клинически значимого улучшения легочной перфузии в 1,6 раза выше, чем при антикоагулянтной терапии гепарином (относительный риск — RR=1,6).

выводы

- 1. Исследование продемонстрировало эффективность ТЛТ при обращении пациентов в первые 9 сут от начала заболевания в большинстве наблюдений (92,1%).
- 2. При назначении ТЛТ вероятность быстрого клинически значимого улучшения легочной перфузии в 1,6 раза выше, чем при антикоагулянтной терапии гепарином.
- 3. Перфузионная сцинтиграфия предоставляет достоверную информацию о дефиците перфузии при ТЭЛА и восстановлении кровотока на фоне терапии. Радионуклидный метод предпочтителен для контроля эффективности проводимого лечения благодаря высокой воспроизводимости и низкой лучевой нагрузке.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Гольдина И.М., Трофимова Е.Ю., Кунгурцев Е.В., Михаилов И.П., Леменев В.Л., Малыгина М.А. Особенности клинической и ультразвуковой диагностики острых венозных тромбозов глубоких вен голени // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2009; 2: 60-70
- 2. Гольдина И.М., Трофимова Е.Ю. Возможности ультразвукового исследования в диагностике острых тромбозов глубоких вен голени // Ультразвуковая и функциональныя диагностика. 2009; 1: 59–68.
- Кириенко А.И., Матюшенко А.А., Андрияшкин В.В., Чуриков Д.А. Тромбоэмболия легочных артерий: диагностика, лечение и профилактика // Consilium medicum. – 2001; 3 (6): 289–294.
- Котельников М.В.. Ведение больных с венозными тромбоэмболиями. – М., 2006. – 102 с.
- 5. Савельев В.С., Яблоков Е.Г., Кириенко А.И.

- Массивная эмболия легочной артерии М.: Медицина, 1990. 336 с.
- Терновой С.К., Королева И.М.. Алгоритмы обследования пациентов с подозрением на тромбоэмболию легочной артерии. – Медицинская визуализация. – 2003; 4: 6–9.
- 7. Юдин К.А., Масина О.В, Китавина С.И., Агапов В.В. Возможности МСКТ-ангиопульмонографии в диагностике ТЭЛА // REJR. 2012; 2 (2): 39–42. Режим доступа:www.rejr.ru
- Cook G., Maisey M., Britton K., Chengazi V. Clinical Nuclear Medicine. London: Edvard Arnold (publishers) Ltd. – 2006. – 915 p.
- Essentials of nuclear medicine imaging / Fred A. Mettler Jr., Milton J. Guiberteau. – 6th ed. –Elsevier, 2012. – 600 p.
- Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism / Europ. Heart J. – 2008; 2276–2315.
- **11.** Mechanism of hypoxemia and hypocapnia in pulmonary embolism / A. Santoli-

- candro, R. Prediletto, E. Fornai (et al.) // Am J Respir Crit Care Med. – 1995; 152 (1): 336–47.
- **12.** Pistolesi M., Lavorini F., Miniati M. Diagnostic strategies for suspected pulmonary embolism // European respiratory monograph. 2004; 30 (6): 89–105.
- Rose S., Zwiebel W., Murdock L. et al. Insensitivity of color Doppler flow imaging for detection of acute calf deep venous thrombosis in asymptomatic postoperative patients // J. Vasc. Interv.Radiol. – 1993; 4 (1): 111–7.
- 14. Tomas M., Chauhan A., More R. Pulmonary embolism – an update on thrombolytic terapy // Quart. J. Med – 2000; 93 (5): 261–7.
- Van Beek E., Moody A., Oudkerk M. Imaging of pulmonary embolism: an overview // European respiratory monograph. – 2003; 27 (7): 110–23.
- Wittram C. How I do it: CT pulmonary angiography // Am. J. Roentgol. 2007; 188: 1255–61.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕЧЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ РАДИОКОЛЛОИДНЫМ КОМПЛЕКСОМ «99mTc-TEXHEФИТ»

О.Ю. Килина^{1, 2}, доктор медицинских наук, **В.Д. Завадовская**¹, доктор медицинских наук, профессор, **М.А. Зоркальцев**¹, кандидат медицинских наук, **В.Д. Удодов**¹, **М.А. Замышевская**¹

¹Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, ²Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, Абакан

E-mail: radiology@ssmu.ru

В статье представлены результаты изучения механизмов накопления радиоколлоидного препарата в клетках белой крови. Исследование включало оценку влияния условий взятия крови (диаметр иглы) и условий инкубации (температурный и временной режимы) на жизнеспособность и функциональную активность лейкоцитов. Установлено, что изучаемый коллоидный комплекс «^{99m}Tc-Технефит» накапливается внутриклеточно, предположительно посредством фагоцитоза. Серия выполненных в условиях in vitro экспериментов выявила, что оптимальными условиями для сохранения жизнеспособности и функциональной активности клеток является инкубация при 37°С в течение 45—90 мин.

Ключевые слова: коллоидные комплексы, миграция меченых лейкоцитов, воспалительный процесс

THE STUDY OF FACTORS AFFECTING THE EFFICIENCY OF LABELING LEUKOCYTES WITH RADIOCOLLOID COMPLEX «99m Ts-TEKHNEFIT»

O.Yu. Kilina^{1, 2}, V.D. Zavadovskaya¹, M.A. Zorkal'tsev¹, V.D. Udodov¹, M.A. Zamyshevskaya¹

¹Siberian State Medical University, Tomsk,

²Khakassia State University named after Katanov N.F., Abakan

In the paper there are presented results of the study of the mechanisms of accumulation of the radiocolloid preparation in white blood cells. The study included an assessment of the effect of conditions of blood sampling (the diameter of the needle) and incubation conditions (temperature and time regimes) on the viability and functional activity of leukocytes. The studied colloidal complex «Tekhnefit, 99m Tc» was established to be accumulated intracellularly, presumably by means of phagocytosis. Series made in the in vitro experiments revealed that the incubation at 37°C for 45–90 minutes provides the most optimal conditions for preserving the viability and functional activity of cells **Key words:** colloidal complexes, the migration of labeled white blood cells, the inflammatory process

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой современной медицины является совершенствование методов ранней диагностики локальных воспалительных процессов, которые могут быть причиной инвалидизации и жизнеугрожающих осложнений. Один из путей решения данной проблемы – разработка технологий, объединяющих клеточные технологии и технологии ядерной медицины. Примером служит методика, уже признанная «золотым стандартом», - сцинтиграфия с аутологичными лейкоцитами, меченными ^{99m}Тс-ГМПАО (гексамителенпропиленаминоксим). Однако эта методика не лишена недостатков, например, ограничений в исследовании органов брюшной полости за счет выведения радиофармпрепарата (РФП) через желчевыделительные пути и кишечник. С учетом высокой потребности клинической медицины в своевременной диагностике локальных воспалительных процессов поиск новых средств для мечения аутологичных лейкоцитов остается актуальной задачей.

Коллоидный комплекс «^{99m}Tc-Технефит» является отечественным реагентом для соединения с технецием-99m. Это — коллоидный раствор на основе лиофилизированной смеси фитина, двухлористого олова и фосфатов натрия разной степени замещения, размеры частиц которого составляют от 0,1 до 1 мкн. В основном этот РФП применяется при исследовании ретикулоэндотелиальной системы (статическая сцинтиграфия печени и селезенки, исследование костного мозга). В 2007 г. доказана возможность визуализации локального воспалительного процесса при выполнении сцинтиграфии с аутологичными лейкоцитами, меченными «^{99m}Tc-Технефит» [1]. Про-

демонстрирована высокая диагностическая эффективность сцинтиграфии с лейкоцитами, меченными указанным радиоколлоидным комплексом, в диагностике хронического остеомиелита и артритов различной этиологии [2, 3]. Механизмы аккумуляции РФП «99mTc-Технефит» в аутологичных лейкоцитах остаются неизученными.

Целью исследования было оценить ключевые механизмы аккумуляции коллоидного комплекса, меченного ^{99m}Tc, в лейкоцитах, а также его влияние на функциональную активность и жизнеспособность лейкоцитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Все этапы работы осуществлялись в условиях *in vitro*. В качестве объекта исследования использовано 50 образцов венозной крови, которую брали у здоровых добровольцев в объеме 20—50 мл. Все участники исследования дали информированное согласие на участие в научном исследовании.

Степень аккумуляции РФП в различных клетках белой крови осуществляли, изучая эффективность мечения клеток (после их разделения в градиенте плотности) по формуле:

Влияние условий инкубации и взятия крови (длительность инкубации, ее температура, диаметр иглы) на жизнеспособность лейкоцитов изучали путем сравнительной оценки жизнеспособности клеток при различных режимах инкубации и взятия крови. Жизнеспособность *in vitro* оценивали путем визуального контроля (отсутствие сгустков), с помощью микроскопии после окрашивания трипановым синим. Влияние контакта с коллоидным комплексом «99mTc-Технефит» определяли на основании сравнительного анализа жизнеспособности и функциональной активности лейкоцитов в коллоидном растворе и без него в одинаковых условиях.

Исследование функциональной активности лейкоцитов включало оценку фагоцитоза, активности В-лимфоцитов (определение концентрации иммуноглобулинов — Ig) и активности Т-лимфоцитов (оценка реакции бласттрансформации) иммунологическими методами.

Технология инкубации лейкоцитов с радиоколлоидным комплексом ^{99m}Тс-Технефит соответствовала авторскому способу [1]. Образец венозной крови (объемом 50 мл) оставляли в шприце для оседания эритроцитов на 45 мин с последующим отделением более тяжелой эритроцитной массы от плазмы и лейкоцитной взвеси. Полученную таким обра-

зом взвесь лейкоцитов в плазме центрифугируют в течение 10 мин при 1000 об/мин. После отделения лейкоцитов от плазмы к ним добавляют приготовленный заранее РФП ^{99m}Тс-Технефит. Препарат готов к употреблению после растворения реагента во флакон, с которым в асептических условиях добавляют 5 мл элюата из генератора; ^{99m}Тс-активность — 20 мКи (при необходимости предварительно разбавляют элюат изотоническим раствором хлорида натрия до требуемой активности). В качестве изменяемых условий инкубации анализировали влияние температуры и времени инкубации. После инкубации лейкоцитную взвесь вновь однократно центрифугируют для очищения от несвязавшегося с клетками крови РФП.

Числовые данные приведены в виде медианы (межквартильный размах). Для проверки статистических гипотез о достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна—Уитни, в случае сравнения 3 и более независимых групп — критерий Фридмана. Различия считали статистически значимыми при p < 0.05. Статистический анализ данных осуществляли с помощью пакета Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖЛЕНИЕ

С целью определения механизма аккумуляции исследуемого РФП в лейкоцитах (внутриклеточное накопление или встраивание в мембрану) проводили разрушение клеточных структур путем длительного центрифугирования (300 об; 20 мин). Разрушение клеточной структуры подтверждено при микроскопическом исследовании осадка (обнаружены клетки с разрушенной клеточной мембраной). Затем измеряли радиоактивность супернатанта и осадка; при этом было выявлено отсутствие радиоактивности осадка (ядра, клеточные мембраны, крупные органеллы). Таким образом, с высокой вероятностью можно утверждать, что данный препарат накапливается внутриклеточно и при разрушении целостности клеточной мембраны покидает клетку. Предположительный механизм поступления коллоидного препарата внутрь клетки – фагоцитоз. Полученные результаты согласуются с данными литературы о механизмах накопления в лейкоцитах коллоидных частиц меньших размеров – наноколлоидов [5–7]. Предположения о наиболее вероятном механизме накопления препарата путем фагоцитоза подтверждается также литературными данными, свидетельствующими о поглощении путем фагоцитоза преимущественно крупных коллоидных частиц, из которых в значительной степени состоит технефит [5]. Предполагаемый механизм аккумуляции технефита отличает его от наиболее часто использующегося за рубежом препарата ^{99m}Tc-ГМПАО («Ceretec»), который, являясь липофильным комплексом, пенетрирует клеточную мембрану и, таким образом, занимает внутриклеточное положение [4].

Для оценки эффективности мечения лейкоцитов изучаемым РФП после проведения процедуры мечения клеток крови и последующего их центрифугирования осуществляли раздельную дозиметрию супернатанта и осадка. Средняя эффективность мечения лейкоцитов, полученная при оценке результатов исследований, составила 35% (от 31 до 38%).

Для оценки влияния условий взятия крови исследовали жизнеспособность лейкоцитов в зависимости от диаметра иглы. С этой целью у 50 добровольцев брали венозную кровь с использованием игл-бабочек разного диаметра: 16G, 17G, 18G, 19G и 21G (по 10 человек в каждой группе). После выделения лейкоцитов взвесь оценивали качественно (визуально на наличие сгустков), микроскопически (для выявления «теней» клеток — фрагментов разрушенных клеток) с помощью трипанового синего. Наибольшее количество поврежденных лейкоцитов наблюдалось, если кровь брали иглами G16 и G17, о чем свидетельствуют результаты всех тестов на жизнеспособность (табл. 1). Больше всего клеток с сохраненной жизнеспособностью наблюдалось при использовании игл диаметром G19 – 21. Однако технически для взятия крови более удобна игла G19; именно этот размер мы рекомендуем для выполнения методики мечения лейкоцитов.

На следующем этапе работы осуществлялась оценка влияния условий инкубации на жизнеспособность и функциональную активность лейкоци-

тов. Выполнена серия экспериментов на образцах крови, взятых иглой 19G. В качестве изменяемых условий инкубации анализировали влияние температуры (3 варианта: 25°C – комнатная; 37° C — термостат и 40° C — термостат и продолжительности инкубации 45 мин, 90 мин, 135 мин) в различных вариантах сочетаний перечисленных условий (всего 9 вариантов). Для исключения влияния коллоидного препарата на данном этапе эксперимента инкубация проводилась без добавления коллоида.

Исследование жизнеспособности лейкоцитов показало, что число жизнеспособных клеток от температурных условий инкубации зависит незначительно, но с увеличением времени инкубации до 135 мин оно существенно снижается (табл. 2). Наибольшее число жизнеспособных клеток сохраняется при температуре 37°С и продолжительности инкубации не более 90 мин.

Следующие 2 эксперимента были направлены на оценку функционального состояния лимфоцитов. Влияние на Т-лимфоциты оценивали с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Изменение функциональной активности В-лимфоцитов оценивали, определяя уровень Ig G в супернатанте после постановки РБТЛ. Отмечены некоторое увеличение функциональной активности как В-, так и Т-лимфоцитов при более высокой температуре инкубации и закономерный ее спад при длительной инкубации — 135 мин (табл. 3, 4).

Полученные результаты демонстрируют, что функциональная активность лейкоцитов не снижается в стандартных условиях инкубации (37°С) и повышается по сравнению с нормой при более высокой температуре. Таким образом, суммируя результаты оценки жизнеспособности и функциональной активности лейкоцитов, можно заключить, что оптимальными для инкубации лейкоцитов являются температура 37°С и время инкубации 45—90 мин. В плане сохранения жизнеспособности и функциональной активности возможна инкубация при комнатной температуре. Инкубация при температуре 40°С нецелесообразна, так как это приводит к увеличению числа нежизнеспособных клеток.

На следующем этапе исследования оценивали влияние контакта с коллоидным препаратом на жизнеспособность и функциональную активность лейкоцитов. Для этого в оптимальных условиях, опи-

Таблица 1 ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЗЯТИЯ КРОВИ (ДИАМЕТР ИГЛЫ) НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ

Диаметр иглы		Число пр	Насупанионну ка	
	всего	с определяемыми визуально сгустками	с определяемыми фрагментами клеток	Неокрашенные лейкоциты, %
G16	10	2	3	85 (82–87)
G17	10	1	1	84 (81–88)
G18	10	0	1	85 (81–91)
G19	10	0	0	94 (85–97)
G21	10	0	0	93 (84–96)

Примечание. В скобках — пределы колебаний.

Таблица 2

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ИНКУБАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ (МЕДИАНА, %)

Продолжительность,	Температура, °С			_
мин	25	37	40	p
45	93 (88–96)	97 (91–98)	85 (80-89)	0,048
90	89 (84–93)	90 (86–95)	81 (75–83)	0,091
135	87 (82–90)	86 (81–90)	77 (70-80)	0,047

Примечание. В скобках — межквартильный размах (здесь и в табл. 3).

Таблица 3

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ИНКУБАЦИИ НА СИНТЕЗ Ig G (МЕДИАНА, г/л)

Продолжительность,	Температура, °С			
мин	25	37	40	p
45	13,4 (11,7–13,9)	15,4 (13,9–15,9)	16,7 (15,1–17,0)	0,053
90	14,5 (12,8–14,7)	15,7 (14,3–16,3)	19,6 (17,3–20,1)	0,049
135	13,2 (11,8–13,7)	14,9 (14,0–15,3)	14,3 (13,9–14,7)	0,23

Таблица 4

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ИНКУБАЦИИ НА ЧИСЛО БЛАСТТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК, %

Продолжительность,	Температура, °С			
мин	25	37	40	p
45	65 (60-69)	74 (69–77)	92 (90-97)	0,047
90	68 (61-72)	76 (72–78)	86 (81–90)	0,045
135	71 (68–76)	78 (70-81)	80 (76-85)	0,056

Таблица 5

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ИНКУБАЦИИ ПРИ 37°С В ТЕЧЕНИЕ 45 мин

Показатель	Инкубация с коллоидным комплексом (n=12)	Инкубация без коллоидного комплекса (n=15)	p
Число жизнеспособных клеток при окрашивании трипановым синим, %	97 (91–99)	97 (91–98)	0,65
Уровень Ig G, г/л	19,1 (17,5–19,4)	15,4 (13,9–15,9)	0,041
Число бласттранс- формированных клеток, %	92 (88–96)	74 (69–77)	0,042

санных выше, проводили инкубацию лейкоцитов с коллоидным препаратом. Всего таким образом было исследовано 15 образцов крови. При этом данные, полученные на предыдущем этапе, использовались для сравнения (табл. 5).

Нами установлено отсутствие статистически значимых различий в количестве жизнеспособных лейкоцитов при контакте с коллоидом, что свидетельствует об отсутствии влияния такого контакта на жизнеспособность лейкоцитов, подвергающихся процедуре мечения. В то же время контакт с коллоидным препаратом вызвал статистически значимое повышение показателей, характеризующих функциональную активность В- и Т-лимфоцитов.

Таким образом, контакт лейкоцитов с исследуемым коллоидным препаратом не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность и функциональную активность клеток. Выявленное повышение функциональной активности лимфоцитов может быть связано с их активацией при фагоцитировании коллоидных частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что коллоидный препарат «^{99m}Тс-Технефит» аккумулируется внутриклеточно. На основании изучения условий взятия крови и инкубации выделенных лейкоцитов сформулированы требования, необходимые для эффективного мечения лейкоцитов коллоидным комплексом «^{99m}Тс-Технефит»: кровь берут иглой диаметром не менее 19G, инкубация осуществляется при температуре 37°С в

течение 45—90 мин. В указанных условиях происходит повышение показателей функциональной активности лейкоцитов. Доказано, что контакт коллоидного препарата не влияет на жизнеспособность лейкоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

- Завадовская В.Д., Килина О.Ю., Дамбаев Г.Ц., Куражов А.П., Зоркальцев М.А. Средство и способ диагностики гнойновоспалительных процессов // Патент № 2290952 от 10 января 2007 г.
- 2. Завадовская В.Д., Килина О.Ю., Дамбаев Г.Ц., Куражов А.П. Радионуклидные методы исследования в дисгностике хронического остеомиелита // Медицинская радиология и радиационная безопасность: Научный журнал. 2007; 52 (3): 54–60.
- 3. Килина О.Ю. Радионуклидная диагностика воспалительных процессов опорно-двигательного аппарата // Автореф. дисс. на соискание уч. ст. д-ра мед. наук. Томск, 2009. 36 с.
- De Vries E., Roca M., Jamar F. et al. Guidelines for the labelling of leucocytes with ^{99m}Tc-HMPAO // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. – 2010; 37: 842–8.
- Kumar V. Radiolabeled white blood cells and direct targeting of micro-organisms for infection imaging // The Quarterly J. of
- Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2005; 4: 325–38.
- Ruparelia P., Szczepura K., Summers Ch. et al. Quantification of neutrophil migration into the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. – 2011; 38: 911–9.
- Skehan S., White J., Evans J. et al. Mechanism of accumulation of ^{99m}Tc-sulesomab in inflammation // J. of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine. 2003; 44 (1): 11–8.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ЗОЛОТИСТЫХ СТАФИЛОКОККОВ В СТАЦИОНАРАХ РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ РОССИИ

А.В. Романов, Е.А. Чернов, М.В. Эйдельштейн

НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск

E-mail: andrew.romanov@antibiotic.ru

Золотистый стафилококк относится к одним из основных патогенов человека. В последние несколько десятилетий инфекции, вызванные метициллинрезистентным золотистым стафилококком (MRSA), стали глобальной проблемой. MRSA устойчивы ко всем β-лактамным антибиотикам (за исключением анти-MRSA-цефемов) и являются одной из основных причин внутрибольничных инфекций во всем мире. Устойчивость MRSA к β-лактамам опосредована наличием тесА-гена, который кодирует измененный пенициллинсвязывающий белок 2а (РВР2а, называемый также РВР2') с пониженным сродством к β-лактамам. Исследование эпидемиологии MRSA имеет важное значение для контроля его распространения и разработки терапевтических стратегий против жизнеугрожающих MRSA-инфекций. Нами проведено молекулярное типирование 404 нозо--комиальных MRSA-изолятов, собранных от пациентов в рамках многоцентровых микробиологических исследований в России в 1998-2008 гг. Штаммы были отобраны в соответствии с их профилем антибиотикорезистентности, географическим происхождением и датой изоляции. Наличие генов лейкоцидина Пантон-Валентина (PVL) и видов стафилококковой кассеты хромосомы тес (SCCmec) определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Генетическое разнообразие штаммов оценивали с помощью мультилокусного анализа тандемных повторов с переменным числом звеньев (MLVA), секвенирования гена стафилококкового белка A (spa) и мультилокусного секвенирования-типирования (MLST). Все MRSA-штаммы были PVLотрицательными. SCCmec-кассеты типов III и IV выявлены у преобладающего большинства исследованных штаммов. Один изолят, по-видимому, имеет 2 SCCmec-элемента — IV и V. По данным MLVA, все штаммы были разделены на 115 типов, причем MRSA располагались в пределах обособленных генетических групп. Секвенирование вариабельного участка гена spa и MLSTтипирование выявили соответственно 20 и 6 типов. Эволюционно успешные клоны MRSA с одинаковыми MLVA-профилями и spa-типами были обнаружены в географически удаленных регионах России. Популяционная структура внутрибольничных штаммов MRSA в России, следовательно, является клональной и характеризуется присутствием международных клонов, в основном ST8 spa-mun t008-SCCmec IV и ST239 spa-mun t030 и t037 SCCmec III.

Ключевые слова: MRSA, эпидемиология, типирование

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF NOSOCOMIAL STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN HOSPITALS IN DIFFERENT REGIONS OF RUSSIA

A.V. Romanov, E.A. Chernov, M.V. Edelstein

Institute of antimicrobial chemotherapy, Smolensk

Staphylococcus aureus is a common human pathogen. In the past few decades, infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) have become a global problem. MRSA is resistant to all β-lactam antibiotics, except anti-MRSA cephems, and is one of the main causes of hospital-acquired infections worldwide. The resistance to β-lactams in MRSA is mediated by the presence of mecA gene encoding penicillin-binding protein 2a (PBP2a; also called PBP2') with reduced affinity to β-lactams. The research on MRSA epidemiology is essential for controlling its spread and for delivering therapeutic strategies against life-threatening MRSA infections. In this research we performed molecular typing of 404 nosocomial MRSA isolates collected from adult patients as part of national surveillance studies in Russia in 1998–2008. The strains were selected according to their antibiotic resistance profile, geographic origin and date of isolation. The presence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) genes and types of staphylococcal cassette chromosomemec (SCCmec) were determined by means of PCR. Genetic diversity of isolates was assessed with the use of multilocus variable-number tandem repeat analysis(MLVA), staphylococcal protein A (spa) gene sequencing and multilocus sequence typing (MLST). All the strains were PVL-negative. SCCmec type III and type IV cassettes were most prevalent in studied isolates. One isolate carried two copies of mecA gene associated with SCCmec IV and V. By MLVA typing, all the isolates were clustered into 115 types, besides MRSA belonged to distinct clusters. Spa typing and MLST revealed 20 and 6 types respectively. Successful MRSA clones sharing the same MLVA profiles and spa types have been found in geographically distant regions of Russia. The population structure of nosocomial MRSA strains in Russia was therefore clonal and was characterized by expansion of international clones, mainly, ST8-spa type t008-SCCmec IV and ST239-spa type t037-SCCmec III.

Key words: MRSA, epidemiology, typing

ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк (S. aureus) является факультативно-анаэробным грамположительным микроорганизмом кокковой формы. Может быть представителем нормальной микрофлоры кожи и слизистой оболочки носовых ходов. Золотистый стафилококк является возбудителем инфекций кожи (фолликулит, импетиго, фурункулы, целлюлит, карбункулы, синдром ошпаренной кожи, абсцессы), а также может спровоцировать различные тяжелые и жизнеугрожающие заболевания, такие, как пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардит, токсический шок, бактериемия, сепсис, и является одной из основных причин внутрибольничных инфекций [18]. Кроме того, известна способность золотистого стафилококка к развитию устойчивости к большинству классов антибиотиков. В первые десятилетия после введения пенициллина в медицинскую практику устойчивость к этому препарату возникла вследствие приобретения золотистым стафилококком плазмид, несущих гены пенициллиназ. Устойчивость к пенициллину была преодолена внедрением пенициллиназоустойчивых препаратов (метициллин, оксациллин, клоксациллин, флуклоксациллин, диклоксациллин, нафциллин), разработанных в качестве альтернативных для лечения инфекций, вызванных продуцирующими пенициллиназу стафилококками. В 1960-х годах был изолирован первый штамм метициллинрезистентного золотистого стафилококка (MRSA). Вскоре после этого штаммы MRSA начали распространяться по всему миру [22]. MRSA, как и любой из штаммов золотистого стафилококка, может вызвать серьезные заболевания у людей, но отличается тем, что устойчив ко всем β-лактамам (пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы), за исключением 5-го поколения цефалоспоринов (так называемых анти-MRSA-цефемов) [41]. На протяжении 3 десятилетий MRSA были известны почти исключительно как нозокомиальные патогены. Больницы, дома для престарелых, учреждения длительного ухода были и остаются основными резервуарами MRSA. Однако с конца 1990-х годов MRSA-инфекции начали появляться во внебольничных условиях. Таким образом, по происхождению инфекции штаммы MRSA можно разделить на внебольничные (CA-MRSA) и нозокомиальные (HA-MRSA). Однако не выяснено, существуют ли генетические различия между этими группами штаммов. CA-MRSA и HA-MRSA существенно различаются по чувствительности к антибиотикам и вирулентности. Некоторые авторы указывают на присутствие лейкоцидина Пантон-Валентина (PVL) генов в качестве возможного маркера CA-MRSA, но в последнее время PVL-позитивные штаммы были обнаружены в стационарах [38].

Устойчивость к β -лактамным антибиотикам у MRSA опосредована геном mecA, кодирующим пенициллинсвязывающий белок 2а (PBP2a, или PBP2'), который имеет меньшее сродство к β -лактамам. Ген mecA

имеет размер 2,1 Кб и находится на мобильных генетических элементах, известных как стафилококковая хромосомная кассета *mec* (*SCCmec*). Элементы SCC*mec* состоят из *mec*-комплекса, содержащего *mec*A-ген, регуляторные гены и инсерционные последовательности (IS431, IS1182, IS1272); ссг-комплекса, состоящего либо из 1 (*ccrA*) или 2 (*ccrA* и *ccrB*) сайтспецифических рекомбиназ и 3 соединительных регионов.

В настоящее время известно 5 классов тес комплекса: A, B, C1, C2, Dи 5 аллотипов *ccr* комплекса: 1, 2, 3, 4 и 5. Различные комбинации классов тес-комплекса и аллотипов ccr-комплекса составляют основу классификации SCCmec кассет по типам. Регуляторные гены могут быть повреждены посредством встраивания инсерционных элементов, что приводит к стабильной дерепрессии mecA [28]. SCCmec-элементы могут нести дополнительные детерминанты устойчивости к антибиотикам нескольких классов, расположенные на интегрированной плазмиде или транспозоне [37]. Например, плазмиды pUB110, присутствующие в SCCmec типа II, содержат ген устойчивости к блеомицину (ble) и ген резистентности к канамицину и тобрамицину [ant(4')]. Плазмиды pI258 и pT181, обнаруженные в SCCmec III, могут нести детерминанты устойчивости к эритромицину, тетрациклину, и тяжелым металлам. Транспозон Тп554, который содержит гены устойчивости к эритромицину, линкосамидам, стрептограмину (ermA), стрептомицину и спектиномицину (aad9/spc), присутствует в SCCmec II, III, VIII и SCCHg. SCCmec IV может содержать Tn4001с геном aacA-aphD, кодирующий бифункциональный аминогликозидмодифицирующий фермент [35].

До недавнего времени существовали 2 противоположные теории, объясняющие эволюцию MRSA. «Моноклональная» теория основана на предположении, что все MRSA-клоны имеют общего предка, и SCCmec-элемент приобретался этим предшественником только 1 раз, в то время как «поликлональная» теория утверждает, что SCCmec-элементы были приобретены независимо друг от друга различными генетическими линиями золотистого стафилококка. Последняя теория была доказана многочисленными исследованиями и, таким образом, получила более широкое признание [27].

Понимание эпидемиологии и популяционной структуры MRSA имеет важное значение для контроля его распространения и разработки терапевтических стратегий против угрожающих жизни инфекций MRSA [36]. Сегодня разработано много фенотипических и генотипических методов для отнесения штаммов MRSA к определенной группе или кластеру в рамках вида золотистого стафилококка [18].

Фенотипические методы все еще широко используются для описания и классификации штаммов. Некоторые из этих методов (такие, как определение чувствительности к антимикробным препаратам) сохраняют непосредственное практическое значение.

Тем не менее фенотипические методы не имеют необходимой дискриминирующей способности, часто не соответствуют эпидемиологическим данным, более склонны к изменчивости в зависимости от условий окружающей среды. По этим причинам фенотипические методы не столь подходят для типирования штаммов, как молекулярные методы, особенно в крупных эпидемиологических исследованиях [36]. Применение молекулярных методов типирования для анализа международной коллекции штаммов золотистого стафилококка привело к выявлению преимущественно клональной популяционной структуры этого вида.

Было показано, что большинство штаммов MRSA, распространенных по всему миру, принадлежат к определенным клональным линиям, адаптированным к колонизации человека или животных. Представители этих линий обладают специфическим набором последовательностей генов «домашнего хозяйства» и детерминант вирулентности [5]. Продолжительный анализ показывает, что некоторые MRSA-клоны являются эпидемическими [21].

Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) был одним из первых молекулярных методов для изучения генетического родства между штаммами MRSA [4]. PFGE имеет высокую дискриминирующую способность и успешно используется для отслеживания вспышек MRSA-инфекций [4]. Однако этот метод менее пригоден для анализа большого числа штаммов, собранных из различных источников, в силу ряда ограничений: во-первых, различие в PFGEпрофилях не обязательно отражает отсутствие филогенетического сходства между штаммами, во-вторых, в силу некоторой субъективности оценки может быть затруднен обмен данными между лабораториями, в-третьих, отнесение штамма к известным клональным линиям при использовании PFGE-профилей проблематично, если не невозможно [4].

Новые методы, основанные на секвенировании ДНК, позволяют преодолеть большинство из этих ограничений и напрямую сравнивать результаты типирования с помощью централизованных баз данных. Один из таких методов, который обладает сопоставимой или более высокой, чем PFGE, разрешающей способностью, - мультилокусный анализ тандемных повторов с переменным числом звеньев (MLVA). MLVA основан на идентификации естественных вариаций числа тандемных повторов ДНК (VNTR) в нескольких локусах генома. Это достигается с помощью ПЦР-амплификации и определения размера ампликонов, соответствующих каждому локусу VNTR. MLVA впервые был применен для типирования штаммов золотистого стафилококка в 2003 г. А. Sabat и соавт. [30], которые оценивали изменчивость вариабельных регионов 5 стафилококковых генов. К. Hardy и соавт. [11] предложили использовать альтернативный набор VNTR-локусов, названных стафилококковыми перемежающимися повторяющимися единицами

(SIRU), большинство из которых расположены в межгенных регионах и, следовательно, с большей вероятностью подвержены нейтральной селекции. MLVAтипирование с использованием 6 SIRU-локусов впоследствии было использовано R. Ікаwaty и соавт. [14] и продемонстрировало высокую дискриминирующую способность, хорошее соответствие с эпидемиологическими данными и результатами других методов. В последнее время разработаны MLVA-схемы, включающие различные сочетания VNTR-локусов (от 8 до 14 локусов) [29, 40]. Точность определения размеров продукта ПЦР и, следовательно, числа копий VNTR, а также производительность можно улучшить, заменив гель-электрофорез на капиллярный электрофорез с автоматической флюоресцентной детекцией [31].

Поскольку в эволюции золотистого стафилококка мутации происходят чаще, чем рекомбинационные события, секвенирование одного локуса, содержащего повторы, например, коагулазного гена (соа) или гена стафилококкового белка A (spa), также может быть использовано для надежного и точного типирования MRSA. Внутренняя область повторов гена *spa* (соответствующая SIRU21) более полиморфна, чем повторы в регионе coa, поэтому spa-типирование обеспечивает более высокое разрешение, чем соатипирование. Кроме того, *spa*-типирование стало международно признанным методом исследования эпидемиологии MRSA благодаря созданию централизованной базы данных (http://spaServer.ridom.de), разработке номенклатуры и программного обеспечения для анализа повторяющихся последовательностей spa и автоматического назначения *spa*-типа [12].

Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) основано на секвенировании внутренних фрагментов, как правило, 7 основных генов «домашнего хозяйства». MLST не обладает достаточной дискриминирующей способностью для исследования локальных вспышек, так как накопление нуклеотидных замен в генах «домашнего хозяйства» является относительно медленным процессом и MLST-профиль бактериального изолята достаточно стабилен во времени. Однако этот метод идеально подходит для изучения глобальной эпидемиологии и популяционной структуры. MLST для золотистого стафилококка разработали М. Enright и соавт. в 2000 г. [7]. Онлайн-базы данных MLST (http://saureus.mlst.net/) в настоящее время содержат около 4500 штаммов золотистого стафилококка более 2300 сиквенс-типов (ST). Данных по молекулярной эпидемиологии MRSA в России довольно мало, и зачастую исследования носят локальный характер либо полученные данные невозможно напрямую сравнить с международными из-за различных методик выполнения.

Целью данного исследования работы было изучение молекулярной эпидемиологии штаммов HA-MRSA, собранных от пациентов в различных регионах России за период 1998—2008 гг.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы. В общей сложности 1495 штаммов MRSA было собрано от паниентов c подтвержденными внутрибольничными инфекциями в ходе 3 многоцентровых микробиологических проектов в 1998–2000; 2002–2004 и 2006–2008 гг. Были отобраны 404 штамма (278 – MRSA и 126 – MSSA) так, чтобы представлять каждый профиль резистентности (эритромицин, клиндамицин, ципрофлоксацин, гентамицин, сульфаметоксазол/триметоприм и оксациллин) в пределах одного отделения, участвовавшего в каждом из 3 временных периодов стационара. Инвазивные штаммы, например, MRSA, выделенные из крови, спинномозговой жидкости или при биопсии и с более ранней датой изоляции были предпочтительнее. Все штаммы были подвергнуты MLVA- и SCCmecтипированию, выявлению PLV-генов. MLST и spaтипирование проводили выборочно для репрезентативных штаммов, определенных на основании MLVA- и SCC*mec*-типирования.

Идентификации изолятов до вида. Все изоляты были определены до вида с помощью матрично-ассоциированной лазерной десорбции-ионизации времяпролетной масс-спектрометрии (MALDITOF MS). Масс-спектры были получены на системе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) и проанализированы с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper v.3 (Bruker Daltonics, Германия).

Определение чувствительности к антибиотикам. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для оксациллина, эритромицина, клиндамицина, ципрофлоксацина, гентамицина и триметоприм/сульфаметоксазола определена с помощью метода разведения в агаре. Результаты интерпретированы в соответствии с критериями CLSI [3]. MRSA-фенотип был подтвержден с помощью дискдиффузионного теста с 30 мкг цефокситина. Штаммы золотистого стафилококка ATCC® 25923 (MSSA) и ATCC® 33591 (MRSA) использовали для контроля качества.

Выделение ДНК. Геномная ДНК была выделена из бактерий с помощью наборов Omnix (Omnix Co Ltd, Россия). Выделенная ДНК хранилась при -20°С.

SCCmec-типирование. Тип SCC*mec*-кассеты был определен для каждого MRSA-штамма методом ПЦР, описанным Р. Lu и соавт. [23]. *ccrC*-комплекс, (специфичный для SCC*mec* типа V), — с использованием праймеров и в условиях, описанных С. Milheiriço и соавт. [25]. Амплификация была выполнена на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Австралия). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле, окрашивали бромидом этидия и визуализировали с помощью системы визуализации PhotoDoc-IT (UVP, США).

Смесь фрагментов ДНК Lambda BstEII Digest (117-8454 пар оснований) и pUC18 *Hae*III Digest (11-587 пар оснований) (Sigma Chemical, США) использовалась как маркер молекулярной массы. Штаммы золотистого стафилококка, обладающие кассетами SCC*mec* I, II, III, IV и V типов, были использованы в качестве контроля.

Определение числа копий тес-гена. Число копий гена тес на геном определяли с помощью коммерческого набора ПЦР в реальном времени для количественного определения MRSA — АмплиСенс MRSAскрин-титр-FL (ИнтерЛаб Сервис, Россия). Гены тес и пис (последний используется в качестве однокопийного гена «домашнего хозяйства») были количественно определены с помощью рекомбинантных калибраторов, входящих в комплект; соотношение этих генов рассчитывали с помощью программного обеспечения Rotor-Gene 6000. Для повышения точности анализировали серию из 4 разведений каждого образца.

Выявление PLV-генов. Наличие PVL-генов оценивали методом ПЦР, описанным G. Lina и соавт. [20]. Штамм золотистого стафилококка ATCC® 25923 служил в качестве положительного контроля.

MLVA-типирование штаммов золотистого стафилококка было выполнено по 6 локусам SIRU (01, 05, 07, 13, 15, 21) в соответствии с методом К. Hardy и соавт. [11] и R. Ikawaty и соавт. [14], но с рядом изменений:

- Прямой праймер SIRU21_L (5'-AGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'), используемый для амплификации области повторов spa (SIRU21), был заменен на праймер spa-1113f (5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'), предложенный В. Strommenger и соавт. для spaтипирования [34]. ПЦР-продукты, образованные с последним праймером, на 57 п.о. больше, чем соответствующие фрагменты, полученные с обычным праймером. Данное изменение позволяло предотвратить образование неспецифических ПЦР-продуктов, иногда генерируемых с SIRU21_L.
- Праймеры, используемые для амплификации локусов SIRU, были 5'-меченными флюоресцентными красителями: FAM, R6G или ROX. Эти праймеры были объединены с соответствующими парными праймерами в 2 триплексные ПЦР: в одну вошли SIRU01, SIRU07 и SIRU13, в другую SIRU05, SIRU15 и SIRU21.

Затем продукты каждой ПЦР смешивали с TAMRA-меченным pUC18 внутренним стандартом молекулярной массы [6]. Далее они были проанализированы капиллярным электрофорезом с автоматической флюоресцентной детекцией на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Фрагменты ДНК, соответствующие каждо-

му локусу, были определены в соответствии с цветом с помощью программы Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, США).

Spa-типирование проводили в соответствии с методом H. Frenay и соавт. [8] с изменениями, описанными D. Harmsen [12] и В. Kahl и соавт. [17]. Область spa была амплифицирована с праймерами spa-1113f (5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3') и spa-1514r (5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'). ПЦР-продукты очищали с помощью ферментативной обработки экзонуклеазой I и щелочной фосфатазой креветки (Fermentas, Литва) и секвенировали с обеих сторон с использованием тех же праймеров, что и для амплификации. Для секвенирования использовали набор BigDve Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и прибор ABI PRISM310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems США). Числовые коды *spa*-повторов и *spa*-типы были определены в соответствии с номенклатурой Ridom SpaServer (http://spa.ridom.de) с использованием плагина для spa-типирования BioNumercs V 6.6 (Applied Maths, Бельгия).

MLST проводили путем амплификации и секвенирования общепризнанных хромосомных маркеров: *arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi* и *yqiL*, как описано М. Enright и соавт. [7] и на веб-сайте MLST-типирования золотистого стафилококка (http://saureus.mlst.net/misc/info.asp). Аллельные профили и сиквенс-типы были автоматически определены MLST-плагином BioNumercs V 6.6 (AppliedMaths).

Обработка и анализ данных типирования. Все данные экспериментов обработаны с помощью Віо Numerics v.6.6 (Applied Maths, Бельгия). Кластерный анализ комбинированных MLVA- и SCCтеспрофилей выполнен по алгоритму минимального разветвленного дерева с категориальными значениями из размеров ампликонов SIRU- и SCCтестипов. Родственность spa-типов оценивали с помощью плагина Spa Clustering и метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

SCCmec-типирование. При использовании метода Р. Lu и соавт. [23] типичные продукты амплификации *mecA*-IS1272 (1592 п.о.) и ссгАВ2-комплекса (315 п.о.) одновременно были получены у 178 (63,8%) изученных изолятов. Эта картина характерна для SCC*mec* типа IV. У 100 (35,8%) изолятов показано наличие ПЦР-продукта *mecA-mecRI* (1164 п.о.) при отсутствии *ccr*AB2 — картина, характерная для SCC*mec* типа III. Интересно, что 1 (0,4%) изолят REV-886 дал необычную картину амплификации из 3 продуктов ПЦР: 1592 п.о.; 804 п.о. и 315 п.о., соответствующие *mecA*-IS1272, *mecA-IS431* и *ccrAB2*. Наличие 2 различных *mec*-комплексов (классов В и С2) в этом изоляте подтверждено моноплексной ПЦР с праймерами для *mecA-IS1272* и *mecA-IS431*;

в дальнейшем было проведено секвенирование соответствующих ПЦР-продуктов. Чтобы исключить возможность загрязнения ДНК другого штамма, REV-886 был подвергнут нескольким пассажам, и ПЦР была повторена для образцов ДНК, изолированных независимо друг от друга из 5 отдельных колоний, выросших на отдельных чашках. Во всех повторных экспериментах был получен тот же профиль продуктов ПЦР (рис. 1). Поскольку метод Р. Lu и соавт. не обнаруживает ссгС-комплекс, характерный для SCCmec V, была использована дополнительная ПЦР с праймерами, описанными С. Milheiriço и соавт. [25], которая сгенерировала сстС-фрагмент ожидаемого размера (495 п.о.) у золотистого стафилококка REV-886. Таким образом, скорее всего, отмечалось наличие 2 различных SCCmec-элементов - типов IV и V.

Результаты количественной ПЦР в реальном времени показали, что отношение числа копий mec/nuc-генов было в среднем (M \pm SD) 2,05 \pm 0,09 для золотистого стафилококка REV-886 и 1,17 \pm 0,09 — для контрольных штаммов золотистого стафилококка с SCCmec IV.

Обнаружение гена PVL. Все изоляты MRSA были PVL-отрицательными по данным $\Pi \coprod P$, в то время как этот ген был обнаружен в положительном контроле (золотистом стафилококке $ATCC^{\$}$ 25923).

MLVA-типирование. По данным MLVA-типирования, все изоляты были разделены на 115 типов (каждый из них характеризуется уникальным профилем аллелей SIRU), причем метициллинчувствительные штаммы (n=125) проявили большое генетическое разнообразие, в то время как MRSA (n=279), за исключением 6, расположились в пределах 3 обособленных групп. Более наглядная кластеризация комбинированных MLVA- и SCC*mec*-профилей позволила выявить 5 генетических групп MRSA. Ближайший тип в каждой из этих групп от-

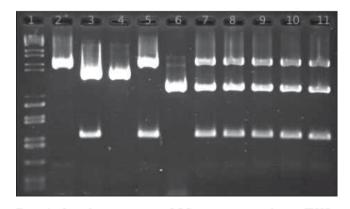


Рис. 1. Определение типа SCCтес, электрофорез ПЦРпродуктов. Дорожки: 1 — маркер молекулярной массы; 2—6 — контрольные штаммы с известными типами SCCтес I—V соответственно; 7—11 — 5 пассажей штамма REV-886.

личается не более чем на 1 VNTR-локус или тип кассеты, в то время как члены различных групп отличались по 2-5 параметрам. Большинство изолятов (n=275) принадлежали к 3 основным генетическим группам: G1, G2 и G3, состоящим соответственно из 18, 13 и 3 типов (рис. 2). Остальные 6 изолятов были разделены на 2 генетически не родственные группы: G4 (4 изолята) и G5 (2 изолята). MRSAизоляты (n=172) крупнейшей генетической группы G1 содержали SCCmec IV, в то время как MRSAизоляты групп G2 и G3 (n=102) – SCCmec III (см. рис. 3). Золотистый стафилококк REV-886 содержал 2 SCCmec-элемента типов IV и V, принадлежал к доминирующей MLVA-группе G1 и имел наиболее распространенный тип MLVA (общий для 153 изолятов). Анализ географического происхождения штаммов показал, что штаммы одинаковых MLVA-групп и типов были распространены в разных городах России. Например, штаммы основных групп MLVA: G1, G2 и G3 были из 23, 16 и 3 городов соответственно. Таким образом, четкой связи между MLVA/SCC*mec*типами и географическим происхождением штаммов не обнаружено.

Spa-типирование. В общей сложности 148 изолятов были отобраны для *spa*-типирования: по 1 из каждого MLVA-типа в пределах одного города. Таким образом, было получено 20 *spa*-типов. Наиболее распространенными типами среди изученных штаммов были: t008 (n=59), t037 (n=33), t030 (n=13), t127 (n=8), t024 (n=7), t129 (n=6), t363 (n=3), t118 (n=3), t3308 (n=2), t425 (n=2), t667 (n=2) и t233 и t3308 (n=2). Несколько типов встретились однократно:

t068, t074, t400, t2270, t7868, t064, t190 и t7576, описанные впервые. Несмотря на то, что spaтипирование имеет более низкое разрешение, чем MLVA, отмечено хорошее соответствие между результатами обоих методов. Изоляты доминирующего MLVA/ SCCmec типа G1 принадлежали к *spa*-типу t008 (n=173, включая REV-886) или его близким вариантам (t068, t118, t024, t190, t400. t7868 и t3308). Изоляты других распространенных групп MLVA/ SCCmec (G2 и G3) принадлежали к spa-типам t037 (n=33) и t030 (n=13) или близкородственным типам (t363, t074, t233, t129, t425, t2270 и t7576). Небольшие, не родственные группы MLVA/ SCCmec – G4, G5 cootbetctbobaли spa-типам: соответственно t 127 и t667. Однако в 2 случаях наблюдались противоречивые результаты, когда изоляты с одинаковыми MLVA/SCCmec-профилями имели различные *spa*-типы: t2270 и t425 или t024 и t400. Распространенность *spa*-типа существенно не различались между разными регионами России.

MLST было проведено для 30 штаммов, представляющих различные spa-типы в пределах центра. Шесть типов (ST) были получены следующим образом: ST1 (n=2), ST8 (n=10), ST154 (n=2), ST239 (n=15), ST368 (n=1) и ST685 (n=1). Четыре из найденных ST, в том числе наиболее распространенные ST8 и ST239

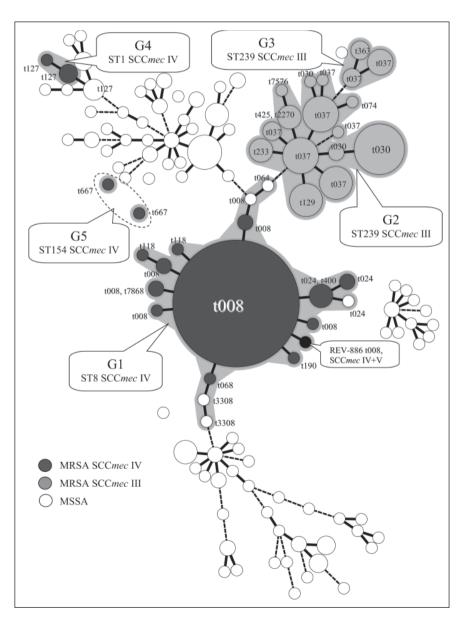


Рис. 2. Кластерный анализ данных типирования на основании комбинированного набора MLVA+SCCmec

и их однолокусные (tpi) варианты ST685 и ST368, относятся к клональному комплексу 8 (CC8). ST8 и ST685 характеризовались *spa*-типами: t008, t068, t118, t024, t190, t400, t7868 и t3308, и соответствовали MLVA/SCCmec-группе G1, SCCmec IV. ST239 и ST368 включали *spa*-типы: t030, t037, t363, t074, t233, t129, t425, t2270 и t7576 и охватывали изоляты MLVA/SCCmec групп G2 и G3, содержали SCCmec III. Как и ожидалось, редкие штаммы MRSA из не связанных *spa*-типов — t127 (MLVA/SCC*mec* группы G4) и t667 (MLVA/SCC*mec* группы G5) – относились по MLST к различным STS: соответственно ST1 и ST154. Были обнаружены 2 штамма, принадлежащие к одному spa-типу (t008), но разным ST (ST8 и ST685). Еще 2 штамма имели один и тот же MLVA-профиль, но различные *spa*-типы и даже разные, но близкородственные типы MLST (t425/ ST368 и t2270/ST239).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно последним опубликованным данным многоцентрового исследования, общая распространенность резистентности к метициллину золотистого стафилококка, изолированного в отделениях реанимации и интенсивной терапии в России, достигла почти 50% [41]. Похожая ситуация отмечается во многих странах – Испании, Ирландии, Великобритании, Венгрии, Румынии, Италии, Греции, Португалии, на Кипре и Мальте [33]. MRSA часто проявляют устойчивость ко многим другим классам антибиотиков, включая аминогликозиды, макролиды, тетрациклины и линкозамиды, хотя устойчивость к этим препаратам может варьировать от штамма к штамму. Для этого исследования клинические изоляты S. aureus были выбраны для представления возможно большего количества разнообразных профилей антибиотикорезистентности. Некоторые препараты (ванкомицин, тейкопланин, тигециклин, цефтобипрол, цефтаролин, линезолид, даптомицин, триметоприм/сульфаметоксазол, фузидиевая кислота) обычно сохраняют высокую активность в отношении MRSA. Все изоляты, включенных в наше исследование, были in vitro восприимчивы к указанным препаратам (данные не представлены). За последние годы растущая потребность в уточнение эпидемиологии и популяционной структуры MRSA привела к разработке методов молекулярного типирования, способных различать штаммы золотистого стафилококка с различной дискриминирующей способностью. Высокая дискриминирующая способность таких методов, как MLVA и *spa*-типирование, как правило, используется для изучения локальной эпидемиологии MRSA (т.е. расследования вспышек в стационарах), но они генерируют дискретные данные, которые поддаются анализу с использованием централизованных баз данных. Другие

методы – такие, как MLST, больше подходят для отслеживания долгосрочного развития и установления филогенетического родства штаммов на региональном, национальном и международном уровнях. Определение горизонтально приобретаемых генетических маркеров: SCCmec-элементов и детерминант вирулентности (таких, как PVL-гены) обеспечивает дополнительные важные характеристики MRSA-клонов [35]. В нашем исследовании все эти методы были объединены, чтобы получить подробную информацию о молекулярной эпидемиологии HA-MRSA в России. Для обозначения генетических линий MRSA мы использовали общепринятую номенклатуру, которая включает MLSTклональный комплекс (СС), сиквенс-тип (ST), spaтип, и тип элемента SCCmec [5]. SCCmec-кассеты типов III и IV были обнаружены в большинстве российских MRSA. Не найдено ни одного изолята, содержащего тип I или II SCCmec-элементов. Этот результат соответствует сообщениям из других стран о том, что заболеваемость, вызванная НА-MRSA штаммами, содержащими SCCmec-типы I и II, сократилась за последние десятилетия [2]. В конце 1990-х годов SCCmec IV часто встречался у золотистых стафилококков, изолированных из внебольничных условий, он, по мнению некоторых авторов, является молекулярным маркером СА-MRSA. Однако современные исследования показали, что во многих странах SCCmec IV присутствует во внутрибольничных штаммах MRSA, и наоборот, SCCmec III (распространенность которого растет во всем мире) может быть обнаружен в CA-MRSA [33]. PVL является важным фактором вирулентности, который также рассматривался как маркер внебольничного происхождения штаммов MRSA. Тем не менее последние исследования свидетельствуют об изоляции PVL-положительных штаммов MRSA у пациентов с внутрибольничными инфекциями [15, 24, 38]. С другой стороны, PVL, как известно, присутствует во всех CA-MRSA штаммов глобально распространенной генетической линии ST8-SCCmec IV, но отсутствует у большинства штаммов MRSA той же генетической линии, изолированных во внутрибольничной среде [2]. В связи с этим важно отметить, что все изученные SCCmec IV изоляты были PVL-отрицательными. Интересно, что в данном исследовании мы нашли один изолят REV-886, который показал наличие 2 разных тес-комплексов (типов В и С2) и *ccr*-комплексов (типа 2 – A2B2 и типа 5 - С1). Поэтому мы подозреваем наличие у этого изолята 2 SCCmec-элементов: типов IV и V. Этот вывод подтверждается результатами количественной ПЦР в реальном времени, в ходе которой обнаружены 2 копии гена тес в геноме золотистого стафилококка REV-886. Хотя в последние годы было несколько сообщений о золотистых стафилококках, содержащих необычные SCCmec-элементы,

и о коагулазонегативных стафилококках с мозаичными и несколькими копиями SCCmec [9], по нашим данным, это первый случай одновременного присутствия 2 SCCmec-элементов в клиническом штамме S. aureus. Детальная структура этих элементов и их расположение в хромосоме еще не определены. В качестве метода «первой линии» в данном исследовании мы использовали MLVA. Этот метод дискриминировал наибольшее количество типов - 115; *spa*-типирование и MLST выявили соответственно 20 и 6 типов. Таким образом, MLVA оказался весьма дискриминирующим методом для типирования MRSA, как ранее сообщали R. Ikawaty и соавт. [14]. Кластеризация комбинированных данных MLVA/SCCmec распределила изоляты на 5 групп, которые очень хорошо соответствовали филогенетическим группам, определенным spaтипированием и MLST (см. рис. 2). Несмотря на общее соответствие между методами типирования, отмечены некоторые незначительные расхождения. Первое несоответствие обнаружено у пары штаммов, каждый из которых имел различные spa-типы, но одинаковый MLVA/SCC*mec*-профиль. В другом случае у каждого штамма из пары были идентичные MLVA/SCCmec-профили, но штаммы имели различные типы *spa* и ST. Эти противоречивые результаты можно объяснить тем, что MLVA, SCC*mec* и *spa*-типирование вместе с MLST базируются на различных молекулярных основах типирования. Например, MLVA, который должен иметь дискриминирующую способность, близкую к PFGE, не может обнаружить некоторые типы мутаций, которые не влияют на длину VNTR-локусов (например, одиночные нуклеотидные полиморфизмы).

Дискриминирующая способность MLVA основана на оценке длины определенных локусов, содержащих VNTR, которые изменяются очень быстро. Как *spa*, так и MLST-типирование основаны на оценке нуклеотидной последовательности. Наши исследования показали, что штамм, имеющий ST685, может быть кластеризован со штаммом, имеющим ST8 к тому же MLVA/SCC*mec*-профилю. Аллельный профиль ST8 таков: 3-3-1-1-4-4-3, а аллельный профиль ST685: 3-3-1-1-4-28-3. Таким образом, ST685 является одновариантным ST8 по локусу по tpi. Такая же ситуация наблюдалась, когда ST368 и ST239 были назначены штаммам с одинаковым MLVA/SCCmecпрофилем. Аллельные профили для ST239 и ST368 – это соответственно 2-3-1-1-4-4-3 и 2-3-1-1-4-65-3, следовательно, они отличаются лишь на 1 локус. Эти одиночные нуклеотидные замены не могут быть обнаружены с помощью MLVA [13].

Назначение различных *spa*-типов штаммам, относящимся к 1 MLVA/SCC*mec*-профилю, можно объяснить таким же образом. В случае *spa*-типирования секвенирование выполняется только для 1 локуса, содержащего VNTR, которые являются

высокоизменчивыми, поэтому дискриминирующая способность spa-типирования занимает промежуточное положение между MLVA и MLST. В случае MLST секвенирование выполняется по 7 локусам, соответствующим генам «домашнего хозяйства», которые не столь изменчивы, так как эти локусы весьма консервативны и развиваются очень медленно. Хотя 2 метода основаны на том же принципе, мы должны также принять во внимание участки генома, которые оцениваем, а именно частоту генетических событий в этих регионах [10]. В настоящее время в России преобладают *spa*-типы t008, t037, t030, t127, t024 и t129; они представляют большую часть международных эпидемических клонов. Наиболее широко представленный t008 может принадлежать к 3 различным ST (например, 8, 247 и 250) и иметь II или IV тип SCCmec. В России этот spa-тип относится к ST8 и обладает SCCmec IV. Аналогичная ситуация наблюдается в Австралии, Бельгии, Финляндии, Франции, Германии, Ирландии, Нидерландах, Норвегии, Тайване, Великобритании и США. ST8-IV принадлежит СС8 и, таким образом, представляет клон UK EMRSA-2/-6 в России [26]; spa-тип t024 близок к t008 и может быть частью ST8 и содержать SCCmec-типа II или IV. Этот *spa*-тип в России обладает IV типом SCCmec, является частью ST8 и также принадлежит СС8. Таким образом, клон UK EMRSA-2/-6 в России представлен следующими *spa*-типами: t008, t024 и t118.

Кроме того, в России, ST8-IV включает в себя такие *spa*-типы, как t068, t400,t068 и t7868, которые встречались однократно; *spa*-типы t030, t037 и t129 принадлежат ST239, который также является частью СС8, им присущи SCCmec типа III. Штаммы этих *spa*-типов являются 2-й по величине группой в России. Такие *spa*-типы могут быть обнаружены в Алжире, Аргентине, Австралии, Австрии, Бразилии, Чили, Китае, Чешской Республике, Финляндии, Германии, Греции, Индии, Индонезии, Корее, Монголии, Нидерландах, Польше, Португалии, Сингапуре, Словении, Испании, Шри-Ланке, Швейцарии, Таиланде, Великобритании, Уругвае, США и Вьетнаме. ST239-III является одной из самых распространенных генетических линией в мире, входит в СС8 и представляет собой так называемый бразильско-венгерский клон в России [1]. Генетическая линия СС8-ST239-III-t037 считается одним из самых успешных во всем мире клонов и в некоторых странах (Южная Корея, Гонконг, Тайвань и Вьетнам) даже распространяется во внебольничных условиях и в настоящее время рассматривается в качестве CA- MRSA [32]. ST1 включает в себя в России только *spa*-тип t127 — достаточно редкий в мире, с частотой изоляции 1,8% от общего количества золотистого стафилококка. Тем не менее этот *spa*-тип найден в Австрии, Бельгии, Канаде, Китае, Хорватии, Кипре, Дании, Габоне, Германии, Греции, Финляндии, Франции, Израиле, Индонезии, Кот-д'Ивуаре, Латвии, Ливане, Нидерландах, Новой Зеландии, Норвегии, Польше, Румынии, Южной Африке, Испании, Швеции, Швейцарии, Тайване, Великобритании, Объединенных Арабских Эмиратах и США. Штаммы этой линии принадлежат к СС1 и похожи на штаммы СС8 только по 2 локусам. Штамм ST154-IV включает в себя только t667; ST154 наиболее близкий к ST1, но они не могут сформировать один СС, потому что похожи только по 3 локусам из 7, в то время как штаммы, связанные СС, должны быть одинаковыми по крайней мере по 5 локусам. Со штаммами СС8 ST154 похож только по 1 локусу — glpf.

Популяция MRSA в стационарах России включает в себя небольшое чисто генетических групп. Это типичная ситуация для клональной популяционной структуры. Данные результаты согласуются с результатами ряда исследований, проведенных в различных регионах России, которые установили распространенность тех же линий [39, 42, 43]. Основными характеристиками клональной популяционной структуры являются: преобладание

нескольких линий в популяции, низкая частота рекомбинаций между различными клонами, незначительные различия между штаммами одной клональной линии. Передача золотистого стафилококка в основном происходит при непосредственном контакте (кожа – кожа), контакте с колонизированной поверхностью [2]. Осведомленность о преобладающих клональных линиях в различных регионах и о движении пациентов между больницами, очевидно, обеспечит основы для адекватных подходов к контролю за распространением MRSA [19]. В настоящее время в российских больницах отмечается гомогенная эпидемиологическая картина, так как те же типы штаммов находятся в разных регионах страны. Наиболее эффективными способами преодоления распространения HA-MRSA являются: скрининг пациентов на носительство MRSA при госпитализации, эрадикация носительства MRSA, соблюдение общегигиенических мер в медицинских учреждениях. Такие подходы способствуют предотвращению колонизации пациентов и горизонтального переноса мобильных генетических элементов [2].

ЛИТЕРАТУРА

- Albrecht N., Jatzwauk L., Slickers P. et al. Clonal replacement of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in a German university hospital over a period of eleven years // PLoS One. – 2011; 6 (11): 28189.
- Chambers H., Deleo F. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era // Nat. Rev. Microbiol. – 2009; 7 (9): 629–41.
- CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne PA. – Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2012.
- Cookson B., Robinson D., Monk A. et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains: the HARMONY collection // J. Clin. Microbiol. – 2007; 45 (6): 1830–7.
- Deurenberg R., Vink C., Kalenic S. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus // Clin. Microbiol. Infect. – 2007; 13 (3): 222–35.
- DeWoody J., Schupp J., Kenefic L. et al. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping // Biotechniques. – 2004; 37 (3): 348, 350, 352.
- Enright M., Day N., Davies C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus // J. Clin. Microbiol. 2000; 38 (3): 1008–15.
- Frenay H., Bunschoten A., Schouls L. et al. Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus on the basis of protein A gene polymorphism // Eur. J. Clin. Microbiol, Infect. Dis. – 1996: 15 (1): 60–4.
- Hanssen A., Sollid J. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in Staphylococcus aureus and

- coagulase-negative staphylococci from Norway // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2007; 51 (5): 1671–7.
- 10. Hardy K., Oppenheim B., Gossain S. et al. Use of variations in staphylococcal interspersed repeat units for molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains // J. Clin. Microbiol. – 2006; 44 (1): 271–3.
- 11. Hardy K., Ussery D., Oppenheim B. et al. Distribution and characterization of staphylococcal interspersed repeat units (SIRUs) and potential use for strain differentiation // Microbiology. – 2004; 150 (12): 4045–52.
- 12. Harmsen D., Claus H., Witte W. et al. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management // J. Clin. Microbiol. – 2003; 41 (12): 5442–8.
- 13. Huijsdens X., Bosch T., van Santen-Verheuvel M. et al. Molecular characterisation of PFGE non-typable methicillin-resistant Staphylococcus aureus in The Netherlands, 2007 // Euro. Surveill. 2009; 14 (38).
- 14. Ikawaty R., Willems R., Box A. et al. Novel multiple-locus variable-number tandemrepeat analysis method for rapid molecular typing of human Staphylococcus aureus // J. Clin. Microbiol. – 2008; 46 (9): 3147–51.
- 15. Isobe H., Takano T., Nishiyama A. et al. Evolution and virulence of Panton-Valentine leukocidin-positive ST30 methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the past 30 years in Japan // Biomed. Res. 2012; 33 (2): 97–109.
- 16. IWG-SCC Classification of staphylococcal cassettechromosomemec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements // Antimicrob Agents. Chemother. – 2009; 53 (12): 4961–7.
- 17. Kahl B., Mellmann A., Deiwick S. et al. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects

- two independent mechanisms of genetic change in Staphylococcus aureus // J. Clin. Microbiol. 2005; 43 (1): 502–5.
- Klein E., Smith D., Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillinresistant Staphylococcus aureus, United States, 1999–2005 // Emerg. Infect. Dis. 2007: 13 (12): 1840–6.
- Kock R., Mellmann A., Schaumburg F. et al. The epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Germany // Dtsch. Arztebl. Int. – 2011; 108 (45): 761-7.
- 20. Lina G., Piemont Y., Godail-Gamot F. et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia // Clin. Infect. Dis. – 1999; 29 (5): 1128–32.
- 21. Lindsay J. Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus // Int. J. Med. Microbiol. 2010; 300 (2–3): 98–103.
- 22. Lowy F. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus // J. Clin. Invest. 2003; 111 (9): 1265–73.
- Lu P., Chang J., Hsu H. et al. One tube multiplex PCR for simple screening of SCCmec I-V types of methicillin-resistant Staphylococcus aureus // J. Chemother. 2008; 20 (6): 690-6.
- 24. Mariem B., Ito T., Zhang M. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant Panton-valentine leukocidin positive staphylococcus aureus clones disseminating in Tunisian hospitals and in the community // BMC Microbiol. – 2013; 13: 2.
- 25. Milheirico C., Oliveira D., de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: 'SCCmec IV multiplex' // J. Antimicrob. Chemother. 2007; 60 (1): 42–8.
- Monecke S., Coombs G., Shore A. et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant Sta-

- phylococcus aureus // PLoS One. 2011; 6 (4): 17936.
- Noto M., Kreiswirth B., Monk A. et al. Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in Staphylococcus aureus // J. Bacteriol. – 2008; 190 (4): 1276–83.
- 28. Plata K., Rosato A., Wegrzyn G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity // Acta. Biochim. Pol. 2009; 56 (4): 597–612.
- Pourcel C., Hormigos K., Onteniente L. et al. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for Staphylococcus aureus genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value // J. Clin. Microbiol. – 2009: 47 (10): 3121–8.
- 30. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W. et al. New method for typing Staphylococcus aureus strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates // J. Clin. Microbiol. 2003; 41 (4): 1801–4.
- 31. Schouls L., Spalburg E., van Luit M. et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of Staphylococcus aureus: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing // PLoS One. – 2009; 4 (4): 5082.
- **32.** Song J., Hsueh P., Chung D. et al. Spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus

- between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study // J. Antimicrob. Chemother. – 2011; 66 (5): 1061–9
- 33. Stefani S., Chung D., Lindsay J. et al. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2012; 39 (4): 273–82.
- 34. Strommenger B., Braulke C., Heuck D. et al. spa Typing of Staphylococcus aureus as a frontline tool in epidemiological typing // J. Clin. Microbiol. – 2008; 46 (2): 574–81.
- 35. Turlej A., Hryniewicz W., Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview // Pol. J. Microbiol. – 2011; 60 (2): 95–103.
- 36. van Belkum A., Tassios P., Dijkshoorn L. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology // Clin. Microbiol. Infect. – 2007; 13 (Suppl 3): 1–46.
- 37. van der Zee A., Roorda L., Hendriks W. et al. Detection of novel chromosome-SCCmec variants in Methicillin Resistant Staphylococcus aureus and their inclusion in PCR based screening // BMC Res. Notes. – 2011; 4: 150.
- Vandenesch F., Lina G., Gillet Y. et al. (The end of the controversy: Panton Valentine is the culprit) // Med. Sci (Paris). – 2009; 25 (11): 984–6.
- 39. Vorobieva V., Bazhukova T., Hanssen A.

- et al. Clinical isolates of Staphylococcus aureus from the Arkhangelsk region, Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Panton-Valentine leukocidin genes // APMIS. – 2008; 116 (10): 877–87.
- 40. Wang X., Huang B., Blair B. et al. Selection of optimal combinations of loci by the Optimal Combination Finder computer program from a group of variable number tandem repeat loci for use in Staphylococcus aureus food poisoning case investigations // J. Med. Microbiol. – 2012; 61 (5): 631–9.
- 41. Дехнич А.В., Никулин А.А., Рябкова Е.Л. и др. Эпидемиология резистентности штаммов S. aureus, выделенных от пациентов в ОРИТ российских стационаров: результаты многоцентрового исследования // Клин. микробиол. и антимикр. химиотер. – 2008; 10 (4): 333–44.
- 42. Дмитренко О.А. Молекулярногенетические аспекты эпидемиологии внутрибольничных инфекций, вызванных представителями вида Staphylococcus aureus, устойчивыми к метициллину/ оксациллину. Дисс... докт. мед. наук. – 2008.
- 43. Хохлова О.Е., Вей-Чун Хунг, Хигучи В. и др. Выявление венгерского пандемического клона MRSA в России // Клин. микробиол. и антимикр. химиотер. 2011; 13 (2): 101–200.

