

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

ПАТОГЕНЕЗ

Научно-практический журнал

Основан в 2003 году
Выходит 4 раза в год

Том 13, №4, 2015

ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ

Главный редактор
КУБАТИЕВ А.А. (Москва)

Соредакторы
Дыгай А.М. (Томск), Корнева Е.А. (Санкт-Петербург), Морозов С.Г. (Москва)

Ответственный секретарь
Карганов М.Ю. (Москва)

Редакционная коллегия

Арчаков А.И. (Москва), Афтанас Л.И. (Новосибирск), Баранов В.М. (Москва), Береговых В. В. (Москва), Бобрышев Ю.В. (Сидней, Австралия), Гинтер Е.К. (Москва), Грачев С.В. (Москва), Дауни Г.Ф. (Форт-Уэрт, США), Кашкин К.П. (Москва), Кжишковска Ю.Г. (Гейдельберг, Германия), Колесников С.И. (Москва), Кушлинский Н.Е. (Москва), Манухина Е.Б. (Форт-Уэрт, США), Нинкина Н.Н. (Кардифф, Великобритания), Новицкий В.В. (Томск), Пальцев М.А. (Москва), Панченко Л.Ф. (Москва), Петров В.И. (Волгоград), Пузырев В.П. (Томск), Ревивили А.Ш. (Москва), Репин В.С. (Москва), Сандриков В.А. (Москва), Софронов Г.А. (Санкт-Петербург), Сухих Г.Т. (Москва), Тутельян В.А. (Москва), Угрюмов М.В. (Москва), Франк Г.А. (Москва), Черешнев В.А. (Екатеринбург), Чехонин В.П. (Москва), Шабалин В.Н. (Москва), Швец В.И. (Москва), Шляхто Е.В. (Санкт-Петербург), Юрков В.А. (Москва)

Зав. редакцией Иришкин Д.А.
Научный редактор Чернобровкина Т.В.
Технический редактор Комарова А.К.

Внимание авторов и читателей: рукописи и иллюстрации не возвращаются. При перепечатке материалов согласование с редакцией журнала «Патогенез» обязательно.
За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.
Журнал зарегистрирован в Федеральном агентстве по печати и массовым коммуникациям. Регистрационный номер ПИ № 77-12736 от 27 мая 2002 г. ISSN 2310-0435
Почтовый адрес редакции: 125315, Москва, а/я 9. e-mail: genius-media@mail.ru; тел.: +7 (495) 518-1451
Формат 210x290 мм. Бумага офсетная.
Подписано в печать 20.03.2016. Тираж 300 экз. Отпечатано в типографии «OneBook», Москва.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук
ООО Издательство «Гениус Медиа».

Federal State Budgetary Scientific Institution
«Institute of General Pathology and Pathophysiology»

PATHOGENESIS

Journal of Basic and Applied Medicine

Founded in 2003
Quarterly issue

Volume 13, №4, 2015

October—December

Editor-in-Chief
A.A. KUBATIEV (Moscow)

Co-editors
A.M. Dygay (Tomsk), E.A. Korneva (Saint-Petersburg), S.G. Morozov (Moscow)

Secretary
M.Yu. Karganov (Moscow)

Editorial board

Archakov A.I. (Moscow), Aftanas L.I. (Novosibirsk), Baranov V.M. (Moscow), Beregovykh V.V. (Moscow), Bobryshev Y.V. (Sydney, Australia), Ginter E.K. (Moscow), Grachev S.V. (Moscow), Downey H.F. (Fort Worth, USA), Kashkin K.P. (Moscow), Kzhyshkowska J.G. (Heidelberg, Germany), Kolesnikov S.I. (Moscow), Kushlinskii N.E. (Moscow), Manukhina E.B. (Fort Worth, USA), Ninkina N.N. (Cardiff, United Kingdom), Novitskiy V.V. (Tomsk), Paltsev M.A. (Moscow), Panchenko L.F. (Moscow), Petrov V.I. (Volgograd), Puzyrev V.P. (Tomsk), Revishvili A.Sh. (Moscow), Repin V.S. (Moscow), Sandrikov V.A. (Moscow), Sofronov G.A. (Saint-Petersburg), Sukhikh G.T. (Moscow), Tutelian V.A. (Moscow), Ugriumov M.V. (Moscow), Frank G.A. (Moscow), Chereshev V.A. (Ekaterinburg), Chekhonin V.P. (Moscow), Shabalin V.N. (Moscow), Shvets V.I. (Moscow), Shliakhto E.V. (Saint-Petersburg), Yurkiv V.A. (Moscow)

Publish Department chief Irishkin D.A.
Scientific editor Chernobrovkina T.V.
Technical editor Komarova A.K.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОРЫ

- Оберлис Д., Скальный А.В., Скальная М.Г.,
Никоноров А.А., Никонорова Е.А.**
Патофизиология микроэлементозов.
Сообщение 1. Введение 4
- Оберлис Д., Скальный А.В., Скальная М.Г.,
Никоноров А.А., Никонорова Е.А.**
Патофизиология микроэлементозов.
Сообщение 2. Цинк 8
- Тиньков А.А., Айсывакова О.П., Скальная М.Г.,
Попова Е.В., Синицкий А.И., Немерешина О.Н.,
Гатиатулина Е.Р., Скальный А.В., Никоноров А.А.**
Универсальные механизмы токсичности ртути 18
- Карагодин В.П., Мельниченко А.А., Орехов А.Н.**
Белки-хемокины:
роль в канцерогенезе и воспалении 25

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Кожина К.В., Сабурова И.Н., Горкун А.А., Зурина И.М.,
Кошелева Н.В., Волкова Е.Н., Морозов С.Г.**
Сравнительный анализ воздействия р199
на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов человека 35
- Елистратова И.В., Тарасова М.В., Морозов С.Г.**
Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами
крови больных atopическим дерматитом в молодом возрасте 42
- Ефимова О.И., Попов К.В., Петренко Н.В., Анохин К.В.**
Многоцветная флуоресцентная иммуногистохимическая окраска
префронтальной коры человека 48
- Ланда С.Б., Иванов А.В., Комличенко Е.В., Филатов М.В.**
Регистрация изотипического состава иммунных комплексов
как новая диагностическая процедура 52
- Гильяно Н.Я., Конева Л.В., Журишкина Е.В.,
Степанов С.И., Носкин Л.А.**
Влияние низких доз излучения итербия-169
на пролиферацию и гибель клеток человека в культуре 58
- Чернова Е.В., Кириченко Т.В., Орехова В.А.,
Никитина Н.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н.,
Жираль Ф., Собенин И.А.**
Липопротеиды плазмы крови и вариабельность толщины
интима-медиаляного слоя сонных артерий:
сравнение московской и парижской популяций 63

REVIEWS

- Oberleas D., Skalny A.V., Skalaya M.G.,
Nikonorov A.A., Nikonorova E.A.**
Pathophysiology of microelementoses.
Post 1. Introduction 4
- Oberleas D., Skalny A.V., Skalaya M.G.,
Nikonorov A.A., Nikonorova E.A.**
Pathophysiology of microelementoses.
Post 2. Zinc 8
- Tinkov A.A., Ajsuvakova O.P., Skalnaya M.G.,
Popova E.V., Sinitkiy A.I., Nemereshina O.N.,
Gatiatulina E.R., Skalny A.V., Nikonorov A.A.**
Universal mechanisms of mercury toxicity 18
- Karagodin V.P., Melnichenko A.F., Orekhov A.N.**
Proteins-chemokines:
the role in carcinogenesis and inflammation 25

ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Kozhina K.V., Saburina I.N., Gorkun A.A., Zurina I.N.,
Kosheleva N.V., Volkova E.N., Morozov S.G.**
Comparative study of p199 effect
on 2D and 3D cultures of human dermal fibroblasts 35
- Elistratova I.V., Tarasova M.V., Morozov S.G.**
Superoxide anion releasing by neutrophils
from young adult atopic dermatitis patients 42
- Efimova O.I., Popov K.V., Petrenko N.V., Anokhin K.V.**
Multicolor fluorescence immunohistochemistry
of human prefrontal cortex 48
- Landa S.B., Ivanov A.V., Komlichenko E.V., Filatov M.V.**
Registration of isotype composition of immune complexes
as a new diagnostic procedure 52
- Giliano N.Ya., Konevega L.V., Stepanov S.I.,
Zhurishkina E.V., Noskin L.A.**
Effect of low doses of radiation 169Yb-
on proliferation and cell death in human cells in culture 58
- Chernova E.V., Kirichenko T.V., Orekhova V.A.,
Nikitina N.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N.,
Giral P., Sobenin I.A.**
Lipoproteins in blood plasma and variability
of the intima-media thickness of the carotid arteries:
comparative analysis of the Moscow and Paris population 63

Патофизиология микроэлементозов.

Сообщение 1. Введение

Оберлис Д.¹, Скальный А.В.^{2,4}, Скальная М.Г.², Никоноров А.А.³, Никонорова Е.А.²

¹ — Техасский технический университет, шт. Техас, США

² — АНО «Центр биотической медицины» — Сателлитный центр института микроэлементов ЮНЕСКО, Москва

³ — Оренбургский государственный медицинский университет, г.Оренбург

⁴ — Оренбургский государственный университет, г.Оренбург

В сообщении 1 представлены фундаментальные и прикладные аспекты биологической роли элементов. Рассмотрены положительные и отрицательные эффекты макро- и микроэлементов на организм, дана оценка их роли в патогенезе и саногенезе заболеваний. Приведена классификация микроэлементозов с краткой характеристикой.

Ключевые слова: микроэлементы, макроэлементы, ультрамикроэлементы, патофизиология микроэлементозов

Проблема участия макро- и микроэлементов в патогенезе многих заболеваний является весьма актуальной [1—4]. Дефицит ряда эссенциальных микроэлементов (селен, цинк, железо, йод, марганец) и интоксикация токсичными микроэлементами (ртуть, свинец, мышьяк) способствуют росту частоты злокачественных новообразований кожи, мозга, желудочно-кишечного тракта, лимфопролиферативных заболеваний, инфекционных патологий, аутоиммунных заболеваний, дегенеративных заболеваний (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, болезнь Альцгеймера) [5—10].

По классификации, основанной на количественном признаке, все химические элементы делятся на три группы в соответствии с их содержанием в организме: макроэлементы, микроэлементы (МЭ) и ультрамикроэлементы.

Система классификации по количественному признаку проста и удобна, но она не дает ответа на главный вопрос — какова биологическая роль того или иного элемента в организме [11]. Кроме того, количественное содержание некоторых элементов в организме может значительно варьировать в зависимости от среды обитания человека, его рациона питания и характера трудовой деятельности [12—18].

Классификация химических элементов по их биологической роли позволяет подразделить все элементы на группы эссенциальных, условно эссенциальных и токсических. Группа эссенциальных элементов включает в себя все макроэлементы, часть микро- и ультрамикроэлементов. В нее входят кальций, фосфор, сера, магний, железо, медь, кобальт, калий, хлор, натрий, цинк, марганец, молибден, йод, селен. Это подтверждает мысль о том, что порядок концентрации того или иного микроэлемента в организме еще не определяет его биологического значения. Вторую значительную группу элементов составляют условно-эссенциальные микроэлементы (фтор, бор, кремний, титан, ванадий, хром, никель, мышьяк, бром, стронций, литий). К токсичным микроэлементам обычно относят олово, свинец, кадмий, ртуть, алюминий, таллий, висмут, бериллий.

Сложность проблемы состоит в том, что сами эссенциальные МЭ при определенных условиях могут вызывать токсичные реакции, а отдельные токсические МЭ при определенной дозировке и экспозиции могут обнаруживать свойства эссенциальных МЭ, т.е. оказываться полезными и даже жизненно важными (таблица) [4, 5, 19, 20].

По мнению ряда исследователей, микро- и ультрамикроэлементы вообще не следует отождествлять с минеральными веществами по той причине, что в организме они содержатся главным образом в виде органических соединений или комплексов, обладающих биологической активностью [21]. Однако это обстоятельство, по-видимому, не может быть основанием для обособления микроэлементов в особую группу биологически активных веществ.

С точки же зрения науки о питании микроэлементы являются столь же необходимыми компонентами питания, как и другие нутриенты, независимо от того, в какой форме и количествах они поступают в организм [22, 23].

Элемент может быть отнесен к группе эссенциальных, если он удовлетворяет следующим требованиям:

- постоянно присутствует в организме в количествах, сходных у разных индивидуумов;
- ткани по содержанию данного элемента всегда располагаются в определенном порядке;
- синтетический рацион, не содержащий этого элемента, вызывает у животных характерные симптомы недостаточности и определенные биохимические изменения в тканях;
- эти симптомы и изменения могут быть предотвращены или устранены путем добавления данного элемента в пищу.

Вероятно, что необходимые элементы (или условно-эссенциальные) также можно обнаружить в различных биосредах в относительно стабильных количествах, однако они не удовлетворяют всем перечисленным выше требованиям. Участие этих элементов в обменных процессах может ограничиваться отдельными тканями и в ряде случаев требует экспериментального подтверждения.

Однако строго ограничивать группу биогенных элементов тоже нельзя, поскольку возможно открытие биологической роли новых элементов. Например, в последние десятилетия установлена биотическая роль селена, появились экспериментальные и клинические данные об участии в метаболических процессах фтора, хрома, кремния, мышьяка [5, 16, 17, 19, 23, 24].

Классификация элементов по степени их биогенности имеет существенные недостатки: она имеет слишком общий вид, не отражает механизма влияния химических элементов на организм и не позволяет достаточно точно

предвидеть возможную биологическую роль или токсикологический эффект того или иного элемента [14]. В настоящее время исследователи вынуждены давать индивидуальную оценку каждому элементу [8, 25].

Обилие предложенных классификаций уже само по себе свидетельствует об их несовершенстве. Действительно, «структурные» элементы одновременно являются «эссенциальными», в свою очередь, «эссенциальные» при определенных условиях становятся «токсическими», а «токсические» элементы в малых концентрациях могут быть полезными и даже необходимыми для организма. Поэтому некоторые из токсических элементов, такие, как Cd, Pb, Al, Rb, называют «серьезными кандидатами на эссенциальность». Таким образом, огромная и разнообразная роль химических элементов в процессах жизнедеятельности и недостаточная изученность этой проблемы делают невозможным при современном уровне знаний создание единой совершенной классификации.

Разумеется, роль многих химических элементов в организме в настоящее время еще до конца не выяснена. Однако с достаточной уверенностью можно предположить, что список необходимых для жизни «эссенциальных» элементов будет расширяться, пополняясь за счет «токсичных» элементов и тех элементов, чья биологическая роль пока еще недостаточно ясна.

Что же касается рассмотренных выше классификаций, то, по-видимому, наиболее распространенным в настоящее время является деление химических элементов (с биологической точки зрения) на органогены, макро-, микро- и ультрамикроэлементы. Хотя это деление является чисто условным, в его основу положен достоверный факт, свидетельствующий о том, что отдельные химические элементы в организме содержатся в различных количествах. Кроме того, исторически сложилось так, что с макроэлементами в большей мере связываются представления о «структурных» функциях, с микроэлементами — биохимическая и физиологическая активность, несоизмеримая с их малым содержанием в человеческом теле, а с ультрамикроэлементами — токсичность и недостаточная изученность их роли в организме.

В нашей стране по предложению академика РАМН А.П. Авцына для обозначения всех патологических процессов, вызванных дефицитом, избытком или дисбалансом макро- и микроэлементов, введено понятие микроэментозов, классификация которых приведена в таблице. Под микроэментозами человека понимают состояния дефицита, избытка или дисбаланса химических элементов, которые естественным образом отражаются на его здоровье.

Учение о микроэментозах дает представление о причинах возникновения заболеваний, связанных с дефицитом, избытком или дисбалансом химических элементов в организме. Однако в практической медицине это учение получило ограниченное распространение, так как оно, по нашему мнению, слишком детализирует эти причины. При углубленном (более внимательном) рассмотрении проблемы элементозависимой патологии видно, что терминологическая разнообразность усложняет понимание природы элементозов широкими кругами врачебной и научной общественности и, по большому счету, приводит к парадоксальному эффекту упрощенного понимания проблемы: много-, мало-, моно-, поли-, природный — техногенный и т.д.

Однако, по существу, при рассмотрении проблем, связанных с этиопатогенезом элементозов, видно, что, во-первых, изолированных гипо- или гиперэлементозов, так же, как и моноэлементозов, не бывает (может быть, за исключением случаев острого отравления), — все элементозы — результат дисбаланса биоэлементов в организме; во-вторых, все элементозы могут быть разделены всего лишь на 2 группы по их происхождению — экзогенные и дизрегуляторные [26], то есть эндогенные.

В-третьих, следует всегда отдавать себе отчет, что элементозы — это, как правило, не какие-то вновь открытые заболевания, это обозначение изменений в элементном составе и связанных с ними изменений функций живых организмов, в том числе, на фоне хронических процессов, т.е. элементозы в этих случаях являются следствием дизрегуляторной патологии различных органов и систем.

Таблица

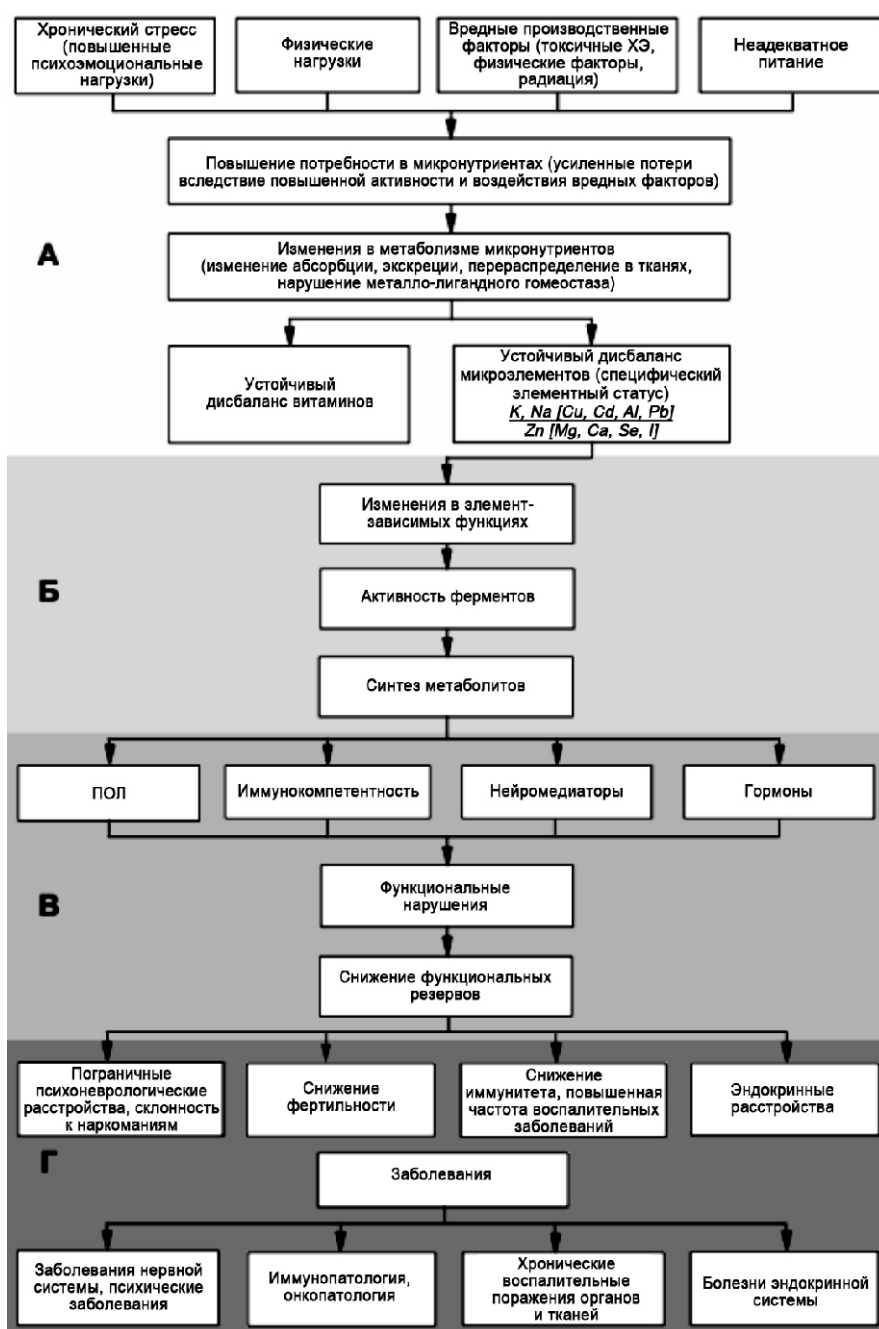
Рабочая классификация микроэментозов (МТОЗ) человека [5]

МТОЗы	Основные формы заболеваний	Краткая характеристика
Природные Эндогенные	1. Врожденные 2. Наследственные	При врожденных микроэментозах в основе заболевания может лежать микроэментоз матери. При наследственных микроэментозах недостаточность, избыток или дисбаланс МЭ вызываются патологией хромосом или генов.
Природные Экзогенные	1. Вызванные дефицитом МЭ 2. Вызванные избытком МЭ 3. Вызванные дисбалансом МЭ	Природные, т.е. не связанные с деятельностью человека и приуроченные к определенным географическим локациям эндемические заболевания людей, нередко сопровождающиеся теми или иными патологическими признаками у животных и растений
Техногенные	1. Промышленные (профессиональные) 2. Соседские 3. Трансгрессивные	Связанные с производственной деятельностью человека болезни и синдромы, вызванные избытком определенных МЭ и их соединений непосредственно в зоне самого производства; по соседству с производством; в значительном отдалении от производства за счет воздушного или водного переноса МЭ
Ятрогенные	1. Вызванные дефицитом МЭ 2. Вызванные избытком МЭ 3. Вызванные дисбалансом МЭ	Быстро увеличивающееся число заболеваний и синдромов, связанных с интенсивным лечением разных болезней препаратами, содержащими МЭ, а также с поддерживающей терапией (например, с полным парентеральным питанием) и с некоторыми лечебными процедурами — диализом, не обеспечивающим организм необходимым уровнем жизненно важных МЭ

Хронический экзогенный дефицит или избыток химических элементов может длительное время регуляторно компенсироваться в пределах нормальных функций организма (стадия метаболической компенсации по V.Mertz, 1986), например, вследствие увеличения или снижения степени резорбции в ЖКТ, целенаправленной коррекции поступления химических элементов с пищей (диетотерапия) или путем приема витаминно-минеральных комплексов и других препаратов, содержащих макро- и микроэлементы (рис. Б) [27–28]. Экзогенный дефицит/избыток химических элементов может быть следствием как дефицита/избытка поступления собственно химических элементов и/или различных биологидов, макронутриентов (белки, жиры, углеводы), воды, пищевых волокон, фитатов и др.

При срыве механизмов метаболической компенсации (рис. В, Г), т.е. возникновении дисрегуляции экзогенный дисэлементоз превращается в дисрегуляционный, что знаменует собой начало перехода из состояния предболезни в болезнь как стойкую, зачастую необратимую дисрегуляцию на системном уровне (болезнь дисрегуляции по Г.Н. Крыжановскому, 2002). Экзогенный дефицит до наступления этого периода проявлялся только на молекулярном и клеточном, а после — на тканевом, органном и организменном уровнях [4].

Таким образом, дисбаланс микроэлементов можно рассматривать как пусковой механизм дисрегуляционной патологии, а его коррекцию — как саногенетический механизм [13, 30, 31].



Патогенез развития элементозов и их влияние на уровень функциональных резервов и состояние здоровья человека.

А — стадия начального дисбаланса микронутриентов; Б — стадия метаболической компенсации; В — стадия метаболической декомпенсации; Г — стадия клинического дисбаланса [29].

Список литературы

1. Патофизиология обмена веществ: учебное пособие / Под ред. Цыгана В.Н. — СПб.: СпецЛит, 2013. — 335 с.
2. Барашков Г.К. Медицинская бионеорганика. Основы. Аналитика. Клиника. — М.: Бинум, 2011. — 512 с.
3. Панченко Л.Ф., Маев И.В., Гуревич К.Г. Клиническая биохимия микроэлементов. — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004. — 368 с.
4. Цыган В.Н., Камилова Т.А., Скальный А.В., Цыган Н.В., Долго-Собуров В.Б. Патофизиология клетки. — СПб: ЭЛБИ-СПб., 2014. — 128 с.
5. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. — М.: Медицина, 1991. — 496 с.
6. Oberlis D., Harland B., Skal'nyj A. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. — СПб.: Наука, 2008. — 544 с.
7. Скальный А.В., Кудрин А.В. Радиация, микроэлементы, антиоксиданты и иммунитет. — М.: Лир Макет, 2000. — 457 с.
8. Скальный А.В., Рудаков И.А. Биоэлементы в медицине. — М.: Издательский дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. — 272 с.
9. Сусликов В.Л. Геохимическая экология болезней: в 4 т. Т.4: Атеросклероз. — Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2011. — 380 с.
10. Prasad A.S. Zinc in humans: health disorders and therapeutic effects // Микроэлементы в медицине. — 2014. — Т. 15, № 1. — С. 3—12.
11. Ковальский В.В. Геохимическая экология. — М.: Наука, 1974. — 300 с.
12. Агаджанян Н.А., Велданова М.В., Скальный А.В. Экологический портрет человека и роль микроэлементов. — М., 2001. — 236 с.
13. Агаджанян Н.А., Скальный А.В., Детков В.Ю. Элементный портрет человека: заболеваемость, демография и проблема управления здоровьем нации // Экология человека. — 2013. — №11. — С. 3—12.
14. Георгиевский В.И., Анненков Б.Н., Самохин В.Т. Минеральное питание животных. — М.: Колос, 1979. — 465 с.
15. Сусликов В.Л. Геохимическая экология болезней. Т.1. Диалектика биосферы и ноосферы. — М.: Гелиос АРВ, 1999. — 410 с.
16. Сусликов В.Л. Геохимическая экология болезней. Т.2. Атомовиты. — М.: Гелиос АРВ, 2000. — 672 с.
17. Сусликов В.Л. Геохимическая экология болезней. Т.3. Атомовитозы. — М.: Гелиос АРВ, 2002. — 670 с.
18. Элементный статус населения России. Часть 1. Общие вопросы и современные методические подходы к оценке элементного статуса индивидуума и популяции / Под ред. А.В. Скального, М.Ф. Киселева. — СПб.: Медкнига «Элби-СПб», 2010. — 416 с.
19. Anke M. Essential and toxic effects of macro trace and ultratrace elements in the nutrition of man // Elements of their compounds in the environment. — 2004. — Vol. 1. — P. 343—367.
20. Nielsen F.H., Milne D.B. A moderately high intake compared to a low intake of zinc depresses magnesium balance and alters indices of bone turnover in postmenopausal women // Eur. J. Clin. Nutr. — 2004. — May. — Vol. 58(5). — P. 703—710.
21. Крисс Е.Ф., Волченкова И.И., Григорьева А.С. и др. Координационные соединения металлов в медицине. — Киев: Наукова думка, 1986. — 216 с.
22. Скальная М.Г., Нотова С.В. Макро- и микроэлементы в питании современного человека: эколого-физиологические и социальные аспекты. — М.: РОСМЭМ, 2004. — 310 с.
23. Тутельян В.А., Вялков А.И., Разумов А.Н., Михайлов В.И., Москаленко К.А. Научные основы здорового питания. — М.: Издательский дом «Панорама», 2010. — 839 с.
24. Голубкина Н.А., Скальный А.В., Соколов Я.А., Шелкунов Л.Ф. Селен в медицине и экологии. — М.: Изд-во КМК, 2002. — 134 с.
25. Москалев Ю.И. Минеральный обмен. — М.: Медицина, 1985. — 288 с.
26. Крыжановский Г.Н. и др. Дизрегуляторная патология: Рук. для врачей и биологов. — М.: Медицина, 2002. — 630 с.
27. Дубовой Р.М., Фролова О.О., Бурцева Т.И. и др. Опыт использования БАД к пище для коррекции экологозависимых состояний // Вестник восстановительной медицины. — 2009. — № 4. — С. 38—41.
28. Некрасов В.И., Скальный А.В. Элементный статус лиц вредных и опасных профессий. — М.: РОСМЭМ, 2006. — 229 с.

29. Некрасов В.И. Микронутриентная обеспеченность рационов питания, элементный статус и уровень функциональных резервов у лиц опасных профессий: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2007. — 42 с.

30. Ибрагимова М.Я., Сабирова Л.Я., Березкина Е.С., Скальная М.Г., Жданов Р.И., Скальный А.В. Взаимосвязь дисбаланса макро- и микроэлементов и здоровье населения (обзор литературы) // Казанский медицинский журнал. — 2011. — Т. 92, № 4. — С. 606—609.

31. Skal'nyj A.V. Bioelements and bioelementology in pharmacology and nutrition: fundamental and practical aspects // Pharmacology and nutritional intervention in the treatment of disease / Ed. by Faik Atroshi. — 2014. — P. 225—240.

Поступила 12.09.2015

References

1. Patofiziologija obmena veshhestv: uchebnoe posobie / Pod red. Cygana V.N. — SPb.: SpecLit, 2013. — 335 s.
2. Barashkov G.K. Medicinskaja bioneorganika. Osnovy. Analitika. Klinika. — M.: Binom, 2011. — 512 s.
3. Panchenko L.F., Maev I.V., Gurevich K.G. Klinicheskaja biohimiya mikrojelementov. — M.: GOU VUNMC MZ RF, 2004. — 368 s.
4. Cygan V.N., Kamilova T.A., Skal'nyj A.V., Cygan N.V., Dolgo-Soburov V.B. Patofiziologija kletki. — SPb: JeLBI-SPb., 2014. — 128 s.
5. Avsyn A.P., Zhavoronkov A.A., Rish M.A., Strohckova L.S. Mikrojelementozy cheloveka. — M.: Medicina, 1991. — 496 s.
6. Oberlis D., Harland B., Skal'nyj A. Biologicheskaja rol' makro- i mikrojelementov u cheloveka i zhivotnyh. — SPb.: Nauka, 2008. — 544 s.
7. Skal'nyj A.V., Kudrin A.V. Radiacija, mikrojelementy, antioksidanty i immunitet. — M.: Lir Maket, 2000. — 457 s.
8. Skal'nyj A.V., Rudakov I.A. Biojelementy v medicine. — M.: Izdatel'skij dom «Oniks 21 vek»: Mir, 2004. — 272 s.
9. Suslikov V.L. Geohimicheskaja jekologija boleznej: v 4 t. T.4: Ateroskleroz. — Cheboksary: Izd-vo Chuvash. un-ta, 2011. — 380 s.
10. Prasad A.S. Zinc in humans: health disorders and therapeutic effects. Mikrojelementy v medicine. 2014; 15 (1): 3—12.
11. Koval'skij V.V. Geohimicheskaja jekologija. — M.: Nauka, 1974. — 300 s.
12. Agadzhanjan N.A., Veldanova M.V., Skal'nyj A.V. Jekologicheskij portret cheloveka i rol' mikrojelementov. — M., 2001. — 236 s.
13. Agadzhanjan N.A., Skal'nyj A.V., Detkov V.Ju. Jelementnyj portret cheloveka: zaboлеваemost', demografija i problema upravlenija zdorov'em nacji. Jekologija cheloveka. 2013; № 11: 3—12.
14. Georgievskij V.I., Annenkov B.N., Samohin V.T. Mineral'noe pitanie zhivotnyh. — M.: Kolos, 1979. — 465 s.
15. Suslikov V.L. Geohimicheskaja jekologija boleznej. T.1. Diialektika biosfery i noosfery. — M.: Gelios ARV, 1999. — 410 s.
16. Suslikov V.L. Geohimicheskaja jekologija boleznej. T.2. Atomovity. — M.: Gelios ARV, 2000. — 672 s.
17. Suslikov V.L. Geohimicheskaja jekologija boleznej. T.3. Atomovitozy. — M.: Gelios ARV, 2002. — 670 s.
18. Jelementnyj status naselenija Rossii. Chast' 1. Obshhie voprosy i sovremennye metodicheskie podhody k ocenke jelementnogo statusa individuumy i populjacji / Pod red. A.V. Skal'nogo, M.F. Kiseleva. — SPb.: Medkniga «Jelbi-SPb», 2010. — 416 s.
19. Anke M. Essential and toxic effects of macro trace and ultratrace elements in the nutrition of man. Elements of their compounds in the environment. 2004; 1: 343—367.
20. Nielsen F.H., Milne D.B. A moderately high intake compared to a low intake of zinc depresses magnesium balance and alters indices of bone turnover in postmenopausal women. Eur. J. Clin. Nutr. 2004. May; 58(5): 703—710.
21. Kriss E.F., Volchenskova I.I., Grigor'eva A.S. i dr. Koordinacionnye soedinenija metallov v medicine. — Kiev: Naukova dumka, 1986. — 216 s.
22. Skal'naja M.G., Notova S.V. Makro- i mikrojelementy v pitanii sovremennogo cheloveka: jekologo-fiziologicheskie i social'nye aspekty. — M.: ROSMJeM, 2004. — 310 s.
23. Tutel'jan V.A., Vjalkov A.I., Razumov A.N., Mihajlov V.I., Moskalenko K.A. Nauchnye osnovy zdorovogo pitania. — M.: Izdatel'skij dom «Panorama», 2010. — 839 s.
24. Golubkina N.A., Skal'nyj A.V., Sokolov Ja.A., Shhelkunov L.F. Selen v medicine i jekologii. — M.: Izd-vo KMK, 2002. — 134 s.

25. Moskalev Ju.I. Mineral'nyj obmen. — M.: Medicina, 1985. — 288 s.
26. Kryzhanovskij G.N. i dr. Dizreguljacionnaja patologija: Ruk. dlja vrachej i biologov. — M.: Medicina, 2002. — 630 s.
27. Dubovoj R.M., Frolova O.O., Burceva T.I. i dr. Opyt ispol'zovanija BAD k pishhe dlja korrekcii jekologozavisimyh sostojanij. Vestnik vosstanovitel'noj mediciny. 2009; № 4: 38—41.
28. Nekrasov V.I., Skal'nyj A.V. Jelementnyj status lic vrednyh i opasnyh professij. — M.: ROSMJeM, 2006. — 229 s.
29. Nekrasov V.I. Mikronutrientnaja obespechennost' racionov pitaniya, jelementnyj status i uroven' funkcional'nyh rezervov u lic opasnyh professij: Avtoref. diss. na soiskanie uchenoj stepeni d.m.n. — M., 2007. — 42 s.

30. Ibragimova M.Ja., Sabirova L.Ja., Berezkina E.S., Skal'naja M.G., Zhdanov R.I., Skal'nyj A.V. Vzaimosvjaz' disbalansa makro- i mikrojelementov i zdorov'e naselenija (obzor literatury). Kazanskij medicinskij zhurnal. 2011; 92(4): 606—609.

31. Skalny A.V. Bioelements and bioelementology in pharmacology and nutrition: fundamental and practical aspects // Pharmacology and nutritional intervention in the treatment of disease / Ed. by Faik Atroshi. — 2014: 225—240.

Received 12.09.2015

Pathophysiology of microelementoses. Post 1. Introduction

Oberleas D.¹, Skalny A.V.^{2,4}, Skalaya M.G.², Nikonorov A.A.³, Nikonorova E.A.²

¹ — Department of Nutrition and Food Science, Texas Technique University, Lubbock, Texas 79423, USA

² — ANO Centre for Biotic Medicine — Satellite Centre of UNESCO institute of trace elements, Zemlyanoi val 46, Moscow, 105064, Russia. nikonorova_evg@mail.ru

³ — Orenburg State Medical University, Sovetskaya str. 6, Orenburg, 460000, Russia

⁴ — Orenburg State University, Pobeda pr. 13, Orenburg, 460018, Russia

Fundamental and applied aspects of the biological role of chemical elements are described. Positive and negative effects of macro- and trace elements and their compounds on living organisms are considered. The role of the elements in pathogenesis of diseases and sanogenesis is assessed. There is a classification of microelementoses with description.

Keywords: *microelementoses, patophysiology, macroelements, trace elements*

Патофизиология микроэлементозов.

Сообщение 2. Цинк

Оберлис Д.¹, Скальный А.В.^{2,4}, Скальная М.Г.², Никоноров А.А.³, Никонорова Е.А.²

¹ — Техасский технический университет, шт. Техас, США

² — АНО «Центр биотической медицины» — Сателлитный центр института микроэлементов ЮНЕСКО, Москва

³ — Оренбургский государственный медицинский университет, г.Оренбург

⁴ — Оренбургский государственный университет, г.Оренбург

В статье представлены основные кинетические данные цинка и его биологическая роль в организме человека. Рассмотрены возможные механизмы реализации его биологических функций на уровне как клетки, так и целостного организма. Представлены основные симптомы, связанные как с дефицитом, так и с избытком цинка, рассмотрены цинк-ассоциированные заболевания.

Ключевые слова: цинк, биологическая роль, цинк-ассоциированные заболевания

В организме взрослого человека содержится 1,5–3 г цинка. Цинк обнаружен во всех органах и тканях; больше всего его содержание в предстательной железе, сперме, коже, волосах, мышечной ткани, клетках крови. АУП цинка для человека — 12 мг/сутки, ВДУП — 40 мг/сутки (МР 2.3.1.1915-04).

Оптимальная интенсивность поступления цинка в организм — 10–15 мг/день. Дефицит цинка в организме может развиваться при недостаточном поступлении этого элемента (1 мг/день и менее), а порог токсичности — 600 мг/день.

В организм цинк попадает с пищей и водой. Особенно много цинка содержится в говядине, печени, морских продуктах (устрицы, вообще моллюски, сельдь), пшеничные зародыши, рисовые отруби, овсяная мука, морковь, горох, лук, шпинат, орехи.

Цинк: основные кинетические данные [1]

Суточное поступление с продуктами питания — 13 мг; суточное поступление с воздухом — 0,1 мг; резорбция (%) — 20–30; суточное выделение с мочой — 0,5 мг, с калом — 11 мг, с потом — 0,8 мг (2–3 мг в жарком климате), волосы и др. — 0,03 мг. Период полувыведения из организма — 245 суток.

Значение для жизнедеятельности организма

Впервые эссенциальность цинка продемонстрировали Todd с соавторами (1934) в опытах на крысах.

Патогенетическая роль дефицита цинка у человека впервые была показана в развитии заболевания молодых мужчин в сельских районах южного Ирана [2], рацион которых состоял почти исключительно из цельного бездрожжевого хлеба с минимальным количеством животного белка. В дальнейшем была показана патогенетическая значимость цинка в развитии целого ряда заболеваний [3–9].

Поступление в организм

Определяющими гомеостаз цинка факторами наряду с содержанием в пище данного элемента является содержание в рационе фитата (D-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексафосфат, представляет собой сложный эфир циклического шестиатомного полиспирта мио-инозитола (или мио-ино-

зита) и шести остатков и кальция). Фитат является основным компонентом растительного происхождения, влияющим на гомеостаз цинка. Способность фитата к образованию комплексов в сочетании с синергическим действием кальция изменяет потребность в цинке. Хотя кальций не является специфическим для этого взаимодействия элементом, поскольку другие катионы могут обладать аналогичными свойствами, но он присутствует в пище в самых больших концентрациях.

Молярное отношение фитат : цинк, равное 10:1 и менее, как правило, обеспечивает нормальный гомеостаз цинка при большинстве диет с низким и средним содержанием кальция [10].

Распределение и депонирование в организме

Всасывание цинка происходит преимущественно в тонком кишечнике посредством металлотронеина, который вырабатывается энтероцитами. Всосавшийся цинк транспортируется в крови в связанном с альбумином состоянии и большая часть его поступает в печень (главное депо), а также в костную и мышечную ткань. Специфический домен связывания цинка на альбумине человека сформирован двумя остатками гистидина (His-67 и His-247 — N-лиганд), аспарагина (Asn-99 — O-лиганд), аспарагиновой кислоты (Asp-249), обладающий гидрофильными свойствами [11].

Цинк широко распространен в организме. Костный мозг, почки, семенники и тимус являются тканями, в которых в первую очередь снижается содержание цинка при его дефиците. Поджелудочная железа сохраняет значительные концентрации цинка даже при его хроническом недостатке. Вместе с увеличением количества цинка в поджелудочной железе происходит увеличение количества металлотронеинов I и II [12].

Простата содержит самые высокие концентрации цинка, однако этот цинк не считается равнозначным цинку крови и не перераспределяется в другие ткани: простата является местом синтеза и хранения семенной жидкости, содержащей высокие концентрации цинка, что однозначно определяет его роль в реализации репродуктивной функции. Ткани внутренних органов имеют несколько более высокие, чем мышечные ткани, концентрации цинка, что, возможно, отражает их большую метаболическую активность.

Выделение

В норме цинк выводится через желудочно-кишечный тракт. Благодаря весьма значительным количествам цинка, выделяемым в двенадцатиперстную кишку, потери этого микроэлемента в тонком кишечнике являются основным фактором его гомеостаза. Содержание цинка в моче человека изо дня в день постоянно и составляет от 0,6 до 0,8 мг в сутки. При дефиците цинка его концентрация в моче снижается, что отражает режим активации его реабсорбции в почках [5].

Потребление спиртных напитков, острые и хронические инфекции мобилизуют запасы цинка в организме и увеличивают его выведение с мочой [13, 14]. Потери крови приводят к быстрому истощению запасов цинка — около 6,5 мкг на мл крови (1 мкг/мл — в плазме, 12 мкг/мл — упакованных эритроцитов) [5].

Некоторые лекарства являются прекрасными хелатирующими агентами и усиливают выделение цинка. Пищевые добавки и консерванты, например ЭДТА, могут также вызывать усиление экскреции цинка из организма. Аналогичным образом действуют и некоторые гормоны (кортизол).

Метаболическая функция цинка

Кроме кофакторной функции в реализации деятельности многих Zn-зависимых металлоферментов [15], участвующих в широком спектре различных специфических и общих метаболических путей, цинк выполняет и ряд функций, не связанных с ферментативной активностью [16].

Цинк требуется для синтеза белков, в том числе коллагена, и, следовательно, формирования межклеточного матрикса и костей. Принимает участие в процессах деления и дифференцировки клеток, реализации Т-клеточного иммунитета, депонирования инсулина поджелудочной железы в специфических гранулах (Zn-инсулин, димерный и тетрамерный), реализации метаболического эффекта полового гормона дегидротестостерона. Цинк играет важнейшую роль в процессах регенерации кожи, роста волос и ногтей, секреции сальных желез. Цинк способствует всасыванию витамина Е и поддержанию нормальной концентрации этого витамина в крови.

Цинкзависимые ферменты делятся на три типа. К первому типу относятся ферменты, в которых цинк непосредственно входит в структуру белка или его активный центр. Ферменты второго типа структурно с цинком не связаны, но их активность индуцируется и регулируется цинк-фингерными протеинами или факторами транскрипции, вспомогательными белками экспрессии ДНК. Третья группа объединяет ферменты, активность которых регулируется посредством ингибирования цинком.

Неферментативные функции цинка

Гемоглобин

Гемоглобин состоит из четырех имеющих третичный уровень структурной организации полипептидных цепей, каждая из которых в своём функциональном домене содержит молекулу гема. Взаимодействие этих мономерных белков с образованием тетрамерной структуры в виде молекулы Hb, имеющий четвертичный уровень структурной организации осуществляется с участием ионов Zn. Это основная функция цинка в эритроцитах.

Цинк-фингерные протеины

Цинк-фингерные протеины представляют собой класс регуляторных протеинов, которые участвуют в широком спектре внутриклеточных процессов, таких, как развитие, дифференциация и подавление развития опухолей.

Основная роль цинк-фингера — связываться с сегментами ДНК со специфическим сродством, контролируя транскрипцию генов-мишеней. Примерно 0,7% генов человека содержат цинк-фингерные протеины [17].

Матриксины

Матриксины представляют собой семейство, состоящее более чем из 20 матриксных металлопротеиназ (MMP's), которые участвуют в межклеточном матриксном (extracellular matrix — ECM) расщеплении. Они физиологически необходимы для эмбриогенеза, морфогенеза, размножения, резорбции тканей и их реконструкции. Патогенетически они связаны с артритом, раком, сердечно-сосудистыми и неврологическими заболеваниями, нефритом, повреждением гематоэнцефалического барьера, периодонтальными заболеваниями, образованием язв на коже, фиброзом печени, эмфиземой, фиброзом легких и т.д.

Они включают такие ферменты, как коллагеназы 1-, 2-, 3- и 4-го типа, желатиназы А и В и другие сходные с ними протеолитические ферменты.

На сегодняшний день открыто четыре тканевых ингибитора металлопротеиназ (tissue inhibitors of metalloproteinases — TIMP), которые являются основными регуляторами активности MMP *in vivo*.

Тканевые ингибиторы металлопротеиназ представляют собой многофункциональные ферменты, подавляющие образование опухолей, метастаз и развитие кровеносных сосудов. TIMP-1 и TIMP-2 оказывают митогенное действие на некоторые типы клеток, в то время как повышенная экспрессия этих ингибиторов подавляет рост опухолевых клеток. Эти физиологические функции TIMP не зависят от MMP-ингибиторной активности [18].

Металлотионеин

Металлотионеины принадлежат к семейству внутриклеточных металл связывающих протеинов, присутствующих практически во всех живых организмах.

Одной из основных функций металлотионеинов является детоксикация тяжелых металлов. Металлотионеин также снижает эффект от действия некоторых вредных агентов, например четыреххлористого углерода, парацетамола, а также химиотерапии, ультрафиолетового и ионизирующего излучения. Металлотионеин ограничивает абсорбцию цинка при высоких уровнях его потребления с пищей и может служить фактором переноса цинка к транспортным белкам (от ZnT-1 до ZnT-4). Цинк индуцирует металлотионеин кишечника, который изолирует Cu^{1+} в клетках слизистой и предотвращает ее попадание в кровеносную систему. Экзокринный металлотионеин поджелудочной железы играет важную роль в гомеостазе цинка. Индукция металлотионеина наиболее сильно выражена при повреждении тканей, инфекциях, воспалении и неопластических заболеваниях [19].

Есть свидетельства того, что металлотионеин важен не только для роста и развития организма, но и для преодоления стресса различного генеза. Некоторые тератогены могут индуцировать синтез металлотионеина, который

отрицательно сказывается на переносе цинка во время органогенеза от матери плоду, что приводит к его тератогенным поражениям [16]. Возможно, таким образом, на обмен цинка у потомства действует алкогольная интоксикация матери до, или во время беременности [20].

Взаимодействие с нутриентами и лекарствами

В естественных условиях пищевой фитат является важнейшим фактором, определяющим гомеостатическое равновесие цинка. Практически все рационы питания людей, проживающих в любой точке земного шара, содержат фитат. Таким образом, основным вопросом становится ба-

ланс, выраженный в молярном отношении фитат : цинк, не более 10. Население развивающихся стран более зависимо от пищи растительного происхождения, однако, действие фитата проявляется и в популяциях развитых стран. Более 75% населения мира выиграло бы при добавлении в рацион экзогенного цинка [5, 21–24].

Для лучшего усвоения цинка необходимы витамины А, В₆. Усвоению цинка препятствуют медь, марганец, железо, кальций (в высоких дозах) [1]. Кадмий способен вытеснять цинк из организма [25]. Прием кортикостероидов, оральных контрацептивов, анаболиков, антиметаболитов, диуретиков, алкоголя, иммуносупрессоров может привести к дефициту цинка в организме [1].

Таблица 1

Ферменты, в которых цинк является интегральной частью активной молекулы

Фермент	Функция
Карбоангидраза	Поддержание кислотно-щелочного гомеостаза, (функционирование гидрокарбонатной буферной системы) [26].
Дегидрогеназы	Окисление и восстановление соответствующих субстратов, генерация высокоэнергетического водорода, необходимого для получения в клетке основного количества АТФ [27].
Щелочная фосфатаза	отщепления остатка фосфорной кислоты от её органических соединений [28].
Коллагеназы	Гидролитическое расщепление коллагена, в том числе в костной ткани для осуществления её ремоделирования.
Карбоксипептидаза А и В	Гидролитическое отщепление С-концевых аминокислот в процессе переваривания белка в кишечнике [29].
Альдолаза	Фермент гликолиза и глюконеогенеза, играющий роль в энергообеспечении клетки в анаэробных условиях и поддержании физиологической концентрации глюкозы крови. Обеспечивает протекание прямой и обратной реакции негидролитического расщепления фруктозо-1,6-дифосфата до диоксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата.
РНК-полимеразы II и III	Полимеризация рибонуклеотидов в РНК, реализация процесса экспрессии гена, важная роль в биосинтезе белка [30].
Дипептидазы	Расщепление дипептидов на свободные аминокислоты (процесс переваривания белка в кишечнике)
Фосфоглюкомутаза	Обратимое превращение глюкозо-1-фосфат в глюкозо-6-фосфат в процессах биосинтеза гликогена и гликогенолиза [31].
Фосфолипаза С	Реализация гормонального эффекта в гладкомышечных клетках с индукцией их сокращения вследствие гидролитического расщепления фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата до вторичных мессенджеров – инозитол-1,4,5-трифосфата и ДАГ; переваривание фосфолипидов в тонком кишечнике
Нейтральные и щелочные протеазы	Гидролитическое расщепление различных белков в клетке, субклеточных структурах, межклеточном матриксе и крови как в процессе их деградации, так и образовании функционально активных белков и пептидов
Дегидратаза δ-аминолевулиновой кислоты	Катализация реакции конденсации двух молекул δ-аминолевулиновой кислоты в порфириноген в ходе синтеза гемоглобина.
Сu-Zn-супероксиддисмутаза	Дисмутация двух молекул супероксиданионрадикала с образованием пероксида водорода. Ферментативное звено антиоксидантной защиты клетки.
Лейцинаминопептидаза	Гидролитическое отщепление от коротких олигопептидов в тонком кишечнике свободных аминокислот (процессе переваривания белка в ЖКТ).
Фосфоманнозоизомераза	Обратимая изомеризация маннозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат.
Орнитинкарбамоилтрансфераза	Катализация реакции конденсации карбамоилфосфата с орнитином с образованием цитруллина в цикле биосинтеза мочевины, основного метаболического пути обезвреживания аммиака
Аспартаттранскарибамилаза	Катализация конденсации карбамоилфосфата и аспартата с образованием карбамоиласпартата в ходе синтеза пиримидиновых нуклеотидов [16].
Альфа-амилаза	Расщепление α-1,4-гликозидной связи крахмала и гликогена в процессе их переваривания в ЖКТ с образованием олигосахаров, мальтозы и изомальтозы
Меркаптопируватсульфотрансфераза	В катаболизме цистеина отнимает серу у бета-меркаптопирувата с образованием пирувата.
Обратная транскриптаза (РНК-зависимая ДНК-полимераза)	Катализирует полимеризацию ДНК с использованием РНК в качестве матрицы (источника генетической информации).

Дефицит цинка

Дефицит цинка в организме может быть вызван рядом причин:

- 1) недостаточное потребление богатой белками и цинком пищи, вегетарианство, голодание;
- 2) повышенная потребность в цинке при росте, беременности, регулярных физических нагрузках, хроническом стрессе;
- 3) большие потери цинка при диарее;
- 4) массивные кровотечения;
- 5) потребление пищи, в которой цинк находится в труднодоступной форме;
- 6) наличие паразитов, вызывающих хроническую потерю питательных веществ;
- 7) псориаз, себорея, повышенная потливость;
- 8) синдром хронического расстройства всасывания, хронические лихорадочные состояния, цирроз печени, алкоголизм, регулярный диализ при хронической почечной недостаточности;
- 9) состояния после хирургических вмешательств, ожогов, парентерального питания;
- 10) избыточное поступление в организм эстрогенов, кортикостероидов, диуретиков и др.;
- 11) избыточное поступление в организм меди, кадмия, свинца, ртути.

Симптомы, сопровождающие дефицит цинка, разнообразны: снижение аппетита, наличие болезней кожи, анемия, наличие аллергических заболеваний, ги-

перактивность, рассеянность, дефицит массы, снижение остроты зрения, выпадение и /или замедление роста волос; возможно возникновение извращенного аппетита. Люди с дефицитом цинка обычно часто и длительно болеют простудными и инфекционными заболеваниями. У мальчиков в случае дефицита цинка отмечается задержка полового развития, а у мужчин — потеря сперматозоидами способности оплодотворения яйцеклетки.

При недостатке цинка могут возникать головные боли, локализующиеся в висках, макушке, корне носа и нередко сопровождающиеся тошнотой, рвотой, которые ухудшаются при приеме несильных алкогольных напитков. Ухудшение наступает обычно во второй половине дня.

Еще одним неспецифическим симптомом дефицита цинка являются боли в области шейного и поясничного отделов, наиболее типичной болевой точкой является область первого поясничного позвонка.

У женщин при дефиците цинка в предменструальном синдроме отмечаются боли в левом яичнике, пояснице и позвоночнике. Состояние улучшается после начала менструации.

С нехваткой цинка в организме связаны некоторые психические заболевания, в частности, шизофрения и депрессия, а также все типы воспалительных болезней кишечника, артриты, образование перхоти.

Таблица 2

Ферменты, активность которых регулируется ингибированием цинком

Фермент	Функция
Кислые и щелочные рибонуклеазы	Гидролитическое расщепление 3'5'-фосфодиэфирных связей РНК с образованием рибонуклеотидов
НАДН-цитохром-С-редуктаза	В бактериальных клетках обеспечивает процесс биохемилюминесценции [32].
Енолаза	Участие в обратимой дегидратации 2-фосфоглицерата до фосфоенолпирувата, с последующим получением клеткой энергии в виде АТФ за счет макроэргической фосфатной связи фосфоенолпирувата [33].
Фруктозо-1,6-дифосфатаза	Фермент гликолиза и глюконеогенеза, играющий роль в энергообеспечении клетки в анаэробных условиях и поддержании физиологической концентрации глюкозы крови. Обеспечивает протекание прямой и обратной реакции негидролитического расщепления фруктозо-1,6-дифосфата до диоксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата [33].
Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	Протекание гликолиза и глюконеогенеза, обеспечивает обратимое превращение глицеральдегид-3-фосфат в 1,3-дифосфоглицерат [33].
Альдегиддегидрогеназа	Катализирует окисление различных альдегидов до соответствующих кислот, в том числе при окислении этанола до уксусной кислоты с последующим образованием ацетилкоэнзима-А [33].
Карбоксипептидаза А	Гидролитическое отщепление С-концевых аминокислот в процессе переваривания белка в кишечнике [34].

Таблица 3

Ферменты, синтез которых индуцируется (регулируется) цинк-фингерными протеинами

Фермент	Функция
Тимидинкиназа	Фосфорилирует дезокситимидин до д-ТТФ перед его включением в ДНК и, таким образом, является скоростью-лимитирующим ферментом синтеза ДНК и репликации клетки. Так как деление клеток необходимо для роста, цинк посредством этого механизма контролирует его скорость.
Креатинкиназа	Обеспечивает своевременное получение клеткой энергии в виде АТФ за счет макроэргической фосфатной связи креатинфосфата — соединения, позволяющего накапливать энергию в нейронах, кардиомиоцитах, миоцитах [35].
Лактатдегидрогеназа	Метаболизм молочной кислоты. Реализация протекания глюкозо-лактатного цикла.

Цинк-ассоциированные заболевания

Особенно важным представляется обеспечить цинком плод еще в утробе матери в первые 3 месяца беременности. Развитие плаценты в этот период требует больших минеральных запасов. Именно тогда беременная женщина жалуется на изменение в восприятии запаха и вкуса. Все это является результатом недостатка цинка во вкусовых сосочках языка и/или рецепторах носовой полости. В начальный период полового созревания, когда формируются половые органы, мальчикам также требуется повышенное количество цинка. Организму девочек цинк нужен в этот период в меньшем количестве, только для общего роста и развития.

У ребенка при дефиците цинка отмечается снижение аппетита, слабый рост, появляется извращенный аппетит.

В пожилом возрасте характерны явления перестройки и снижения интенсивности обменных процессов, защитных реакций организма. Одной из самых неприятных возрастных болезней является так называемый старческий маразм. Для уменьшения симптомов данного заболевания мозг должен получать достаточное количество субстратов биологического окисления, предшественников нейротрансмиттеров и снабжение кислородом. Препараты цинка, принимаемые пожилыми людьми, в первую очередь воздействуют на микроциркуляцию, стабилизируя мембраны эндотелиоцитов капилляров гематоэнцефалического барьера, что позволяет мозгу получать достаточное количество кислорода, аминокислот, глюкозы, улучшая тем самым его функции. В результате возвращается память, способность к координации, проходят различные расстройства.

Простатит и аденома предстательной железы. Мужчины, особенно в пожилом возрасте, часто заболевают простатитом и аденомой предстательной железы. На начальных этапах развития воспаление предстательной железы можно вылечить диетой, богатой цинком или препаратами цинка, так как цинк прежде всего действует профилактически [36—39].

Простудные заболевания. Установлено, что цинк необходим для реализации противовирусных и антиоксидантных механизмов защиты клетки организма [40—45].

Ревматизм. Уровень цинка в крови у больных ревматизмом и артритом ниже, чем у здоровых людей. Диета, богатая этим элементом, может приостановить болезненный процесс, а иногда даже совсем излечить от болезни. Местное лечение цинксодержащими мазями воспаленных, опухших суставов может уменьшить отеки и болевые ощущения [46—49].

Кожные болезни. Очень часто дефицит цинка проявляется как экзема, причем поражение кожи распространяется практически по всему телу. Угревая сыпь также нередко связана с недостатком цинка в организме. Лечение цинком в сочетании с витамином А позволяет пациентам не только избавиться от угревой сыпи, но делает кожу менее «жирной». Давно известно, что серьезный недостаток витамина А делает кожу сухой, шелушащейся и преждевременно состарившейся. Вернуть ей

нормальные, физиологические свойства можно сочетанным воздействием витамина А и Zn. С учетом накопления витамина А в печени лимитирующим фактором выступает достаточное поступление цинка в организм. Не менее важную роль в развитии заболеваний играют и другие элементы. Так, например, недостаток витаминов группы В может вызвать хроническую экзему или кожную сыпь [50].

Сахарный диабет. На течение сахарного диабета значительное влияние оказывают такие химические элементы, как цинк и хром [51—55]. У больных сахарным диабетом содержание цинка в крови гораздо ниже, чем у здоровых людей. Назначение препаратов цинка способствует снижению числа осложнений, заживлению дефектов кожи при диабете [56].

Анемия. У части больных, страдающих анемией, в крови очень низкий уровень содержания цинка. И назначение железосодержащих препаратов не всегда бывало эффективным. Только после назначения цинксодержащих препаратов наступало заметное улучшение, изменялась формула крови. Особенно высока эффективность назначения цинксодержащих препаратов при серповидно-клеточной анемии [57].

ЖКТ. Если человек страдает язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, то в его лечении одним из обязательных компонентов должен быть цинк, так как он очень хорошо помогает при рубцевании язв, ускоряет их заживление [58]. Препараты цинка также способствуют ускорению заживления язв при сахарном диабете и у людей с недостаточностью кровообращения [59, 60].

Энтеропатический акродерматит. Энтеропатический акродерматит (ЭА) представляет собой болезнь наследственного дефицита цинка у человека. Моупапан (1974) первым обнаружил терапевтическое действие цинка при лечении проявлений дерматита, хронической диареи, алопеции, угнетения иммунной системы и снижения умственной деятельности. Заболевание обычно проявляется, когда грудного ребенка переводят с материнского молока на коровье. Хотя в коровьем молоке содержание цинка выше, он усваивается значительно хуже. Для улучшения усвоения цинка грудного молока применяли пиколинат, метаболит аминокислоты триптофана, и цитрат. Возможно, что фактором, понижающим абсорбцию цинка, является более высокий уровень кальция в коровьем молоке [61]. Точный механизм этого процесса еще полностью не изучен, однако увеличение потребления цинка с пищей или в виде добавок облегчает симптомы заболевания. При начатом на ранних стадиях регулярном лечении ребенок растет и развивается нормально.

Остеопороз. Остеопороз возникает на фоне недостатка ряда химических элементов, в том числе и цинка. Особенно цинк необходим для построения костей в ранний период развития и роста [57, 462—65].

Когнитивные функции. В некоторых исследованиях показана связь между обеспеченностью организма цинком и умственными способностями человека [66].

Нервно-психические заболевания. Цинк является одним из компонентов, недостаток которого является причиной эпилепсии. Рядом некоторых исследователей была обнаружена связь между низким содержанием в организме больных эпилепсией цинка и аминокислоты таурина [67, 68]. Эпилепсия, как показали американские медики, возникает в результате неправильного питания. В рационе таких людей очень низкое содержание цинка и таурина.

Высказано предположение, что у части больных шизофренией заболевание развивается в результате плохого питания, а именно недостатка цинка, витамина В₆ и марганца в диете. Лечение этими тремя препаратами приостанавливало болезнь, но симптомы ее снова появлялись после прекращения лечения [69].

Алкоголизм. Хронический алкоголизм также связывают с цинковым дефицитом [13, 20]. У детей и подростков эта предрасположенность при дефиците цинка наиболее ярко выражена [13, 66]. Дефицит цинка ухудшает метаболизм этанола, увеличивает риск повреждения печени [13]. В свою очередь, дефицит цинка может быть связан с возросшим потреблением алкоголя, т.е. в результате формирования порочного круга. Поскольку хронические алкоголики страдают низким уровнем содержания цинка в организме. При этом отмечается и обратный эффект, когда недостаток цинка в организме вызывает возникновение пристрастия к алкоголю, что особенно ярко проявляется у детей и подростков.

Алкогольная эмбриопатия (АЭФП)

Существует мнение, что дефицит цинка является причиной возникновения алкогольной эмбриопатии [13]. Показано, что крысы, родившиеся от алкоголизированных родителей, и дети больных алкоголизмом отличаются сниженным содержанием цинка в органах и тканях, в том числе в коре головного мозга [13].

Клинический дефицит цинка описан у жителей Ближнего Востока [2], однако, учитывая рационы питания людей во всем мире, логично предположить, что он распространен гораздо более широко. «Цинкдефицитное» питание включает зерно, кассаву и бобы в Латинской Америке, сорго, кассаву и маниок в Африке, бездрожжевой хлеб и бобы на Ближнем Востоке, рис и соевые бобы в Юго-Восточной Азии, и необычные пищевые пристрастия и хронический алкоголизм в Соединенных Штатах, России и других «пьющих» странах [7]. Важно, что многие симптомы, которые последние пятьдесят лет относили к признакам истощения организма, теперь считаются признаками дефицита цинка.

Избыток цинка

Избыток цинка в организме — явление довольно редкое. Такое состояние могут вызывать:

- 1) избыточное поступление (при контакте с соединениями цинка в производственных условиях [70];
- 2) неконтролируемое использование препаратов цинка, в том числе мазей;
- 3) нарушение регуляции обмена цинка.

Повышенное содержание цинка в первую очередь отражается на работе ферментных систем, снижая активность некоторых ферментов. Другим немаловажным моментом является снижение в организме уровня меди и

железа, так как цинк является антагонистом данных элементов [1, 71]. При избыточном содержании цинка в печени у детей развивается заболевание с тяжелыми явлениями застоя желчи.

Как правило, от отравления цинком страдают люди, проработавшие на производстве более 10–12 лет [70]. У них чаще всего появляются следующие симптомы: чувствительность подошв, ощущение «мурашек» на теле, онемение и холод в ногах, ощущение пояса вокруг живота, судороги и подергивание в мышцах. Усиливается рефлекторная возбудимость, но мышечная чувствительность снижается, поэтому больной с закрытыми глазами или, находясь в темноте, спотыкается. При этом отмечается мышечное дрожание. Еще позже походка делается негибкой, движения — судорожными. Вследствие поражения симпатической нервной системы развивается малокровие и прогрессирует общее исхудание.

Список литературы

1. Скальный А.В., Рудаков И.А. Биозлементы в медицине. — М.: Издательский дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. — 272 с.
2. Прасад А.С. История открытия эссенциальности цинка для человека // Микроэлементы в медицине. — 2010. — 11(1). — С. 1–6.
3. Мазо В.К., Скальный А.В., Гмошинский И.В. Эссенциальные микроэлементы в питании // Врач. — 2003. — № 5. — С. 34.
4. Одинаева Н.Д., Язык Г.В., Скальный А.В. Цинк и здоровье детей раннего возраста. Пособие для врачей, утв. МЗ РФ 16.04.2002. — М., 2002. — 32 с.
5. Прасад А.С. Цинк в организме человека: Расстройства здоровья и лечебные эффекты // Микроэлементы в медицине — 2014. — 15(1). — С. 3–12.
6. Скальный А.В. Микроэлементы / Лабораторная диагностика инфекционных болезней: Справочник / Под ред. В.И. Покровского, М.Г. Твороговой, Г.А. Шипулина. — М.: Издательство БИНОМ, 2013. — С. 447–467.
7. Скальный А.В. Цинк и здоровье человека (книга для современных думающих врачей и любознательных пациентов). — Оренбург: РИК ГОУ ОГУ, 2003. — 80 с.
8. Скальный А.В., Грабеклис А.Р., Демидов В.А., Скальная М.Г., Березкина Е.С. Связь элементного статуса населения Центрального федерального округа с заболеваемостью. Часть 1. Эссенциальные и условно эссенциальные химические элементы // Микроэлементы в медицине. — 2012. — Т. 13. — Вып. 2. — С. 1–7.
9. Цыган В.Н., Камилова Т.А., Скальный А.В., Цыган Н.В., Долго-Собуров В.Б. Патофизиология клетки. — СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2014. — 128 с.
10. Oberleas D., Chan H.C. (1997) Cation complexation by phytate // Trace Elem. Electro. 14(4):173–176.
11. Stewart A.J., Blindauer C.A., Berezenko S., Sleep D., Sadler P.J. (2003) Interdomain zinc site on human albumin // Proc. Nat. Acad. Sci. 100(1 April):3701–3706.
12. Onosaka S., Min K.-S., Fujita Y., Tanaka K., Iguchi S., Okada Y. (1988) High concentration of pancreatic metallothionein in normal mice // Toxicol. 50:27–35.
13. Скальный А.В. Исследование влияния хронической алкогольной интоксикации на обмен цинка, меди и лития в организме: Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 1990. — 137 с.
14. Keen C.L., Uriu-Adams J.Y., Skalny A., Grabeklis A., Grebeklis S., Green K., Yevtushok L., Wartelecki W. W., Chambers Ch.D. The plausibility of maternal nutritional status being a contributing factor to the risk for fetal alcohol spectrum disorders: The potential influence of zinc status as an example // BioFactors (Oxford, England). — 2010. — V. 36 (2). — P. 125–135.
15. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. — СПб.: Наука, 2008. — 544 с.
16. De Silva J.J.R.F., Williams J.J.P. The biological chemistry of the elements, 2nd Ed. P.315–339. Oxford: Oxford University Press. 2001.
17. Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O. (1999) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins // Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 3:183–212.

18. Nagase H., Woessner Jr. J.F. (1999) Matrix metalloproteinases // *J. Biol. Chem.* 274(31):21491–21494.
19. Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В. Маталлотиюнеины. — Одесса Чорномор'я, 2011. — 428 с.
20. Скальный А.В., Курчашова С.Ю., Вятчанина Е.С. Изучение влияния дисбаланса цинка и других микроэлементов в патогенезе алкоголизма и алкогольной эмбриофетопатии в России // *Наркология.* — 2008. — 5. — С. 26–33.
21. Элементный статус населения России. Часть 2. Элементный статус населения Центрального Федерального округа / Под ред. А.В. Скального, М.Ф. Киселева. — СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2011. — 432 с.
22. Bailey RL, West KP Jr, Black RE. The epidemiology of global micronutrient deficiencies // *Ann NutrMetab.* 2015;66 Suppl 2:22–33.
23. Anatoly V. Skalny, Margarita G. Skalnaya, Alexey A. Tinkov, Eugeny P. Serebryansky, Vasily A. Demidov, Yulia N. Lobanova, Andrei R. Grabeklis, Elena S. Berezkina, Irina V. Gryazeva, Andrey A. Skalny, Oksana A. Skalnaya, Nikolay G. Zhivaev, Alexandr A. Nikonorov. Hair concentration of essential trace elements in adult non-exposed Russian population // *Environ Monit Assess.* 2015. 187:677.
24. Skalny, A.A., Tinkov, A.A., Medvedeva, Y.S., Alchinova, I.B., Karganov, M.Y., Skalny, A.V., Nikonorov, A.A. (2015). Effect of short-term zinc supplementation on zinc and selenium tissue distribution and serum antioxidant enzymes // *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 14(3), 269–276. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.3.28
25. Namdarhanbari MA, Bertling J, Krezoski S, Petering DH. Toxic metal proteomics: reaction of the mammalian zinc proteome with Cd²⁺ // *J. Inorg Biochem.* 2014; Jul;136:115–21.
26. Keilin D., Mann J. (1940) Carbonic anhydrase: Purification and nature of the enzyme // *Biochem. J.* 34:1163–1176.
27. Kfoury G.A., Reinhold J.G., Simonian S.J. (1968) Enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats // *J. Nutr.* 95:102–110.
28. Day H.G., McCollum E.V. Effects of acute dietary zinc deficiency in the rat // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1940; 45:282–284.
29. Wintersberger E., Cox D.J., Neurath H. (1962) Bovine pancreatic procarboxypeptidase B. I. Isolation, properties and activation // *Biochem.* 1(4):1069–1078.
30. Chesters J.K. 1992. Trace element-gene interactions // *Nutr. Rev.* 50(8):217–223.
31. Hirose M., Sugimoto E., Chiba H. 1972. Studies of crystalline yeast phosphoglucomutase: the presence of intrinsic zinc // *Biochim. Biophys. Acta.* 289:137–146.
32. Su P., Oliver J.W., Sachan D.S. (1984) Influence of zinc and thyroid status on microsomal NADPH-cytochrome C reductase activity // *Fed. Proc.* 43(3):852 (Abstract 3313).
33. Maret W., Jacob C., Vallee B.L., Fischer E.H. (1999) Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein // *Proc. Natl. Acad. Soc.* 96(3):1936–1940.
34. Coleman J.E., Vallee B.L. Metallo-carboxypeptidases // *J. Biol. Chem.* 1960;235(2):390–395.
35. Petrie L., Chesters J.K., Franklin M. (1991) Inhibition of myoblast differentiation by lack of zinc // *Biochem. J.* 276(1):109–111.
36. Cui D, Han G, Shang Y, Mu L, Long Q, Du Y. The effect of chronic prostatitis on zinc concentration of prostatic fluid and seminal plasma: a systematic review and meta-analysis // *Curr Med Res Opin.* 2015; 31(9):1763–9.
37. Gawel M, Lipkowska A, Herman M, Golasik M, Piekoszewski W, Gomolka E, Schlegel-Zawadzka M, Opoka W, Nowak G, Librowski T. Chronic treatment with zinc hydroaspartate induces anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activity in rats // *Pharmacol Rep.* 2014 Oct;66(5): 862–6.
38. Goodarzi D, Cyrus A, Baghinia MR, Kazemifar AM, Shirincar M. The efficacy of zinc for treatment of chronic prostatitis // *Acta Med Indones.* 2013 Oct;45(4):259–64.
39. Skalnaya M.G., Yurasov V.V., Tinkov A.A., Demidov V.A., Skalny A.V. Association between semen quality and level of 20 essential and toxic metals in ejaculate // *Trace elements and Electrolytes.* — 2015. [In Press]
40. Beisel W.R. Interactions between nutrition and infection. In: G.T. Strickland (ed.) *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 8th edn. W.B. Saunders, Philadelphia. 2000. — pp. 967–968.
41. Cai H, Zhang Y, Ma Y, Sun J, Liang X, Li J. Zinc binding activity of human metapneumovirus M2-1 protein is indispensable for viral replication and pathogenesis in vivo // *J. Virol.* 2015 Jun;89(12):6391–405.
42. Li M, Yan K, Wei L, Yang J, Lu C, Xiong F, Zheng C, Xu W. Zinc finger antiviral protein inhibits coxsackievirus B3 virus replication and protects against viral myocarditis // *Antiviral Res.* 2015; Nov;123:50–61.
43. Mao R, Nie H, Cai D, Zhang J, Liu H, Yan R, Cuconati A, Block TM, Guo JT, Guo H. Inhibition of hepatitis B virus replication by the host zinc finger antiviral protein // *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003494.
44. Qiu M, Chen Y, Chu Y, Song S, Yang N, Gao J, Wu Z. Zinc ionophorespyrithione inhibits herpes simplex virus replication through interfering with proteasome function and NF-κB activation // *Antiviral Res.* 2013; Oct;100(1):44–53.
45. Wei Z, Burwinkel M, Palissa C, Ephraim E, Schmidt MF. Antiviral activity of zinc salts against transmissible gastroenteritis virus in vitro // *Vet Microbiol.* 2012; Dec 7;160(3–4):468–72.
46. Bonaventura P, Benedetti G, Albaredo F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation // *Autoimmun Rev.* 2015 Apr;14(4):277–85.
47. Onal S, Naziroglu M, Colak M, Bulut V, Flores-Arce MF. Effects of different medical treatments on serum copper, selenium and zinc levels in patients with rheumatoid arthritis // *Biol Trace Elem Res.* 2011; Sep;142(3):447–55.
48. Sahebari M, Ayati R, Mirzaei H, Sahebkar A, Hejazi S, Saghafi M, Saadati N, Ferns GA, Ghayour-Mobarhan M. Serum Trace Element Concentrations in Rheumatoid Arthritis // *Biol Trace Elem Res.* 2015; Oct 9.
49. Xin L, Yang X, Cai G, Fan D, Xia Q, Liu L, Hu Y, Ding N, Xu S, Wang L, Li X, Zou Y, Pan F. Serum Levels of Copper and Zinc in Patients with Rheumatoid Arthritis: a Meta-analysis // *Biol Trace Elem Res.* 2015; Nov;168(1):1–10.
50. Kim JE, Yoo SR, Jeong MG, Ko JY, Ro YS. Hair zinc levels and the efficacy of oral zinc supplementation in patients with atopic dermatitis // *ActaDermVenereol.* 2014; Sep;94(5):558–62.
51. Al-Timimi DJ, Sulieman DM, Hussien KR. Zinc status in type 2 diabetic patients: relation to the progression of diabetic nephropathy // *J. Clin. Diagn. Res.* 2014 Nov;8(11):CC04-8.
52. Basaki M, Saeb M, Nazifi S, Shamsaei HA. Zinc, copper, iron, and chromium concentrations in young patients with type 2 diabetes mellitus // *Biol Trace Elem Res.* 2012 Aug;148(2):161–4.
53. Kloubert V, Rink L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells // *Food Funct.* 2015; Oct;6(10):3195–204.
54. Nedumpully-Govindan P, Ding F. Inhibition of IAPP aggregation by insulin depends on the insulin oligomeric state regulated by zinc ion concentration // *Sci Rep.* 2015; Feb 4;5:8240.
55. Siddiqui K, Bawazeer N, Joy SS. Variation in macro and trace elements in progression of type 2 diabetes // *Scientific World Journal.* 2014;2014:461591.
56. Mwitikibiti C, JideAfolayan A. The Biochemical Role of Macro and Micro-Minerals in the Management of Diabetes Mellitus and its Associated Complications: A Review // *Int J VitamNutr Res.* 2015;85(1–2):88–103.
57. Swe KM, Abas AB, Bhardwaj A, Barua A, Nair NS. Zinc supplements for treating thalassaemia and sickle cell disease // *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; Jun 28;6:CD009415.
58. Faa, G., Nurchi, V. M., Ravarino, A., Fanni, D., Nemolato, S., Gerosa, C., Van Eyken, P., Geboes, K. (2008). Zincin gastrointestinal and liver disease. *Coord. Chem. Rev.* 252, 10, 1257–1269.
59. Yakoob J, Abbas Z, Usman MW, Awan S, Naz S, Jafri F, Hamid S, Jafri W. Comparison of antimicrobial activity of zinc chloride and bis-muth subsalicylate against clinical isolates of *Helicobacter pylori* // *Microb Drug Resist.* 2014; Aug;20(4):305–9.
60. Zhang WH, Wu XJ, Niu JX, Yan H, Wang XZ, Yin XD, Pang Y. Serum zinc status and *Helicobacter pylori* infection in gastric disease patients // *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(10):5043–6.
61. Kiely J., Flynn A., Singh H., Fox P.F. (1988) Improved zinc bioavailability from colloidal calcium phosphate-free cow's milk // Hurley L.S., Keen C.L., Lonnerdal B., Rucker R.B. (eds) *Trace Elements in Man and Animals-6.* P.499–500. New York: Plenum Press.
62. Bhardwaj P, Rai DV, Garg ML. Zinc as a nutritional approach to bone loss prevention in an ovariectomized rat model. *Menopause.* 2013; 20: 1184–1193.
63. Mahdavi-Roshan M, Ebrahimi M, Ebrahimi A. Copper, magnesium, zinc and calcium status in osteopenic and osteoporotic post-menopausal women // *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2015; Jan–Apr;12(1):18–21.
64. Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B, Hajimahmoodi M, Behzad M, Behfar A, Sadeghi F, Saadatmand S. The relationship between bone he-

alth and plasma zinc, copper lead and cadmium concentration in osteoporotic women // *J. Environ Health Sci Eng.* 2014; Nov 19;12(1):125.

65. Wang L, Yu H, Yang G, Zhang Y, Wang W, Su T, Ma W, Yang F, Chen L, He L, Ma Y, Zhang Y. Correlation between bone mineral density and serum trace element contents of elderly males in Beijing urban area // *Int J ClinExp Med.* 2015; Oct 15;8(10):19250–7.

66. Семёнов А.С., Скальный А.В. Иммунопатологические и патобиохимические аспекты патогенеза перинатального поражения мозга. — СПб.: Наука, 2009. — 368 с.

67. Seven M, Basaran SY, Cengiz M, Unal S, Yuksel A. Deficiency of selenium and zinc as a causative factor for idiopathic intractable epilepsy // *Epilepsy Res.* 2013; Mar.104(1–2):35–9.

68. Szewczyk B. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders // *Front Aging Neurosci.* 2013; Jul 19;5:33.

69. Modabbernia A, Arora M, Reichenberg A. Environmental exposure to metals, neurodevelopment, and psychosis // *Curr. Opin. Pediatr.* 2016; Feb 10.

70. Аглетдинов Э.Ф., Нургалеев Н.В., Фаршатов Е.Р., Таирова Э.И., Алтынбаева А.И., Иванова Г.В., Камиллов Ф.Х., Терегулова З.С., Никонов А.А. Влияние полиметаллической пыли медно-цинковых колчеданных руд на состояние минерального обмена и костной ткани // *Вестник Оренбургского государственного университета.* — 2011. — № 15 (134). — С. 15–18.

71. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. — М.: Оникс 21 век, 2004. — 216 с.

72. Moynahan E.J. (1974) Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc-deficiency disorder // *Lancet.* 2:399–400.

73. Todd W.R., Elvehjem C.A., Hart E.B. Zinc in the nutrition of the rat // *Am. J. Physiol.* 1934; 107(1):146–156.

Поступила 09.10.2015

References

1. Skaln'nyj A.V., Rudakov I.A. Biojelementy v medicine. — М.: Izdatel'skij dom «Oniks 21 vek»; Mir, 2004. — 272 s.

2. Prasad A.S. Istorija otkrytija jessencial'nosti cinka dlja cheloveka // *Mikrojelementy v medicine.* — 2010. — 11(1). — С. 1–6.

3. Mazo V.K., Skaln'nyj A.V., Gmoshinskij I.V. Jessencial'nye mikrojelementy v pitanii // *Vrach.* — 2003. — № 5. — С. 34.

4. Odinaeva N.D., Jacyk G.V., Skaln'nyj A.V. Cink i zdorov'e detej rannego vozrasta. Posobie dlja vrachej, utv. MZ RF 16.04.2002. — М., 2002. — 32 s.

5. Prasad A.S. Cink v organizme cheloveka: Rasstrojstva zdorov'ja i lechebnye jefekty // *Mikrojelementy v medicine* — 2014. — 15(1). — С. 3–12.

6. Skaln'nyj A.V. Mikrojelementy / Laboratornaja diagnostika infekcionnyh boleznej: Spravochnik / Pod red. V.I. Pokrovskogo, M.G. Tvorogovoj, G.A. Shipulina. — М.: Izdatel'stvo BINOM, 2013. — С. 447–467.

7. Skaln'nyj A.V. Cink i zdorov'e cheloveka (kniga dlja sovremennyh dumajushhih vrachej i ljuboznatel'nyh pacientov). — Orenburg: RIK GOU OGU, 2003. — 80 s.

8. Skaln'nyj A.V., Grabeklis A.R., Demidov V.A., Skaln'naja M.G., Berezkina E.S. Svjaz' jelementnogo statusa naselenija Central'nogo federal'nogo okruga s zabolevaemost'ju. Chast' 1. Jessencial'nye i uslovno jessencial'nye himicheskie jelementy // *Mikrojelementy v medicine.* — 2012. — Т. 13. — Vyp. 2. — С. 1–7.

9. Cygan V.N., Kamilova T.A., Skaln'nyj A.V., Cygan N.V., Dolgo-Soburov V.B. Patofiziologija kletki. — SPb.: JeLBI-SPb, 2014. — 128 s.

10. Oberleas D., Chan H.C. (1997) Cation complexation by phytate // *Trace Elem. Electro.* 14(4):173–176.

11. Stewart A.J., Blindauer C.A., Berezenko S., Sleep D., Sadler P.J. (2003) Interdomain zinc site on human albumin // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100(1 April):3701–3706.

12. Onosaka S., Min K-S.; Fujita Y., Tanaka K., Iguchi S., Okada Y. (1988) High concentration of pancreatic metallothionein in normal mice // *Toxicol.* 50:27–35.

13. Skaln'nyj A.V. Issledovanie vlijanija hronicheskoj alkohol'noj intoksikacii na obmen cinka, medi i litija v organizme: Diss. na soiskanie uchebnoj stepeni k.m.n. — М., 1990. — 137 s.

14. Keen C.L., Uriu-Adams J.Y., Skalny A., Grabeklis A., Grebeklis S., Green K., Yevtushok L., Wertelecki W. W., Chambers Ch.D. The plausibility of maternal nutritional status being a contributing factor to the risk for fetal alcohol spectrum disorders: The potential influence of zinc status as an example // *BioFactors (Oxford, England).* — 2010. — V. 36 (2). — P. 125–135.

15. Oberlis D., Harland B., Skaln'nyj A. Biologicheskaja rol' makro- i mikrojelementov u cheloveka i zhivotnyh. — SPb.: Nauka, 2008. — 544 s.

16. De Silva J.J.R.F., Williams J.J.P. The biological chemistry of the elements, 2nd Ed. P.315–339. Oxford: Oxford University Press. 2001.

17. Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O. (1999) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 3:183–212.

18. Nagase H., Woessner Jr. J.F. (1999) Matrix metalloproteinases // *J. Biol. Chem.* 274(31):21491–21494.

19. Shafran L.M., Pyhteeva E.G., Bol'shoj D.V. Matallotioneiny. — Odessa Chornomor'ja, 2011. — 428 s.

20. Skaln'nyj A.V., Kurchashova S.Ju., Vjatchanina E.S. Izuchenie vlijanija disbalansa cinka i drugih mikrojelementov v patogeneze alkoholizma i alkohol'noj jembriofetopatii v Rossii // *Narkologija.* — 2008. — 5. — S. 26–33.

21. Jelementnyj status naselenija Rossii. Chast' 2. Jelementnyj status naselenija Central'nogo Federal'nogo okruga / Pod red. A.V. Skaln'nogo, M.F. Kiseleva. — SPb.: Medkniga «JeLBI-SPb», 2011. — 432 s.

22. Bailey RL, West KP Jr, Black RE. The epidemiology of global micronutrient deficiencies // *Ann NutrMetab.* 2015;66 Suppl 2:22–33.

23. Anatoly V. Skalny, Margarita G. Skalnaya, Alexey A. Tinkov, Eugeny P. Serebryansky, Vasily A. Demidov, Yulia N. Lobanova, Andrei R. Grabeklis, Elena S. Berezkina, Irina V. Gryazeva, Andrey A. Skalny, Oksana A. Skalnaya, Nikolay G. Zhivaev, Alexandr A. Nikonov. Hair concentration of essential trace elements in adult non-exposed Russian population // *Environ Monit Assess.* 2015. 187:677.

24. Skalny, A.A., Tinkov, A.A., Medvedeva, Y.S., Alchinova, I.B., Karganov, M.Y., Skalny, A.V., Nikonov, A.A. (2015). Effect of short-term zinc supplementation on zinc and selenium tissue distribution and serum antioxidant enzymes // *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 14(3), 269–276. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.3.28

25. Namdarghanbari MA, Bertling J, Krezoski S, Petering DH. Toxic metal proteomics: reaction of the mammalian zinc proteome with Cd²⁺ // *J. Inorg Biochem.* 2014; Jul;136:115–21.

26. Keilin D., Mann J. (1940) Carbonic anhydrase: Purification and nature of the enzyme // *Biochem. J.* 34:1163–1176.

27. Kfoury G.A., Reinhold J.G., Simonian S.J. (1968) Enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats // *J. Nutr.* 95:102–110.

28. Day H.G., McCollum E.V. Effects of acute dietary zinc deficiency in the rat // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1940; 45:282–284.

29. Wintersberger E., Cox D.J., Neurath H. (1962) Bovine pancreatic procarboxypeptidase B. I. Isolation, properties and activation // *Biochem.* 1(4):1069–1078.

30. Chesters J.K. 1992. Trace element-gene interactions // *Nutr. Rev.* 50(8):217–223.

31. Hirose M., Sugimoto E., Chiba H. 1972. Studies of crystalline yeast phosphoglucomutase: the presence of intrinsic zinc // *Biochim. Biophys. Acta.* 289:137–146.

32. Su P., Oliver J.W., Sachan D.S. (1984) Influence of zinc and thyroid status on microsomal NADPH-cytochrome C reductase activity // *Fed. Proc.* 43(3):852 (Abstract 3313).

33. Maret W., Jacob C., Vallee B.L., Fischer E.H. (1999) Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(3):1936–1940.

34. Coleman J.E., Vallee B.L. Metalloprotease // *J. Biol. Chem.* 1960;235(2):390–395.

35. Petrie L., Chesters J.K., Franklin M. (1991) Inhibition of myoblast differentiation by lack of zinc // *Biochem. J.* 276(1):109–111.

36. Cui D, Han G, Shang Y, Mu L, Long Q, Du Y. The effect of chronic prostatitis on zinc concentration of prostatic fluid and seminal plasma: a systematic review and meta-analysis // *Curr Med Res Opin.* 2015; 31(9):1763–9.

37. Gawel M, Lipkowska A, Herman M, Golasik M, Piekoszewski W, Gomolka E, Schlegel-Zawadzka M, Opoka W, Nowak G, Librowski T. Chronic treatment with zinc hydroaspartate induces anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activity in rats // *Pharmacol Rep.* 2014 Oct;66(5): 862–6.

38. Goodarzi D, Cyrus A, Baghinia MR, Kazemifar AM, Shirincar M. The efficacy of zinc for treatment of chronic prostatitis // *Acta Med Indones.* 2013 Oct;45(4):259–64.

39. Skalnaya M.G., Yurasov V.V., Tinkov A.A., Demidov V.A., Skaln'nyj A.V. Association between semen quality and level of 20 essential and toxic metals in ejaculate // *Trace elements and Electrolytes.* — 2015. [In Press]

40. Beisel W.R. Interactions between nutrition and infection. In: G.T. Strickland (ed.) *Hunter's Tropical Medicine and Emerging In-*

fectious Diseases, 8th edn. W.B. Saunders, Philadelphia. 2000. — pp. 967–968.

41. Cai H, Zhang Y, Ma Y, Sun J, Liang X, Li J. Zinc binding activity of human metapneumovirus M2-1 protein is indispensable for viral replication and pathogenesis in vivo // *J. Virol.* 2015 Jun;89(12):6391–405.

42. Li M, Yan K, Wei L, Yang J, Lu C, Xiong F, Zheng C, Xu W. Zinc finger antiviral protein inhibits coxsackievirus B3 virus replication and protects against viral myocarditis // *Antiviral Res.* 2015; Nov;123:50–61.

43. Mao R, Nie H, Cai D, Zhang J, Liu H, Yan R, Cuconati A, Block TM, Guo JT, Guo H. Inhibition of hepatitis B virus replication by the host zinc finger antiviral protein // *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003494.

44. Qiu M, Chen Y, Chu Y, Song S, Yang N, Gao J, Wu Z. Zinc ionophorespyrithione inhibits herpes simplex virus replication through interfering with proteasome function and NF- κ B activation // *Antiviral Res.* 2013; Oct;100(1):44–53.

45. Wei Z, Burwinkel M, Palissa C, Ephraim E, Schmidt MF. Antiviral activity of zinc salts against transmissible gastroenteritis virus in vitro // *Vet Microbiol.* 2012; Dec 7;160(3–4):468–72.

46. Bonaventura P, Benedetti G, Albaredo F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation // *Autoimmun Rev.* 2015 Apr;14(4):277–85.

47. Onal S, Naziroglu M, Colak M, Bulut V, Flores-Arce MF. Effects of different medical treatments on serum copper, selenium and zinc levels in patients with rheumatoid arthritis // *Biol Trace Elem Res.* 2011; Sep;142(3):447–55.

48. Sahebari M, Ayati R, Mirzaei H, Sahebkar A, Hejazi S, Saghafi M, Saadati N, Ferns GA, Ghayour-Mobarhan M. Serum Trace Element Concentrations in Rheumatoid Arthritis // *Biol Trace Elem Res.* 2015; Oct 9.

49. Xin L, Yang X, Cai G, Fan D, Xia Q, Liu L, Hu Y, Ding N, Xu S, Wang L, Li X, Zou Y, Pan F. Serum Levels of Copper and Zinc in Patients with Rheumatoid Arthritis: a Meta-analysis // *Biol Trace Elem Res.* 2015; Nov;168(1):1–10.

50. Kim JE, Yoo SR, Jeong MG, Ko JY, Ro YS. Hair zinc levels and the efficacy of oral zinc supplementation in patients with atopic dermatitis // *Acta Derm Venereol.* 2014; Sep;94(5):558–62.

51. Al-Timimi DJ, Sulieman DM, Hussien KR. Zinc status in type 2 diabetic patients: relation to the progression of diabetic nephropathy // *J. Clin. Diagn. Res.* 2014 Nov;8(11):CC04–8.

52. Basaki M, Saeb M, Nazifi S, Shamsaei HA. Zinc, copper, iron, and chromium concentrations in young patients with type 2 diabetes mellitus // *Biol Trace Elem Res.* 2012 Aug;148(2):161–4.

53. Kloubert V, Rink L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells // *Food Funct.* 2015; Oct;6(10):3195–204.

54. Nedumpully-Govindan P, Ding F. Inhibition of IAPP aggregation by insulin depends on the insulin oligomeric state regulated by zinc ion concentration // *Sci Rep.* 2015; Feb 4;5:8240.

55. Siddiqui K, Bawazeer N, Joy SS. Variation in macro and trace elements in progression of type 2 diabetes // *Scientific World Journal.* 2014;2014:461591.

56. Mwiti Kibiti C, JideAfolayan A. The Biochemical Role of Macro and Micro-Minerals in the Management of Diabetes Mellitus and its Associated Complications: A Review // *Int J Vitam Nutr Res.* 2015;85(1–2):88–103.

57. Swe KM, Abas AB, Bhardwaj A, Barua A, Nair NS. Zinc supplements for treating thalassaemia and sickle cell disease // *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; Jun 28;6:CD009415.

58. Faa, G., Nurchi, V. M., Ravarino, A., Fanni, D., Nemolato, S., Gerosa, C., Van Eyken, P., Geboes, K. (2008). Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coord. Chem. Rev.*, 252, 10, 1257–1269.

59. Yakob J, Abbas Z, Usman MW, Awan S, Naz S, Jafri F, Hamid S, Jafri W. Comparison of antimicrobial activity of zinc chloride and bismuth subsalicylate against clinical isolates of *Helicobacter pylori* // *Microb Drug Resist.* 2014; Aug;20(4):305–9.

60. Zhang WH, Wu XJ, Niu JX, Yan H, Wang XZ, Yin XD, Pang Y. Serum zinc status and *Helicobacter pylori* infection in gastric disease patients // *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(10):5043–6.

61. Kiely J, Flynn A, Singh H, Fox P.F. (1988) Improved zinc bioavailability from colloidal calcium phosphate-free cow's milk // Hurley L.S., Keen C.L., Lonnerdal B., Rucker R.B. (eds) *Trace Elements in Man and Animals-6*. P.499–500. New York: Plenum Press.

62. Bhardwaj P, Rai DV, Garg ML. Zinc as a nutritional approach to bone loss prevention in an ovariectomized rat model. *Menopause.* 2013; 20: 1184–1193.

63. Mahdavi-Roshan M, Ebrahimi M, Ebrahimi A. Copper, magnesium, zinc and calcium status in osteopenic and osteoporotic post-menopausal women // *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2015; Jan–Apr;12(1):18–21.

64. Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B, Hajimahmoodi M, Behzad M, Behfar A, Sadeghi F, Saadatmand S. The relationship between bone health and plasma zinc, copper lead and cadmium concentration in osteoporotic women // *J. Environ Health Sci Eng.* 2014; Nov 19;12(1):125.

65. Wang L, Yu H, Yang G, Zhang Y, Wang W, Su T, Ma W, Yang F, Chen L, He L, Ma Y, Zhang Y. Correlation between bone mineral density and serum trace element contents of elderly males in Beijing urban area // *Int J ClinExp Med.* 2015; Oct 15;8(10):19250–7.

66. Semjonov A.S., Skal'nyj A.V. Immunopatologicheskie i patobiohimicheskie aspekty patogenezu perinatal'nogo porazhenija mozga . — SPb.: Nauka, 2009. — 368 s.

67. Seven M, Basaran SY, Cengiz M, Unal S, Yuksel A. Deficiency of selenium and zinc as a causative factor for idiopathic intractable epilepsy // *Epilepsy Res.* 2013;Mar.104(1–2):35–9.

68. Szewczyk B. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders // *Front Aging Neurosci.* 2013; Jul 19;5:33.

69. Modabbernia A, Arora M, Reichenberg A. Environmental exposure to metals, neurodevelopment, and psychosis // *Curr. Opin. Pediatr.* 2016; Feb 10.

70. Agletdinov Je.F., Nurgaleev N.V., Farshatova E.R., Tairova Je.I., Altynbaeva A.I., Ivanova G.V., Kamilov F.H., Teregulova Z.S., Nikonorov A.A. Vlijanie polimetallicheskoj pyli medno-cinkovyh kolchedannyh rud na sostojanie mineral'nogo obmena i kostnoj tkani // *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta.* — 2011. — № 15 (134). — S. 15–18.

71. Skal'nyj A.V. Himicheskie jelementy v fiziologii i jekologii cheloveka. — M.: Oniks 21 vek, 2004. — 216 s.

72. Moynahan E.J. (1974) Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc-deficiency disorder // *Lancet.* 2:399–400.

73. Todd W.R., Elvehjem C.A., Hart E.B. Zinc in the nutrition of the rat // *Am. J. Physiol.* 1934; 107(1):146–156.

Received 09.10.2015

Pathophysiology of microelementoses. Post 2. Zinc

Oberleas D.¹, Skalny A.V.^{2,4}, Skalaya M.G.², Nikonorov A.A.³, Nikonorova E.A.²

¹ — Department of Nutrition and Food Science, Texas Technique University, Lubbock, Texas 79423, USA

² — ANO Centre for Biotic Medicine — Satellite Centre of UNESCO institute of trace elements, Zemlyanoi val 46, Moscow, 105064, Russia. nikonorova_evg@mail.ru

³ — Orenburg State Medical University, Sovetskaya str. 6, Orenburg, 460000, Russia

⁴ — Orenburg State University, Pobeda pr. 13, Orenburg, 460018, Russia

The basic zinc kinetic data and its biological role in the human body are presented. Possible mechanisms for the implementation of its biological functions, both at the level of cells and the entire organism, are set out. Main symptoms associated with a deficiency or an excess of zinc and zinc-associated diseases are considered.

Keywords: zinc, biological role, zinc related diseases

Белки-хемокины: роль в канцерогенезе и воспалении

Карагодин В.П., Мельниченко А.А., Орехов А.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
125315, Москва, ул. Балтийская, д 8, piopp@mail.ru

В обзоре описаны функция СС-хемокинов (ССХ), играющих важную роль в регуляции воспалительного ответа и канцерогенезе. Указано на диагностический и терапевтический потенциал ССХ, которые являются одним из ключевых элементов системы растворимых факторов, обеспечивающих взаимодействие клеток иммунной системы со стромальными и опухолевыми клетками. Дальнейшее изучение структуры и функции ССХ позволит лучше понять патогенез целого ряда заболеваний, главным образом канцерогенеза, воспаления и атерогенеза, и разработать инновационные подходы к их терапии.

Ключевые слова: хемокины; цитокины, воспаление, канцерогенез, иммунная система

Введение

СС-хемокины, или β -хемокины (ССХ), — это растворимые белки, размером от 10 до 20 кДа, имеющие на N-конце 2 характерных цистеина, участвующих в образовании вторичной структуры белка [1, 2]. На сегодняшний день описано более 20 ССХ, которые производятся различными типами клеток [2, 3]. В отличие от первичных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, TNF α , ИЛ-6), хемокины называют вторичными воспалительными цитокинами. Считается, что ССХ, вместе с другими цитокинами и некоторыми ростовыми факторами, играют ключевую роль в регуляции воспалительного ответа [4–9].

Существует большое количество исследований, доказывающих, что ССХ играют важную роль в канцерогенезе [2, 10–15]. Хемокины производятся как самими опухолевыми клетками, так и макрофагами, ассоциированными с опухолью (МАО), являющимися типичными макрофагами второго типа [6, 7, 16–19]. МАО развиваются из циркулирующих моноцитов крови и, частично, в результате пролиферации тканевых макрофагов. Имеются работы, доказывающие, что цитокиновое микроокружение опухоли определяет фенотип МАО, а хемокины обеспечивают достаточный приток моноцитов с необходимыми характеристиками в опухоль [20–24].

Не вызывает сомнения диагностический и терапевтический потенциал ССХ, которые являются одним из ключевых элементов системы растворимых факторов, обеспечивающих взаимодействие клеток иммунной системы со стромальными и опухолевыми клетками [23, 25–31]. В настоящее время во всем мире ведутся исследования, направленные на разработку терапевтических инструментов, использующих активность ССХ.

Структура и функции хемокинов, роль в патогенезе

Несмотря на интенсивные исследования, ведущиеся по всему миру, существующая система хемокинов признается неполной и не объясняет все наблюдаемые феномены. Анализ генома человека выявил несколько генов, функция и профиль экспрессии которых остаются неопределенными, а структура указывает на возможную принадлежность к системе ССХ. Исследование этих генов является одним из приоритетных направлений в молекулярной биологии. Ситуация усложняется еще и тем фактом, что функции известных ССХ недостаточно хорошо опи-

саны, что не позволяет построить адекватную систему регуляции активности иммунной системы в здоровом организме и при различных патологиях. Особый интерес представляют активация и выключение экспрессии различных хемокинов в опухолевых клетках. Будучи важными регуляторными элементами, хемокины обеспечивают эффективный уход опухоли из-под иммунологического контроля и поэтому представляют собой привлекательную мишень для иммунотерапии [32, 33].

Взаимодействие клеток иммунной системы со стромальными и опухолевыми клетками регулируется набором растворимых факторов, включающем цитокины, хемокины и ростовые факторы. При том, что роль факторов роста и цитокинов в процессах взаимодействия различных типов клеток описана в общем, неизученными остаются специфичные функции некоторых ССХ, в частности, относительно нового ССХ, обозначаемого как CLTAP [7]. Предполагается, что изучение функции CLTAP позволит лучше понять механизм взаимодействия клеток иммунной системы со стромальными и опухолевыми клетками, а также позволит выявить новые перспективные терапевтические мишени.

В здоровом организме хемокины определяют, какой тип клеток иммунной системы будет преимущественно проникать в ту или иную ткань. Так, клетки кожи производят большие количества CCL17, который обеспечивает инфильтрацию CLA⁺ Т-клеток. Кэмпбеллом и коллегами [34–37] было показано, что CCL17 приводит к прикреплению Т лимфоцитов к стенкам сосудов и их инфильтрации. Считается, что CCL17 играет ключевую роль в формировании Т-клеточного инфильтрата при хронических воспалениях. Позднее было продемонстрировано, что помимо CCL17, также и CCL27 способен привлекать CLA⁺ Т лимфоциты в кожу. Некоторые различия при этом наблюдались в природе воспалительной реакции. Для воздействия на лимфоциты CCL17 использует CCR4, а CCL27 — CCR10, поэтому предполагается наличие некоторых различий в популяции привлекаемых клеток. Однако, как показали исследования с использованием мышиных моделей, в большой степени активности этих двух хемокинов пересекаются [38].

Для полной блокировки инфильтрации Т лимфоцитов в место воспаления была необходима блокировка как CCR4, так и CCR10. Другой представитель семейства ССХ (CCL25) определяет популяцию иммунных клеток, инфильтрирующих в эпителий тонкой кишки. CCL25

производится только клетками эпителия тонкой кишки и связывается с рецептором CCR9 на поверхности CD4+ и CD8+ лимфоцитов, что приводит к их инфильтрации и развитию фенотипа, характерного для лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником. Кроме привлечения различных клеток иммунной системы в соответствующие органы и ткани, некоторые ССХ являются антагонистами и блокируют миграцию тех или иных иммунных клеток [39].

Так, для CCL18 было показано антагонистическое действие на клетки, несущие рецептор CCR3, базофилы, эозинофилы, Т-хелперы второго типа и некоторые типы дендритных клеток [40]. По одной из существующих теорий, высокие концентрации CCL18 в легких обеспечивают отсутствие в ней клеток, способных запустить нежелательную иммунную реакцию [41].

Хемокины являются важными факторами, обеспечивающими взаимодействие врожденного и приобретенного иммунитета. В процессе воспалительной реакции макрофаги, ключевые клетки врожденного иммунитета, проходят цикл активации от провоспалительного (макрофаги первого типа или M1) в начале до противовоспалительного (макрофаги второго типа или M2) в завершающей фазе воспаления и в процессе восстановления ткани. Для различных популяций макрофагов характерна продукция различных цитокинов. M1 производят ИЛ12 и ФНО, в то время как для M2 характерна продукция ИЛ10 и антагониста рецептора ИЛ1.

Так же и продукция хемокинов дифференциально регулируется в различных типах макрофагов. Макрофаги второго типа производят CCL18, CCL22 и CCL24, экспрессия которых активируется типичными стимуляторами M2 — ИЛ4 и ИЛ10. Эти хемокины обеспечивают выборочную миграцию Т-хелперов второго типа в точку заживления повреждения и блокируют миграцию клеток, потенциально способных поддержать воспалительную реакцию. Макрофаги первого типа производят, в свою очередь, CCL8, CCL5, CXCL10 и CXCL9. Экспрессия этих хемокинов активируется ИФН-гамма и может быть подавлена ИЛ4 и/или ИЛ10. Хемокины, характерные для M1, привлекают в место воспаления Т-хелперы первого типа, которые, в свою очередь, производят дополнительные количества ИФН-гамма, обеспечивая позитивную обратную связь.

Существует большое количество исследований, доказывающих, что ССХ играют важную роль в канцерогенезе. Хемокины производятся как самими опухолевыми клетками, так и MAO, являющимися типичными макрофагами второго типа. MAO развиваются из циркулирующих моноцитов крови и, частично, в результате пролиферации тканевых макрофагов. Существует некоторое количество работ, доказывающих, что цитокиновое микроокружение опухоли определяет фенотип MAO, а хемокины обеспечивают достаточный приток моноцитов с необходимыми характеристиками в опухоль [42].

Действительно, некоторые из хемокинов были впервые обнаружены в опухолях. Наиболее часто в опухолях обнаруживают CCL2, который был описан как «хемокин опухолевого происхождения». В опухолях человека CCL2 часто встречается в саркомах, глиомах, опухолях легких, молочной железы, шейки матки, яичников и в меланомах.

Недавние исследования показали, что CCL2 может играть двоякую роль в канцерогенезе [43]. Так, умеренная,

сравнимая с физиологической, экспрессия CCL2 клетками меланомы приводит к умеренной инфильтрации моноцитов и замедлению опухолевого роста. Значительно повышение экспрессии CCL2 клетками меланомы приводит к существенному увеличению количества MAO, увеличению динамичности опухоли, ее быстрой прогрессии и метастазированию. Другой ССХ, часто производимый опухолевыми клетками — это CCL5. Уровень экспрессии CCL5 коррелирует с плохим прогнозом рака молочной железы. Кроме упомянутых выше, опухолевые клетки часто производят CXCL12, CXCL8, CXCL1, CXCL13, CXCL17 и CCL22. Некоторые из этих хемокинов играют важную роль в прогрессии меланомы. Они напрямую стимулируют пролиферацию опухолевых клеток, стимулируют ангиогенез и блокируют противоопухолевый иммунитет [44].

В процессе дифференцировки макрофаги приобретают фенотип, характерный для физиологического состояния ткани. При этом происходит перестройка макрофагального метаболизма. Долгое время считалось, что в здоровом организме макрофаги находятся в состоянии ожидания активации экзогенным или эндогенным фактором. Основными факторами, активирующими макрофаги, считались бактериальные продукты и IFN γ , которые приводили к активации бактерицидных функций макрофагов. В начале 90-х годов прошлого века были получены результаты, указывающие на то, что под воздействием ИЛ4 макрофаги не только теряют способность к уничтожению бактерий (инактивированное состояние), но и приобретают новые уникальные свойства [45]. Тогда же было введено понятие альтернативной активации макрофагов [45].

Полученные данные позволили разработать концепцию активации макрофагов, по аналогии с Th1/Th2 дихотомией Т-клеток, таким образом, что классическая активация соответствовала активации макрофагов Th1 ассоциированным цитокином IFN γ , а альтернативная соответствовала активации Th2 цитокином ИЛ4. Позднее, для более полной аналогии с дихотомией Th1/Th2, при описании типа активации макрофагов начали использовать терминологию M1 и M2. Таким образом, в конце 90-х концепция дихотомии макрофагальной активации приняла свой окончательный вид. В соответствии с этой концепцией, к макрофагам первого типа активации относятся макрофаги, развивающиеся при стимуляции Th1 цитокином IFN γ или бактериальными продуктами, такими, как, например, липополисахариды.

К макрофагам второго типа активации относятся макрофаги, развивающиеся в результате воздействия Th2 ассоциированных цитокинов ИЛ4, ИЛ13, ИЛ10; трансформирующего фактора роста TGF-бета и противовоспалительных факторов, таких как глюкокортикоиды и ретиноиды [17]. Макрофаги первого типа активации хорошо изучены и характеризуются продукцией провоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ1, ИЛ6 и ИЛ12, экспрессией Fc-гамма рецепторов I, II и III, способностью к кислородному взрыву и значительной бактерицидной активностью [9]. Функции макрофагов второго типа весьма разнообразны и плохо изучены. Известно, что M2 производят противовоспалительные цитокины: антагонист рецептора ИЛ1 [39, 40, 46, 47], ИЛ10, антагонист рецептора CCR3 — CCL18 [12, 13], имеют на поверхности широкий спектр

лектиновых (маннозный и бета-глюкановый рецепторы) и скавенджер-рецепторов (SRI, SRII, CD163) [46] и отличаются пониженной бактерицидной активностью.

При описании M2 исследователи, как правило, концентрируются на общих эффектах, вызываемых различными стимулами, обращая мало внимания на возможные различия. Для таких цитокинов, как ИЛ4 и ИЛ13, можно ожидать весьма близких эффектов, так как эти цитокины используют общую сигнальную цепь рецептора и запускают STAT6-зависимый путь передачи сигнала. Нельзя, однако, ожидать похожего эффекта от ИЛ10 — цитокина, активирующего STAT3-зависимый путь передачи сигнала. Действительно, в литературе были описаны значительные молекулярные различия между макрофагами, стимулированными ИЛ10 и ИЛ4 [48, 49]. Несмотря на это, подавление ИЛ10 продукции ФНО и деактивация кислородного взрыва показали некоторым исследователям достаточным основанием для внесения ИЛ10 в группу цитокинов, приводящих к развитию M2. Так же были обнаружены существенные различия между макрофагами, стимулированными ИЛ4 и дексаметазоном. Шаер с коллегами показал, что ИЛ4 подавляет активированную дексаметазоном экспрессию гаптоглобинового рецептора CD163, и это подавление сопровождается соответствующими функциональными изменениями: макрофаги, стимулированные ИЛ4, в меньшей степени способны поглощать гаптоглобин, чем макрофаги, стимулированные дексаметазоном [50].

Таким образом, можно предположить, что концепция дихотомии макрофагальной активации имеет лишь ограниченное право на существование и должна уточняться с учетом различий макрофагальных фенотипов, образующихся в результате стимуляции макрофагов тем или иным цитокином или гормоном. С 2004 года предпринимаются попытки усложнить концепцию макрофагальной активации, основываясь, прежде всего, на спектре хемокинов и их рецепторов, экспрессируемых макрофагами. Так, Мантовани с коллегами, предложил разбить группу M2 на 3 подгруппы а, б и в в зависимости от того, какая система стимулов была использована для стимуляции, и обнаружил, что макрофаги из различных подгрупп производят различные СС и СХС-хемокины [1, 2]. Так как различные субпопуляции макрофагов участвуют в различных физиологических процессах, логично предположить, что их активность в определенной степени определяется спектром производимых хемокинов. Одной из ключевых функций макрофагов второго типа является эффективное завершение воспалительной реакции и восстановление поврежденной ткани. Очевидно, что неспособность макрофагов второго типа осуществлять свою функцию будет приводить либо к эскалации воспалительной реакции, либо к развитию хронического воспаления. Несмотря на значительную степень риска эскалирующей воспалительной реакции, она проявляется в виде очевидных симптомов, что, как правило, позволяет своевременно использовать адекватную терапию. Хроническое воспаление при этом может зачастую протекать бессимптомно и длительное время персистировать в организме, создавая риск злокачественной трансформации клеток.

Для того, чтобы понять, каким образом воспаление может приводить к развитию рака, необходимо, прежде всего, понять детали самого процесса воспаления и его роли в таких физиологических процессах, как инфекция

и регенерация. В ответ на повреждение ткани в организме запускается сложный каскад молекулярных и клеточных реакций, направленных на восстановление поврежденной ткани. Спусковым механизмом воспалительной реакции является активация тромбоцитов, в результате которой в месте повреждения выбрасываются гепарин, серотонин, тромбин факторы коагуляции, белки клеточной адгезии, ростовые факторы — PDGF, трансформирующий фактор роста бета, тромбоцитарный фактор-4 (PF-4) и другие. Ростовые факторы, производимые тромбоцитами, приводят к стимуляции миграции нейтрофилов, которые реагируют на ростовые факторы и на бактериальные продукты, находящиеся в месте повреждения. Несмотря на терминальную дифференцировку, нейтрофилы сохраняют способность производить значительные количества цитокинов и хемокинов, необходимых для привлечения эффекторных клеток [26]. Нейтрофилы стимулируют воспалительную реакцию, производя провоспалительные цитокины ФНО [51], IFN γ и ИЛ1бета [52]. Эти цитокины действуют на эндотелий близлежащих сосудов и стимулируют адгезию лейкоцитов, которые мигрируют к точке повреждения. Кроме того, нейтрофилы могут запускать первичные механизмы регенерации, стимулируя продукцию матриксных металлопротеиназ и фактора роста кератиноцитов фибробластами [53].

Миграция моноцитов стимулируется растворимыми факторами, секретируемыми тромбоцитами и нейтрофилами: PF-4, TFP-бета, PDGF, MCP-1, -2, -3, MIP1альфа, MIP1бета, ФНО и ИЛ1бета. Количество моноцитов, инфильтрирующих в место воспаления, достигает максимума к тому моменту, когда количество нейтрофилов уже снижается. Инфильтрирующие моноциты дифференцируются в макрофаги и дендритные клетки и активируются под действием цитокинов и ростовых факторов, производимых нейтрофилами и тромбоцитами [54]. Активированные макрофаги являются основными источником ростовых факторов и цитокинов TFPбета1, PDGF, EGF, TFRальфа, IGF-I и II, ФНО и ИЛ1, играющих ключевую роль в регуляции активности клеток, восстанавливающих поврежденную ткань. Кроме того, макрофаги сами активно участвуют в этом процессе, производя компоненты внеклеточного матрикса, ферменты для его перестройки, фагоцитируя апоптотические и некротические клетки и стимулируя ангиогенез [55, 56]. При этом хемокины, регулирующие процесс регенерации, не только инициируют миграцию лейкоцитов, но и обеспечивают своевременное подавление воспалительной реакции. Так, MCP-1, являющийся одним из основных факторов хемотаксиса моноцитов, также инициирует продукцию ИЛ4, что приводит к переходу воспаления из фазы Th1 в Th2.

Таким образом, воспаление представляет собой самоограничивающийся процесс, причем это его свойство определяется последовательностью продукции цитокинов лейкоцитами. Так, например, ответ макрофагов на LPS можно разделить на две фазы. В первой фазе макрофаги производят большие количества провоспалительного цитокина ФНО, продукция которого достигает максимума через 3 часа после начала стимуляции и блокируется внутриклеточными механизмами не позднее, чем через 6 часов [57].

На втором этапе макрофаги начинают производить противовоспалительный цитокин ИЛ10, который подавляет продукцию провоспалительных цитокинов во вновь

приходящих клетках. Кроме того, ФНО, стимулирующий воспалительный ответ, способен подавлять продукцию ИЛ12, необходимого для активации Th1 клеток [58].

Несмотря на сложность системы регуляции воспаления, очевидно, существует высокоэффективная многоуровневая система контроля нормального протекания этого процесса, которая приводит к своевременному завершению воспалительной реакции. Нарушение функционирования этой системы контроля приводит к патологии и развитию хронического воспаления.

При хроническом воспалении основные компоненты воспалительного инфильтрата — макрофаги и нейтрофилы не получают ингибирующего сигнала достаточной силы и пребывают в состоянии провоспалительной активности, которое характеризуется повышенной продукцией бактерицидных соединений кислорода и азота. Будучи высокоактивными, сами по себе эти соединения способны реагировать и приводить к образованию пероксонитрита, являющегося мутагеном [59]. Таким образом, при хроническом воспалении в ткани одновременно активированы 2 процесса:

1) повреждение ткани патогеном (или бактерицидной активностью макрофагов);

2) стимуляция регенерации.

Комбинация этих процессов приводит к повышенной пролиферации эпителиальных клеток на фоне высоких концентраций мутагенных соединений, что ведет к ускорению накопления таких геномных aberrаций, как точечные мутации, делеции и перестройки. Эксперименты показали, что частота мутаций гена p53, обнаруживаемая при таких хронических воспалительных заболеваниях, как ревматоидный артрит или воспалительные заболевания кишечника, близка к частоте подобных мутаций в опухолях [60].

Хемокины и связанные с ними молекулярные механизмы играют важную роль не только в процессе инициации опухоли. В настоящее время не подвергается сомнению тот факт, что большинство солидных опухолей содержит значительное количество MAO, и что эти клетки влияют на течение заболевания [61]. Опухолевые клетки зачастую производят цитокины и хемокины, характерные для регенерирующей ткани, что обеспечивает эффективное привлечение моноцитов и их дифференцировку в макрофаги [24, 26, 62]. Клинические исследования показали, что количество MAO коррелирует с плохим прогнозом [24]. Эта корреляция особенно сильна в случае рака молочной железы, простаты, яичников и шейки матки; в случае рака желудка и легких данные до сих пор противоречивы [24]. Видимо, можно утверждать, что количество MAO коррелирует с ускоренной прогрессией опухоли и метастазированием.

Предполагается также, что баланс между хемокинами, обладающими ангиогенной и ангиостатической активностью, играет важную роль в регуляции атерогенеза [63]. Действительно, в формировании атеросклеротического поражения принимают участие хемокины CCL2 и CCL5, CCL3, CCL4 и CCL5 [64]. CCL2 индуцирует хемотаксис моноцитов до их включения в эндотелиальную стенку [64]. CCL5 может экспрессироваться различными типами клеток, включая моноциты/макрофаги, Т-лимфоциты и гладкомышечные клетки. Он стимулирует адгезию моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов и их трансэндотелиальный диapedез [65].

Таким образом, имеется большое количество экспериментальных и клинических исследований, в которых доказана роль системы хемокинов и их рецепторов в развитии атеросклероза. Важно отметить, что ряд хемокинов обладает атеропротективным эффектом, например, CXCL12 (за счет его связывания с рецептором CXCR4) и CXCL16. Комплексный подход к изучению этих механизмов позволяет надеяться на создание препаратов, влияющих на клеточно-гуморальное звено воспалительного компонента атеросклеротического процесса.

Подводя итог, можно констатировать, что для понимания механизмов регуляции воспаления, инициации и прогрессии опухолей, а также атерогенеза необходимо иметь полное представление о хемокинах, участвующих в этих процессах. Несмотря на значительный прогресс в рассматриваемой области, некоторые хемокины до сих пор остаются неизученными и присутствуют в базе данных в виде гипотетических белков. Изучение их структуры и функции позволит лучше понять патогенез целого ряда заболеваний и разработать инновационные подходы к их терапии.

Список литературы

1. Mantovani A., Sica A., Sozzani S. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // *Trends. Immunol.* — 2004. — Vol. 25. — P. 677–686.
2. Mantovani A. Chemokines in neoplastic progression // *Semin. Cancer. Biol.* — 2004. — Vol. 14. — P. 147–148.
3. Mantovani A., Sozzani S., Locati M. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes // *Trends. Immunol.* — 2002. — Vol. 23. — P. 549–555.
4. Gratchev A., Guillot P., Hakiy N. et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3 // *Scand. J. Immunol.* — 2001. — Vol. 53. — P. 386–392.
5. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Duperrier K. et al. The receptor for interleukin-17E is induced by Th2 cytokines in antigen-presenting cells // *Scand. J. Immunol.* — 2004. — Vol. 60. — P. 233–237.
6. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Utikal J., Goerdts S. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages // *Scand. J. Immunol.* — 2005. — Vol. 61. — P. 10–17.
7. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kothe K. et al. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals // *Immunobiology.* — 2006. — Vol. 211. — P. 473–486.
8. Hurst S.D., Muchamuel T., Gorman D.M. et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25 // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. 169. — P. 443–453.
9. Hamilton T.A. Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity // *In The Macrophage.* — 2002. B. Burke and C.E. Lewis, eds. Oxford University Press, Oxford.
10. Lin E.Y., Nguyen A.V., Russell R.G., Pollard J.W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy // *J. Exp. Med.* — 2001. — Vol. 193. — P. 727–740.
11. Lin E.Y., Gouon-Evans V., Nguyen A.V., Pollard J.W. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression // *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* — 2002. — Vol. 7. — P. 147–162.
12. Kodelja V., Kraft S., Politz O. et al. Langerhans cells do not express alternative macrophage activation-associated CC chemokine (AMAC)-1 // *Res. Immunol.* — 1998. — Vol. 149. — P. 633–637.
13. Kodelja V., Muller C., Politz O. et al. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 160. — P. 1411–1418.

14. Kodelja V., Goerd S. Dissection of macrophage differentiation pathways in cutaneous macrophage disorders and in vitro // *Exp. Dermatol.* — 1994. — Vol. 3. — P. 257–268.
15. Schebesch C., Kodelja V., Muller C. et al. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro // *Immunology.* — 1997. — Vol. 92. — P. 478–486.
16. Goerd S., Politz O., Schledzewski K. et al. Alternative versus classical activation of macrophages // *Pathobiology.* — 1999. — Vol. 67. — P. 222–226.
17. Gratchev A., Schledzewski K., Guillot P., Goerd S. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol // Appl. Skin. Physiol.* — 2001. — Vol. 14. — P. 272–279.
18. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kannoakadan S. et al. Activation of a TGF- β -Specific Multistep Gene Expression Program in Mature Macrophages Requires Glucocorticoid-Mediated Surface Expression of TGF- β Receptor II // *J. Immunol.* — 2008. — Vol. 180. — P. 6553–6565.
19. Kzhyshkowska J., Mamidi S., Gratchev A. et al. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway // *Blood.* — 2006. — Vol. 107. — P. 3221–3228.
20. Burke B., Lewis C.E. *The Macrophage.* — Oxford University Press, Oxford.
21. Anderson C.F., Gerber J.S., Mosser D.M. Modulating macrophage function with IgG immune complexes // *J. Endotoxin. Res.* — 2002. — Vol. 8. — P. 477–481.
22. Anderson C.F., Mosser D.M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage // *J. Leukoc. Biol.* — 2002. — Vol. 72. — P. 101–106.
23. Bando H., Toi M. Tumor angiogenesis, macrophages, and cytokines // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2000. — Vol. 476. — P. 267–284.
24. Bingle L., Brown N.J., Lewis C.E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies // *J. Pathol.* — 2002. — Vol. 196. — P. 254–265.
25. Biswas S.K., Gangi L., Paul S. et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation) // *Blood.* — 2006. — Vol. 107. — P. 2112–2122.
26. Brigati C., Noonan D.M., Albin A., Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? // *Clin. Exp. Metastasis.* — 2002. — Vol. 19. — P. 247–258.
27. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer // *Nature.* — 2002. — Vol. 420. — P. 860–867.
28. Garcia-Zepeda E.A., Combadiere C., Rothenberg M.E. et al. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3 // *J. Immunol.* — 1996. — Vol. 157. — P. 5613–5626.
29. Hu C., Xiong J., Zhang L. et al. PEG10 activation by co-stimulation of CXCR5 and CCR7 essentially contributes to resistance to apoptosis in CD19+CD34+ B cells from patients with B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia // *Cell. Mol. Immunol.* — 2004. — Vol. 1. — P. 280–294.
30. Hwang J., Son K.N., Kim C.W. et al. Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis // *Cytokine.* — 2005. — Vol. 30. — P. 254–263.
31. Katakura T., Miyazaki M., Kobayashi M. et al. CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 172. — P. 1407–1413.
32. Owen M.R., Byrne H.M., Lewis C.E. Mathematical modelling of the use of macrophages as vehicles for drug delivery to hypoxic tumour sites // *J. Theor. Biol.* — 2004. — Vol. 226. — P. 377–391.
33. Saji H., Koike M., Yamori T. et al. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma // *Cancer.* — 2001. — Vol. 92. — P. 1085–1091.
34. Campbell J.J., Pan J., Butcher E.C. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 163. — P. 2353–2357.
35. Campbell J.J., Haraldsen G., Pan J. et al. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells // *Nature.* — 1999. — Vol. 400. — P. 776–780.
36. Andrew D.P., Ruffing N., Kim C.H. et al. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 166. — P. 103–111.
37. Reiss Y., Proudfoot A.E., Power C.A. et al. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin // *J. Exp. Med.* — 2001. — Vol. 94. — P. 1541–1547.
38. Schober A., Zerneck A., Liehn E.A. et al. Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets // *Circ. Res.* — 2004. — Vol. 95. — P. 1125–1133.
39. Spring H., Schuler T., Arnold B. et al. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102. — P. 18111–18116.
40. Schober A., Zerneck A. Chemokines in vascular remodeling // *Thromb Haemost.* — 2007. — Vol. 97. — P. 730–737.
41. Soehnlein O., Zerneck A., Eriksson E.E. et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes // *Blood.* — 2008. — Vol. 112. — P. 1461–1471.
42. Gregory J.L., Morand E.F., McKeown S.J. et al. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2 // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177. — P. 8072–8079.
43. Schafer Z.T., Brugge J.S. IL-6 involvement in epithelial cancers // *J. Clin. Invest.* — 2007. — Vol. 117(12). — P. 3660–3663.
44. Valinluck V., Sowers L.C. Inflammation-mediated cytosine damage: a mechanistic link between inflammation and the epigenetic alterations in human cancers // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67(12). — P. 5583–5586.
45. Stein M., Keshav S., Harris N., Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation // *J. Exp. Med.* — 1992. — Vol. 176. — P. 287–292.
46. Vannier E., de Waal M.R., Salazar-Montes A. et al. Interleukin-13 (IL-13) induces IL-1 receptor antagonist gene expression and protein synthesis in peripheral blood mononuclear cells: inhibition by an IL-4 mutant protein // *Blood.* — 1996. — Vol. 87. — P. 3307–3315.
47. Vannier E., Miller L.C., Dinarello C.A. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1992. — Vol. 89. — P. 4076–4080.
48. Lang R., Patel D., Morris J.J. et al. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10 // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. 169. — P. 2253–2263.
49. Stumpo R., Kauer M., Martin S., Kolb H. IL-10 induces gene expression in macrophages: partial overlap with IL-5 but not with IL-4 induced genes // *Cytokine.* — 2003. — Vol. 24. — P. 46–56.
50. Schaefer D.J., Boretti F.S., Schoedon G., Schaffner A. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids // *Br. J. Haematol.* — 2002. — Vol. 119. — P. 239–243.
51. Feiken E., Romer J., Eriksen J., Lund L.R. Neutrophils express tumor necrosis factor- α during mouse skin wound healing // *J. Invest. Dermatol.* — 1995. — Vol. 105. — P. 120–123.
52. Hubner G., Brauchle M., Smola H. et al. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice // *Cytokine.* — 1996. — Vol. 8. — P. 548–556.
53. Chedid M., Rubin J.S., Csaky K.G., Aaronson S.A. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1 // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269. — P. 10753–10757.
54. Osusky R., Malik P., Ryan S.J. Retinal pigment epithelium cells promote the maturation of monocytes to macrophages in vitro // *Ophthalmic. Res.* — 1997. — Vol. 29. — P. 31–36.
55. DiPietro L.A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells // *Shock.* — 1995. — Vol. 4. — P. 233–240.
56. Fritsch C., Simon-Assmann P., Kedinger M., Evans G.S. Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine // *Gastroenterology.* — 1997. — Vol. 112. — P. 826–838.
57. Clark W.H., Elder D.E., Guerry D.I.V. et al. Model predicting survival role of inflammation in cancer development // *Mol. Cancer Res.* — 2006. — Vol. 4. — P. 4–6.

58. Ma X., Sun J., Papasavvas E. et al. Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164. — P. 1722–1729.

59. Maeda H., Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer // *Biochemistry.* — 1998. — Vol. 63. — P. 854–865.

60. Yamanishi Y., Boyle D.L., Rosengren S. et al. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2002. — Vol. 99. — P. 10025–10030.

61. Mantovani A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines // *Lab. Invest.* — 1994. — Vol. 71. — P. 5–16.

62. Leek R.D., Harris A.L. Tumor-associated macrophages in breast cancer // *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* — 2002. — Vol. 7. — P. 177–189.

63. Krohn R., Raffetseder U., Bot I. et al. Y-box binding protein-1 controls CC chemokine ligand-5 (CCL5) expression in smooth muscle cells and contributes to neointima formation in atherosclerosis-prone mice // *Circulation.* — 2007. — Vol. 116. — P. 1812–1820.

64. Zernecke A., Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis // *Cardiovasc. Research.* — 2010. — Vol. 86. — P. 192–201.

65. Weber C., Schober A., Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell re-cruitment in atherosclerotic vascular disease // *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 1997–2008.

Посмунна 15.10.2015

Proteins-chemokines: the role in carcinogenesis and inflammation

Karagodin V.P., Melnichenko A.F., Orekhov A.N.

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Sciences,
Moscow 125315, Russia. E-mail: katrincorde@gmail.com

The review deals with issues related to the involvement of CC-chemokines in regulating the inflammatory response and carcinogenesis. CC-chemokines have the diagnostic and therapeutic potential and they are key elements of the soluble factors system which ensure interaction between immune system and stromal and tumor cells. Further study of the CC-chemokines structure and functions will allow a better understanding the pathogenesis of a number of diseases, mainly carcinogenesis, inflammation and atherogenesis, and produce innovative approaches to their treatment.

Key words: chemokines; cytokines, inflammation, carcinogenesis, immune system

Универсальные механизмы токсичности ртути

Тиньков А.А.^{1,2}, Айсувакова О.П.³, Скальная М.Г.⁴, Попова Е.В.¹, Сеницкий А.И.⁵,
Немерешина О.Н.¹, Гатиатуллина Е.Р.¹, Скальный А.В.^{2,4}, Никоноров А.А.¹

¹ — Кафедра биохимии, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, Оренбург, 460000, ул. Советская, 6

² — Лаборатория биотехнологии и прикладной биоэлементологии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова», Россия, Ярославль, 150000, ул. Советская, 14

³ — Кафедра химии и методики преподавания химии, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургский государственный педагогический университет», Россия, Оренбург, 460014, ул. Советская, 19

⁴ — Автономная некоммерческая организация «Центр биотической медицины», Россия, Москва, 105064, ул. Земляной Вал, 46

⁵ — Кафедра химии фармацевтического факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Россия, Челябинск, 453092, ул. Воровского, 64

Ртуть является одним из наиболее токсичных неорганических поллютантов. Несмотря на большое количество патологических состояний, ассоциированных с воздействием ртути на организм, существуют универсальные механизмы токсичности данного металла. Существующие литературные данные свидетельствуют о выраженной роли окислительного и эндоплазматического стресса, а также воспаления в токсичности ртути. В настоящем обзоре суммированы данные о прооксидантном эффекте ртути, ее влиянии на отдельные ферментативные и неферментативные антиоксиданты. Также приведены данные о развитии эндоплазматического стресса и воспаления в ответ на воздействие данного металла. Существующие данные свидетельствуют о терапевтическом потенциале модификации данных процессов при лечении острой и хронической ртутной интоксикации.

Ключевые слова: ртуть, окислительный стресс, воспаление, эндоплазматической стресс

Введение

Ртуть является токсичным металлом, широко распространенным в окружающей среде [1] за счет как естественных, так и антропогенных источников [2]. Последние исследования продемонстрировали трехкратное увеличение содержания ртути в мировом океане по сравнению с исходными доантропогенными показателями [3]. В связи с этим, изучение токсичности данного металла становится все более актуальным. Человек подвержен токсическому воздействию паров металлической ртути, а также ее органических и неорганических соединений [4, 5], которые поступают в организм, ингаляционным, пероральным и парентеральным путями [6]. Многочисленные исследования продемонстрировали взаимосвязь между воздействием ртути на человеческий организм, ее аккумуляцией и развитием нейродегенеративных [7, 8, 9], аутоиммунных [10, 11, 12], сердечно-сосудистых [13], почечных [14, 15, 16] и прочих заболеваний [17]. Несмотря на многочисленность клинических проявлений воздействия ртути, существуют универсальные механизмы токсичности, данного металла, задействованные в патогенезе практически всех ртуть-ассоциированных заболеваний. В настоящем обзоре рассматривается роль ртути в активации свободнорадикального окисления, воспаления, а также эндоплазматического стресса.

Краткая химическая характеристика ртути

В связи с тем, что целью настоящего обзора не является детальное рассмотрение физико-химических свойств ртути, имеет смысл остановиться лишь на тех характеристиках металла, которые имеют прямое отношение к ее биологическому действию.

Ртуть ^{80}Hg (атомная масса 200,59) является элементом 12-й группы периодической системы, в которую также входят цинк ^{30}Zn и кадмий ^{48}Cd . К настоящему времени открыто более двух десятков изотопов этого элемента, в том числе стабильные Hg^{196} , Hg^{198} , Hg^{199} , Hg^{200} , Hg^{201} , Hg^{202} [18]. В основном состоянии атом ртути имеет электронную конфигурацию $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^2$. Наличие «инертной»- $6s^2$ -пары электронов объясняет низкую химическую активность ртути [19].

Поскольку $5d$ -подуровень атома ртути заполнен, отношение ее к d -элементам формально и фактически это уже переходной элемент. Высокая устойчивость d^{10} -оболочки обуславливает трудность отрыва третьего электрона [20], свидетельством чего является высокое значение третьего потенциала ионизации (3300 кДж/моль). Этот элемент фактически не образует соединений, в которых d -подуровень был бы незаполненным, таким образом, наиболее устойчивой для ртути является степень окисления +2. В отличие от цинка и кадмия, для которых более характерна степень окисления +2, для ртути в ее соединениях встречается также степень окисления +1 [21]. Наличие заполненного d -подуровня усиливает ковалентный характер соединений Hg , в частности ее галогенидов. Для ртути характерно образование ди-, три-, тетраядерных кластеров (Hg_2^{2+} , Hg_3^{2+} , Hg_4^{2+} [22]) за счет ковалентных связей $\text{Hg}-\text{Hg}$. В соответствии с выраженным стремлением к образованию ковалентных связей ртуть образует широкий спектр устойчивых металлоорганических соединений [18, 19]. Образующиеся в соответствии с вышеописанными свойствами органические и неорганические соединения ртути присутствуют в окружающей среде и способны реализовывать свое токсическое действие. В то же время, подробное описание данных форм не является це-

люю настоящей работы, тем более что данный вопрос освящен в ряде обзоров [3, 23].

С другой стороны, с переходными элементами этот элемент сближает способность к комплексообразованию. Для ртути наиболее характерны координационные числа 2 и 4 для комплексов линейного и тетраэдрического строения соответственно, причем предпочтительным является именно тетраэдрическое окружение [22]. Возможны и другие координационные числа (5, 8), однако они встречаются значительно реже [18]. Ион ртути (II) с заполненной d-оболочкой дает наиболее прочные комплексы с лигандами, в состав которых входят более тяжелые атомы. Наиболее устойчивые комплексы образуются с лигандами, содержащими атомы азота, фосфора, серы, галогенов [18, 19]. Отмечена способность ртути образовывать прочные связи с тиоловыми группами и серусодержащими лигандами. Диалкилсульфиды R_2S легко образуют с ионом Hg^{2+} комплексы типа $[HgR_2S]^+$ [24] и $[HgHal_n]^{n-2}$ с мягкими лигандами — аммиаком, аминами, цианид- и галогенил-ионами [25].

Согласно представлениям Пирсона катионы ртути Hg^{2+} и Hg_2^{2+} относятся к группе «мягких кислот». Это акцепторы электронов с высокой поляризуемостью, низкой электроотрицательностью и большим ионным радиусом (0,116 нм для Hg^{2+} и 0,111 нм для Hg^+), что вообще характерно для ионов с электронной конфигурацией d^{10} [26]. Кислотно-основное взаимодействие по принципу жестких и мягких кислот и оснований происходит таким образом, что мягкие кислоты преимущественно вступают в реакцию с мягкими основаниями. Типичным примером может служить взаимодействие $Hg(II)$ с роданид-ионами. Так в комплексе $[Hg(SCN)_4]^{2-}$ центральный атом координирован с лигандами через более «мягкий» атом S, а не через «жесткий» N [27].

В связи с вышеуказанными свойствами, ртуть взаимодействует с -SH группами биологически активных соединений *in vivo*. В частности, продемонстрирована способность ртути реагировать с аминокислотами [28], глутатионом [29, 30], восстановленным коферментом А (КоА-SH) и ацил-КоА [31], а также рядом белков [32—34]. Подобное поведение ртути *in vivo* во многом предопределяет характер биологического действия ртути, о котором пойдет речь ниже.

Ртуть и окислительный стресс

Благодаря своим физико-химическим свойствам, ртуть является индуктором окислительного стресса в биологических системах. В частности, было продемонстрировано, что лица, подверженные профессиональному воздействию ртути (уровень ртути в 40 раз выше чем в контроле) подвержены развитию окислительного стресса. В пользу последнего свидетельствует повышение концентрации 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина, который является маркером окислительного повреждения ДНК, а также снижение уровня антиоксидантов в сыворотке [35]. Сходные данные были получены при обследовании работников хлор-щелочного производства [36]. Также показана четкая взаимосвязь между развитием окислительного стресса и поступлением ртути с пищей у населения, проживающего в бассейне Амазонки [37]. Интересные данные были получены при обследовании 120 работников различных производств. В частности, установлено, что

уровень ртути в крови и моче группы рабочих, в течение длительного времени не контактировавших в условиях производства с ртутью, и контрольной группе практически не отличался. Тем не менее, уровень малонового диальдегида (МДА) в группе шахтеров был выше, чем в контрольной. Данные наблюдения позволили авторам предположить, что длительное воздействие ртути приводит к активации свободнорадикального окисления (СРО) даже после прекращения воздействия металла [38]. Также дозозависимая взаимосвязь между уровнем ртути в материнском молоке, моче грудных детей и концентрацией МДА и 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина (8ОНдГ), что свидетельствует о влиянии ртути, содержащейся в грудном молоке кормящих матерей, на развитие окислительного стресса у детей [39]. В то же время, стоит отметить, что в группе женщин, находящихся в пременопаузе и характеризующихся низким риском воздействия металлов, не было выявлено достоверной взаимосвязи между уровнем ртути в крови и такими показателями окислительного стресса как МДА, F_2 -изопростаны и др. [40].

Экспериментальные данные с использованием лабораторных животных согласуются с данными клинико-эпидемиологических исследований. При этом, было показано, что интраперитонеальное введение 1 мг/кг метилртути сопровождается интенсификацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) в различных отделах головного мозга [41]. Сходные данные, указывающие на индукцию перекисного окисления фосфолипидов в почке крыс в результате подкожного введения метилртути и хлорида ртути (II), были получены [42]. Подкожное введение ртути приводило к интенсификации ПОЛ и в других органах и тканях крыс, при этом данный эффект характеризовался дозозависимостью [43, 44, 45]. Подобные данные были получены и при пероральном введении ртути [46]. Исследование влияния подкожного введения 2 мг/кг метилртути крысам показало, что данное воздействие приводило к развитию окислительного стресса, о чем свидетельствовало повышение уровня соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РС), снижение концентрации тиоловых соединений и депрессия антиоксидантной системы [47]. Пероральное поступление хлорида ртути (II) также приводило к повышению уровня ТБК-РС в плазме крыс Wistar [48]. Исследование различных органов свиней, взятых с ферм, находящихся в областях с высоким содержанием ртути, показало, что данные животные характеризовались развитием окислительного стресса по сравнению с контрольными (обитающими на территориях с низким содержанием ртути) [49]. В то же время стоит отметить, что перинатальное воздействие 3 мг/кг метилртути не приводило к достоверному увеличению уровня ТБК-РС в мозге потомства мышей [50].

Исследования, выполненные на различных культурах клеток, также свидетельствуют о формировании окислительного стресса под влиянием ртути. Так, в частности, воздействие метилртути в концентрациях 5 и 10 мкМ в течение 1—6 часов приводило к достоверному увеличению концентрации F_2 -изопростанов в культуре астроцитов [51].

Механизмы ртуть-индуцированного окислительного стресса

Согласно классическому определению H. Sies, окислительный стресс представляет собой состояние актива-

ции СРО на фоне депрессии или неадекватной реакции антиоксидантной системы [52]. Будучи индуктором окислительного стресса ртуть воздействует на оба данных компонента [53].

Прооксидантное действие ртути

Влияние различных форм ртути на продукцию АФК было неоднократно продемонстрировано *ex vivo*. В частности, показано, что инкубация нейронов гипоталамуса GT1-7 в присутствии 10 мкМ метилртути в течение 3 часов сопровождается выраженной стимуляцией образования активных форм кислорода (АФК), о чем свидетельствовало увеличение интенсивности флюоресценции 2,7-дихлорфлуоресцеин ацетата [54]. Позже было отмечено, что данный эффект метилртути является дозозависимым в интервале концентраций от 1 до 5 мкМ [55]. Наряду с суммарной метилртуть-индуцированной интенсификацией образования АФК, Shanker с соавторами была продемонстрирована роль индивидуальных АФК в данном процессе. В частности, было показано, что при инкубации астроцитов в присутствии метилртути имеет место гиперпродукция перекиси водорода (H_2O_2), супероксид аниона (O_2^-), а также пероксинитрита ($ONOO^-$) [56]. При этом на клетках AS52 были получены данные, указывающие на ртуть-индуцированную стимуляцию ксантиноксидазы (КО) [57], которая является источником супероксид анион радикала и перекиси водорода [58]. Наряду с этим, была продемонстрирована ртуть-опосредованная индукция НАДФН-оксидазы [59, 60], также являющейся продуцентом супероксида [61]. Также было исследовано влияние ртути на митохондриальную генерацию перекиси водорода. Более того, установлено 4- и 2-кратное ртуть-индуцированное увеличение образования H_2O_2 на таких участках электронтранспортной цепи, как убихинон-цитохром b и НАДН-дегидрогеназа соответственно [62]. В то же время, нельзя не отметить результаты работы, свидетельствующие о тормозном эффекте ртути на продукцию супероксид анион радикала в активированных перитонеальных макрофагах мыши [63].

Прооксидантные свойства ртути могут реализовываться и при ее взаимодействии с биополимерами. Так, было продемонстрировано, что комплексы ртути с тиоловыми соединениями и глутатионом в частности, обладают редокс-активностью [64]. Данное наблюдение было подтверждено позже, наряду с демонстрацией способности комплекса $Hg(II)$ -[GSH]₂ к продукции супероксид аниона [65]. Сходные данные были получены и при исследовании влияния ртути на гемоглобин-катализируемое ПОЛ [66]. Более подробные данные о прооксидантном действии ртути, и в частности ее органических соединений, приведены в обзоре Е.Р. Милаевой с соавторами [67].

Влияние ртути на компоненты антиоксидантной системы

Система глутатиона

Учитывая высокую реакционную способность ртути с тиоловыми группами различных соединений, глутатион является одним из основных неферментативных антиоксидантов, чья функция нарушается при воздействии ртути.

Многочисленные исследования с использованием культуры клеток показали, что воздействие соединений ртути приводит к достоверному снижению уровня восстано-

ленного глутатиона [68, 69, 70]. Более того, в эксперименте с использованием лабораторных животных также было показано, что пренатальное воздействие ртути приводит к нарушению онтогенеза системы глутатиона и задержке возраст-ассоциированного увеличения уровня глутатиона в головном мозге [71]. В то же время, противоположные результаты были получены при исследовании влияния введения хлорида ртути через воротную вену. В частности, данные манипуляции приводили к увеличению уровня глутатиона в печени и почках крыс. При этом в последнем случае данное изменение не являлось достоверным [72]. В же время, длительное пероральное поступление метилртути в организм крыс приводило к повышению активности γ -глутамилцистеинсинтетазы, ключевого фермента синтеза глутатиона, а также уровня глутатиона в корковом слое почек [73]. Подобные явления также были отмечены и у людей. В частности, было показано, что длительное профессиональное воздействие ртути на организм шахтеров сопровождалось достоверным повышением уровня глутатиона в гемолизате эритроцитов [74].

Помимо воздействия непосредственно на глутатион, ртуть оказывает влияние и на антиоксидантные ферменты системы глутатиона, такие как глутатионпероксидаза (ГПО) (КФ 1.11.1.9) и глутатионредуктаза (ГР) (КФ 1.8.1.7). В частности, было продемонстрировано, что метилртуть приводит к угнетению ГПО в печени [75] и мозге мышей [76], а также клеточных культурах [76, 77]. Результаты исследования Usuki с соавторами также показали, что воздействие метилртути как на клеточные культуры, так и животных, сопровождалось достоверным снижением экспрессии мРНК ГПО-1 [78]. Хлорид ртути (II) также снижал активность ГПО в различных органах экспериментальных грызунов [79, 80]. В то же время, имеются данные, указывающие на повышение активности ГПО в сыворотке крови шахтеров, подверженных воздействию ртути [81].

Активность ГР также снижалась в результате воздействия метилртути в течение 16–24 часов на клеточную культуру [82]. В то же время, результаты *in vivo* исследования показали, что воздействие метилртути не приводило к достоверному изменению активности ГР в гемолизате эритроцитов крыс, хотя микромолярные концентрации нитрата ртути оказывали ингибирующее влияние на фермент *in vitro* [83]. Как и в случае глутатиона, пренатальное воздействие ртути приводило к торможению возраст-ассоциированного увеличения активности ГР и ГПО в мозге мышей [71]. Стоит отметить, что профессиональное воздействие паров ртути приводило к достоверному снижению активности ГР в эритроцитах рабочих по сравнению с контрольной группой [87].

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1)

Супероксиддисмутаза (СОД) осуществляет дисмутацию супероксид анион радикала с образованием перекиси водорода. Как и многие другие белки, данный фермент подвержен воздействию ртути. Исследования Venov с соавторами показали, что ртутная интоксикация сопровождается инактивацией СОД [85]. В частности, было выявлено снижение уровня Cu, Zn -СОД в митохондриях и цитозоле гепатоцитов мышей, подверженных воздействию ртути [86]. Также установлено, что различные соединения ртути являются инактиваторами как Cu, Zn -СОД, так и Mn -СОД *in vitro*, в то время как Mn -СОД в большей сте-

пени была подвержена воздействию метилртути *in vivo*. При этом, данный эффект не являлся следствием изменения экспрессии мРНК данного белка [87]. В то же время, имеются данные указывающие на увеличение уровня Mn-SOD в почках, которое, тем не менее, сопровождается снижением активности фермента [88]. В то же время, также были получены данные, указывающие на двукратную активацию активности Cu,Zn-SOD в AS52 клетках в ответ на присутствие 1 мкМ ртути (II) [57]. Впоследствии было показано, что воздействие ртути положительно регулирует уровень мРНК как Cu,Zn-SOD, так и Mn-SOD в C2C12-DMPK160 клетках [78]. Воздействие паров ртути также приводило к активации Cu,Zn-SOD в легких мышей, в то время как активность Mn-SOD характеризовалась снижением [89]. Интересные данные о влиянии перорального воздействия HgCl₂ на активность СОД у крыс Wistar были получены Vando с соавторами. В частности, первые сутки воздействия ртути сопровождались ростом активности как Cu,Zn-SOD, так и Mn-SOD в гомогенатах печени. При этом дальнейшее воздействие приводило к достоверному снижению активности форм СОД по сравнению с контрольными значениями [90]. Обследование различных групп людей также подтвердило влияние ртути на активность СОД. В частности, у лиц, подверженных воздействию ртути в течение длительного времени (7–32 мес.) отмечалось достоверное снижение активности СОД в эритроцитах относительно контрольных показателей [84]. Данное наблюдение также было подтверждено позднее [91]. В то же время, при обследовании женщин, работающих в контакте с парами ртути, было установлено, что активность СОД незначительно повышается в сопряжении с креатинин-корректированной концентрацией ртути в моче [92].

Каталаза (КФ 1.11.1.6)

Исследование с использованием культивированных клеток головного мозга крыс показало, что воздействие 100 нМ метилртути приводило к снижению активности каталазы [93]. Полученные авторами данные согласуются с более ранними указаниями на подавляющее влияние хлорида ртути в отношении каталазы эритроцитов *ex vivo* [66]. При этом пероральное воздействие метилртути приводило к снижению активности каталазы в печени и почках лабораторных крыс, хотя достоверными данные изменения являлись лишь в последнем случае [94], что подтверждает ранее полученные данные [95]. Также у животных, находящихся под влиянием метилртути отмечалась тенденция к снижению активности каталазы в эритроцитах [96]. Стоит отметить, что результаты обследования различных групп лиц предоставили противоречивые данные относительно взаимодействия «ртуть-каталаза». Так, в частности, отмечено снижение активности каталазы у женщин, проживающих в районе Амазонки и находящихся под влиянием ртути, по сравнению с соответствующей группой не подверженных воздействию металла [97]. В то же время, ряд других исследований продемонстрировал положительную взаимосвязь между активностью каталазы и содержанием ртути в организме [98, 92].

Тиоредоксиновая система

Тиоредоксины представляют собой малые белки, содержащие, как и глутатион, свободные дисульфидные группы, являющиеся мишенью для ионов ртути [99]. В ча-

стности, было показано, что ртуть осуществляет окисление тиоредоксина 1 и 2 значительно более активно по сравнению с такими металлами как кадмий, цезий, медь, железо, никель и цинк [100]. Наряду с окислением тиоловых групп тиоредоксинов, отмечается снижение внутриклеточного уровня тиоредоксина 1 в человеческих моноцитах под влиянием различных концентраций хлорида ртути (II) [101].

Помимо воздействия непосредственно на тиоредоксины, ртуть также оказывает существенное влияние на активность тиоредоксинредуктазы (ТР) (КФ 1.8.1.9). Так, в частности, *in vitro* было продемонстрировано ингибирующее действие различных соединений ртути на ТР, при этом хлорид ртути (II) оказывал значительно более выраженное действие по сравнению с метилртутью [102, 103]. Данные наблюдения согласуются с результатами исследования с использованием моноцитов человека [101]. Также было показано, что пероральное введение метилртути мышам приводило к снижению активности ТР в печени и почках, но не в мозге [104]. В то же время нельзя не упомянуть о данных, указывающих на положительной регуляции экспрессии ТР при воздействии ртути на культуру клеток C2C12-DMPK160 [78]. Более того, результаты многочисленных исследований позволили Vranco с соавторами предположить, что ТР является одной из основных мишеней токсического действия соединений ртути *in vivo* [105].

Ртуть и эндоплазматический стресс

Ранее описанная высокая аффинность ртути к сульфгидрильным группам белков может приводить к кумуляции дегенерированных белков, сопровождаемая развитием эндоплазматического стресса (ЭС) [78]. Результаты исследования Sharma с соавторами показали, что ртуть является ингибитором фолдинга белков, причем степень ингибирования находится в прямой взаимосвязи от реакционной способности с тиоловыми, имидазольными и карбоксильными группами [106]. Стоит отметить, что в данном исследовании ртуть обладала более выраженным действием по сравнению с Cd и Pb, являющимися индукторами ЭС [107, 108]. Многочисленные исследования *in vitro* с использованием различных клеточных культур продемонстрировали возможность развития ртуть-индуцированного ЭС. В частности, было показано, что присутствие в инкубационной среде хлорида ртути в концентрациях от 0,1 до 1 мкМ вызывало увеличение уровня мРНК GRP78, а также время- и дозозависимое увеличение уровня GRP78 в клетках [109]. Количественная ПЦР в режиме реального времени выявила более чем двукратную индукцию экспрессии мРНК GRP78 после 9 часов инкубации C2C12-DMPK160 и C2C12-DMPK5 клеток в присутствии ртути, что свидетельствует о развитии эндоплазматического стресса на более поздних стадиях реализации токсичности метилртути [110]. Воздействие хлорида ртути на линию клеток NRK-52E приводило к выраженной активации экспрессии HSP72 [111], который является стресс-индуцибельным белком и критическим регулятором ЭС [112]. В пользу роли ЭС в токсикологии ртути свидетельствует предотвращение токсического действия метилртути на миогенную линию клеток посредством модуляции ЭС с использованием ингибитора эндоплазматической Ca-АТФазы [113]. Воздействие метилртути

на клетки ЦНС крысиных эмбрионов также приводило к достоверному увеличению экспрессии Gadd153 [114, 115], рассматривающихся, наряду с GRP78, в качестве ключевых индикаторов ЭС [112]. Схожие изменения отмечались и в головном мозге крыс, подвергшихся пренатальному воздействию метилртути [115]. Интраперитонеальное введение различных метилртути крысам приводило к достоверному увеличению в коре головного мозга, как уровня белка, так и экспрессии мРНК GRP78 [116, 117], являющегося маркером ЭС [118]. Индукция экспрессии HSP72 и GRP78 также была выявлена в печени крыс Wistar, получающих дихлорид ртути в концентрации 0,1 мг/кг в течение 3 суток [119]. Более того, ряд морфологических исследований с использованием различных линий клеток позволил выявить ртуть-индуцированное расширение шероховатого эндоплазматического ретикулума [120, 121], что также может свидетельствовать о развитии ЭС [122].

Ртуть и воспаление

Многочисленные клинические и экспериментальные исследования продемонстрировали выраженную взаимосвязь между воздействием ртути и развитием воспалительной реакции. Так, обследование шахтеров различного профиля показало, что профессиональное воздействие ртути на организм сопровождалось достоверным повышением уровня провоспалительных цитокинов интерлейкин (ИЛ)-1 β , фактор некроза опухолей- α (ФНО α), и интерферон- γ (ИФ γ) в сыворотке. При этом также было отмечено ртуть-ассоциированное увеличение титров антинуклеарных и антиядрышковых антител [123]. При обследовании бразильцев, подвергшихся воздействию метилртути, установлено, что воздействие металла сопровождается повышенным уровнем антинуклеарных антител (АНА), но не антиядрышковых тел. Также была выявлена достоверная взаимосвязь между уровнем ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-17 и ИФ γ в сыворотке и различными показателями содержания ртути в организме. Стоит при этом отметить, что в субпопуляции, характеризующейся положительным уровнем АНА, воздействие ртути приводило к достоверному снижению уровня данных про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке [124]. При обследовании детей, употребляющих различные количества рыбы, было установлено, что концентрация ртути в сыворотке крови обследуемых коррелировала с уровнем острофазовых реактантов [125]. В то же время, стоит отметить, что при обследовании женщин и детей не было выявлено достоверной взаимосвязи между уровнем цитокинов и ртутью в крови [126].

В исследовании перорального воздействия хлорида ртути на экспрессию цитокинов в органах BALB/c мышей установлена активация экспрессии таких цитокинов как ФНО α , ИЛ-2 и ИФ γ в печени, характеризующаяся признаками дозозависимости. При этом достоверного влияния на уровень ИЛ-1 и ИЛ-4 выявлено не было. Сходные явления отмечались и в почечной ткани. При этом, уровень исследуемых цитокинов в селезенке и тимусе изменялся разнонаправленно, в ряде случаев характеризуюсь снижением [127]. Дальнейшие исследования показали, что воздействие ртути приводит к активации экспрессии ФНО α в печени интактных и подверженных введению

липополисахарида (ЛПС) животных. При этом данный эффект, предположительно, опосредован участием p38 MAPK [128]. Также было установлено, что интраперитонеальное введение HgCl₂ также существенно повышает уровень сывороточного ФНО α у крыс [129]. Пероральное введение хлорида ртути (II) сопровождается повышением уровня ИЛ-1 β в моче мышей, в то время как изменения ФНО α и ИЛ-6 были менее выраженными [130]. В результате подробного исследования Liu также было установлено, что ингаляция паров элементарной ртути крысами повышает интенсивность экспрессии генов ФНО α , ФНО-рецептор-1, ИЛ-2 и ИЛ-7 в легких [131].

Результаты исследований реакции изолированных клеток, полученных от здоровых доноров, на воздействие различных форм ртути согласуются с клинико-эпидемиологическими исследованиями. В частности, периферические человеческие мононуклеары характеризовались достоверным увеличением продукции ИЛ-1 β и ФНО α на фоне снижения выработки противовоспалительных цитокинов в ответ на воздействие хлорида ртути. Продукция ИЛ-4, ИЛ-17 и ИФ γ также увеличивалась в зависимости от воздействующей концентрации ртути [132]. Дальнейшее исследование влияния различных форм ртути на человеческие периферические мононуклеары крови показало, что инкубация клеток в присутствии хлорида ртути (II) сопровождалась дозозависимым увеличением продукции ФНО α . В то же время, HgCl в присутствии ЛПС повышал уровень, таких цитокинов, как ИЛ-1 β , ИЛ-17 и ФНО α . При этом достоверное стимулирующее влияние метилртути в присутствии ЛПС отмечалось только в отношении ИЛ-1 β . Стоит при этом отметить, что воздействие этилртути сопровождалось достоверным снижением уровня ИФ γ , ИЛ-1 β и ФНО α в культуре клеток на фоне воздействия ЛПС [133]. Также было установлено, что воздействие 1–5 мкМ хлорида ртути (II) на периферические мононуклеары приводит к активации продукции ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8, но не ИЛ-10. Более того, повышение действующей концентрации ртути до 10 мкМ сопровождается депрессией продукции указанных цитокинов относительно контрольной группы [134]. В то же время, при исследовании влияния ртути на периферические мононуклеары, полученные от здоровых доноров и стимулированные моноклональными антителами, получены противоположные результаты. Так, в частности, воздействие хлорида ртути (II) приводило к снижению продукции ФНО α , ИЛ-6 и ИФ γ . При этом нельзя не отметить, что в культурах клеток трех доноров отмечалась стимуляция продукции ФНО α и ИЛ-6 в ответ на воздействие ртути. Сходные данные были получены при использовании клеток, стимулированных *S. enterica*, убитых термической обработкой [135]. Также была продемонстрирована стимулирующая роль ртути в отношении секреции ИЛ-4 человеческими мононуклеарами, причем данный эффект сопровождался угнетением продукции ИФ γ . При этом стоит отметить, что метилртуть проявляла более выраженное действие [136, 137].

Наряду с клетками, полученными от доноров, взаимосвязь между ртутью и продукцией цитокинов была продемонстрирована на культурах клеток животных. В частности, показана способность хлорида ртути (II) стимулировать секрецию ИЛ-1 макрофагами, полученными от различных линий мышей [138]. Более того, более поздние

исследования позволили предположить, что ИЛ-1 играет ведущую роль в ртуть-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов [139]. Преинкубация в среде с содержанием ртути культивированных лимфоцитов, полученных как от ртуть-восприимчивых, так и от ртуть-резистентных мышей, приводила к активации пролиферации клеток и стимулированию секреции ИФ γ и ИЛ-2 [140]. Показано, что дихлорид ртути также стимулирует экспрессию гена ИЛ-4 в тучных клетках [141]. При этом стимулирующий эффект ртути на продукцию ИЛ-4 тучными клетками мыши *in vitro* предположительно опосредован действием с-Jun-N-терминальной киназы (JNK) [142]. Результаты данных исследований согласуются с ранее полученными данными, указывающими на ртуть-индуцированную дегрануляцию и секрецию ФНО α и ИЛ-4 тучными клетками [143]. Также были получены данные, свидетельствующие в пользу стимуляции секреции ИЛ-6 и фактора роста эндотелия сосудов тучными клетками [144]. Исследование влияния различных концентраций ртути на ЛПС-стимулированные макрофаги показало, что воздействие металла на интактные клетки стимулировало продукцию ФНО α , а также потенцировало ЛПС-индуцированную экспрессию мРНК ФНО α и ИЛ-6. Данные изменения ассоциировались с дозозависимым снижением продукции NO \cdot , а также экспрессии мРНК индуцибельной NO \cdot -синтазы. Авторы связывают изменения экспрессии провоспалительных цитокинов с наблюдаемой активацией сигнального пути p38 MAPK [145]. Более того, была продемонстрирована способность ртути к активации NF-kB [146], который является одним из ключевых регуляторов воспалительного ответа [147]. В то же время, имеются указания на тормозящий эффект ртути в отношении продукции ФНО α и ИЛ-1 в культивированных кератиноцитах [148].

Таким образом, результаты многочисленных исследований продемонстрировали выраженное влияние ртути на развитие окислительного и эндоплазматического стресса, а также развитие воспалительной реакции. Стоит отметить, что все вышеперечисленные процессы тесно взаимосвязаны в ходе реализации токсического действия ртути. Воздействие на данные механизмы может служить эффективным средством лечения хронической и острой интоксикации ртутью наряду с хелатированием металла.

Список литературы

1. Bender M., Lymberidi-Settimo E., Groth E. New mercury treaty exposes health risks. *J Public Health Policy* 2014; 35(1): 1-13.
2. Tchounwou P.B., Ayensu W.K., Ninashevili N., Sutton D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ Toxicol* 2003; 18(3): 149-75.
3. Lamborg C.H., Hammerschmidt C.R., Bowman K.L., Swarr G.J., Munson K.M., Ohnemus D.C., Saito M.A. A global ocean inventory of anthropogenic mercury based on water column measurements. *Nature* 2014; 512(7512): 65-68.
4. Syversen T., Kaur P. The toxicology of mercury and its compounds. *J Trace Elem Med Biol.* 2012; 26(4): 215-26.
5. Haley B.E. Mercury toxicity: genetic susceptibility and synergistic effects. *Medical Veritas* 2005; 2(2): 535-42.
6. Clarkon T.W., Magos L., Myers G.J. The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* 2003; 349(18): 1731-7.
7. Monnet-Tschudi F., Zurich M.G., Boschat C., Corbaz A., Honnegger P. Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. *Rev Environ Health* 2006; 21(2): 105-17.

8. Carocci A., Rovito N., Sinicropi M.S., Genchi G. Mercury toxicity and neurodegenerative effects. *Rev Environ Contam. Toxicol* 2014; 229: 1-18.
9. Farina M., Avila D.S., da Rocha J.B., Aschner M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem Int* 2013; 62(5): 575-94.
10. Bartova J., Prochazkova J., Kratka Z., Benetkova K., Venclikova Z., Sterzl I. Dental amalgam as one of the risk factors in autoimmune diseases. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24(1-2): 65-7.
11. Havarinasab S., Bjorn E., Nielsen J.B., Hultman P. Mercury species in lymphoid and non-lymphoid tissues after exposure to methyl mercury: correlation with autoimmune parameters during and after treatment in susceptible mice. *Toxicol Appl Pharmacol*; 2007 221(1): 21-8.
12. Nyland J.F., Fairweather D., Shirley D.L., Davis S.E., Rose N.R., Silbergeld E.K. Low-dose inorganic mercury increases severity and frequency of chronic coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis in mice. *Toxicol Sci* 2012; 125(1): 134-43.
13. Virtanen J.K., Rissanen T.H., Voutilainen S., Tuomainen T.P. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem* 2007; 18(2): 75-85.
14. Li S.J., Zhang S.H., Chen H.P., Zeng C.H., Zheng C.X., Li L.S., Liu Z.H. Mercury-induced membranous nephropathy: clinical and pathological features. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5(3): 439-44.
15. Kobal A.B., Flisar Z., Miklavcic V., Dizdarevic T., Sesek-Brisiki A. Renal function in miners intermittently exposed to elemental mercury vapour. *Arh Hig Rada Toksikol* 2000; 51(4): 369-80.
16. Fowler B.A., Whittaker M.H., Elinder C.G. Mercury-induced renal effects. In: De Broe M.E., Porter G.A., Bennett W.M., Deray G. (eds) *Clinical Nephrotoxins*, 3rd edn. Springer, New York, 2008, pp. 811-826.
17. Park J.D., Zheng W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. *Journal of Preventive Medicine and Public Health* 2012; 45(6): 344.
18. Cotton F.A., Wilkinson G., Murillo C.A., Bochmann M. *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th edition. Wiley-Interscience, 1999. — 1376.
19. Greenwood N.N., Earnshaw A. *Chemistry of the Elements*. Elsevier, 1997, 1600 pp.
20. Eliav E., Kaldor U., Ishikawa Y. Transition energies of mercury and ekamercury (element 112) by the relativistic coupled-cluster method. *Physical Review A* 1995; 52(4): 2765-2769.
21. Kunkely H., Vogler A. Photoluminescence of tetranuclear mercury (II) complexes. *Chemical physics letters* 1989; 164 (6): 621-624.
22. Gillespie R.J., Granger P., Morgan K.R., Schrobilgen G.J. Mercury-199 NMR study of the mercury cations (Hg $^{2+}$, Hg $^{22+}$, Hg $^{32+}$, and Hg $^{42+}$): the first example of mercury-mercury spin-spin coupling. *Inorganic Chemistry* 1984; 23(7): 887-891.
23. Risher J.F., Murray H.E., Prince G.R. Organic mercury compounds: human exposure and its relevance to public health. *Toxicol Ind Health* 2002; 18(3): 109-60.
24. Ravichandran M. Interactions between mercury and dissolved organic matter—a review. *Chemosphere*. 2004. 55(3): 319-331.
25. Grdenic D. The structural chemistry of mercury. *Quarterly Reviews, Chemical Society* 1965; 19(3): 303-328.
26. Pearson R.G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. *Journal of Chemical Education* 1968; 45(9): 581.
27. Ghosh R., Jana A.D., Pal S., Mostafa G., Fun H.K., Ghosh B.K. Crystal engineering through [Hg(SCN) $_4$] $^{2-}$ templates: SS interaction mediated 3-D parallel interpenetration in the self-assembled superstructure of [Hg(SCN) $_4$] $^{2-}$ and protonated 2, 2'-dipyridylamine. *Cryst Eng Comm* 2007; 9(5): 353-357.
28. Van der Linden W.E., Beers C. Determination of the composition and the stability constants of complexes of mercury (II) with amino acids. *Anal Chim Acta* 1974; 68(1): 143-54.
29. Oram P.D., Fang X., Fernando Q., Letkeman P., Letkeman D. The formation of constants of mercury (II)-glutathione complexes. *Chem Res Toxicol* 1996; 9(4): 709-12.
30. Mah V., Jalilehvand F. Glutathione complex formation with mercury (II) in aqueous solution at physiological pH. *Chem Res Toxicol* 2010; 23(11): 1815-23.
31. Gradinaru R., Ionas A., Pui A., Zbancioc G., Drochioiu G. Interaction of inorganic mercury with CoA-SH and acyl-CoAs. *Bio-metals* 2011; 24(6): 1115-21.

32. Keizo W., Yasuo N. Toxic effects of several mercury compounds on SH and non-SH enzymes. *Toxicology Letters* 1979; 4(1): 49-55.
33. Bagger S., Breddam K., Byberg B.R. Binding of mercury(II) to protein thiol groups: a study of proteinase K and carboxypeptidase Y. *J Inorg Biochem* 1991; 42(2): 97-103.
34. Bramanti E., D'Ulivo A., Lampugnani L., Zamboni R., Raspi G. Application of mercury cold vapor atomic fluorescence spectrometry to the characterization of mercury-accessible -SH groups in native proteins. *Anal Biochem* 1999; 274(2): 163-73.
35. Chen C., Qu L., Li B., Xing L., Jia G., Wang T., Gao Y., Zhang P., Li M., Chen W., Chai Z. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin Chem* 2005; 51(4): 759-67.
36. Al-azzawie H.F., Umran A., Hyader N.H. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in a mercury exposure workers. *British J of Pharmacol and Toxicol* 2013; 4(3): 80-88.
37. Grotto D., Valentini J., Fillion M., Passos C.J., Garcia S.C., Mergler D., Barbosa F.Jr. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ* 2010; 408(4): 806-11.
38. Kopal A.B., Horvat M., Prezelj M., Briski A.S., Krsnik M., Dizdarevic T., Mazej D., Falnoga I., Stibilj V., Arneric N., Kopal D., Osredkar J. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol* 2004; 17(4): 261-74.
39. Al-Saleh I., Abduljabbar M., Al-Rouqi R., Elkhatib R., Alshabbaheen A., Shinwari N. Mercury (Hg) exposure in breast-fed infants and their mothers and the evidence of oxidative stress. *Biol Trace Elem Res* 2013; 153(1-3): 145-54.
40. Pollack A.Z., Schisterman E.F., Goldman L.R., Mumford S.L., Perkins N.J., Bloom M.S., Rudra C.B., Browne R.W., Wactawski-Wende J. Relation of blood cadmium, lead, and mercury levels to biomarkers of lipid peroxidation in premenopausal women. *Am J Epidemiol* 2012; 175(7): 645-52.
41. Zahir F., Rizvi S.J., Haq S.K., Khan R.H. Effect of methyl mercury induced free radical stress on nucleic acids and protein: Implications on cognitive and motor functions. *Indian J Clin Biochem* 2006; 21(2): 149-52.
42. Shinada M., Muto H., Okamura Y., Takizawa Y. Induction of phospholipid peroxidation and its characteristics by methylmercury chloride and mercuric chloride in rat kidney. *Chemosphere* 1990; 21(1): 57-67.
43. Yonaha M., Saito M., Sagai M. Stimulation of lipid peroxidation by methyl mercury in rats. *Life Sci* 1983; 32(13): 1507-14.
44. Lin T.H., Huang Y.L., Huang S.F. Lipid peroxidation in liver of rats administered with methyl mercuric chloride. *Biol Trace Elem Res* 1996; 54(1): 33-41.
45. Huang Y.L., Cheng S.L., Lin T.H. Lipid peroxidation in rats administered with mercuric chloride. *Biol Trace Elem Res* 1996; 52(2): 193-206.
46. Mahboob M., Shireen K.F., Atkinson A., Khan A.T. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B* 2001; 36(5): 687-97.
47. Farina M., Soares F.A., Zeni G., Souza D.O., Rocha J.B. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. *Toxicol Lett* 2004; 146(3): 227-35.
48. Hijova E., Nistiar F., Sipulova A. Changes in ascorbic acid and malondialdehyde in rats after exposure to mercury. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106(8-9): 248-51.
49. Chen C., Qu L., Zhao J., Liu S., Deng G., Li B., Zhang P., Chai Z. Accumulation of mercury, selenium and their binding proteins in porcine kidney and liver from mercury-exposed areas with the investigation of their redox responses. *Sci Total Environ* 2006; 366(2-3): 627-37.
50. Watanabe C., Kasanuma Y., Dejima Y., Satoh H. The effect of prenatal methylmercury exposure on the GSH level and lipid peroxidation in the fetal brain and placenta of mice. *The Tohoku journal of experimental medicine* 1999; 187(2): 121-126.
51. Yin Z., Milatovic D., Aschner J.L., Syversen T., Rocha J.B., Souza D.O., Sidoryk M., Albrecht J., Aschner M. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res* 2007; 1131(1): 1-10.
52. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82(2): 291-5.
53. Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12(10): 1161-208
54. Sarafian T.A., Vartavarian L., Kane D.J., Bredesen D.E., Verity M.A. bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free-radical generation and cell killing in a neural cell line. *Toxicol Lett* 1994; 74(2): 149-55.
55. Ni M., Li X., Yin Z., Jiang H., Sidoryk-Wegrzynowicz M., Milatovic D., Cai J., Aschner M. Methylmercury induces acute oxidative stress, altering Nrf2 protein level in primary microglial cells. *Toxicol Sci* 2010; 116(2): 590-603.
56. Shanker G., Aschner J.L., Syversen T., Aschner M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 128(1): 48-57.
57. Ariza M.E., Bijur G.N., Williams M.V. Lead and mercury mutagenesis: role of H₂O₂, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31(4): 352-61.
58. Porras A.G., Olson J.S., Palmer G. The reaction of reduced xanthine oxidase with oxygen. Kinetics of peroxide and superoxide formation. *J Biol Chem* 1981; 256(17): 9006-103.
59. Aguado A., Galan M., Zhenyukh O., Wiggers G.A., Roque F.R., Redondo S., Pecanha F., Martin A., Fortuno A., Cachafeiro V., Tejerina T., Salices M., Briones A.M. Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268(2): 188-200.
60. Rizzetti D.A., Torres J.G., Escobar A.G., Pecanha F.M., Santos F.W., Puntel R.L., Alonso M.J., Briones A.M., Salices M., Vassallo D.V., Wiggers G.A. Apocynin prevents vascular effects caused by chronic exposure to low concentrations of mercury. *PLoS One*. 2013; 8(2): e55806.
61. Hoffman M., Autor A.P. Production of superoxide anion by an NADPH-oxidase from rat pulmonary macrophages. *FEBS Lett* 1980; 121(2): 352-4.
62. Lund B.O., Miller D.M., Woods J.S. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid peroxidation *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1991; 42 Suppl: S181-7.
63. Lison D., Dubois P., Lauwerys R. In vitro effect of mercury and vanadium on superoxide anion production and plasminogen activator activity of mouse peritoneal macrophages. *Toxicol Lett* 1988; 40(1): 29-36.
64. Miller D.M., Woods J.S. Redox activities of mercury-thiol complexes: implications for mercury-induced porphyria and toxicity. *Chem Biol Interact* 1993; 88(1): 23-35.
65. Aliaga M.E., Lopez-Alarcon C., Barriga G., Olea-Azar C., Speisky H. Redox-active complexes formed during the interaction between glutathione and mercury and/or copper ions. *J Inorg Biochem* 2010; 104(10): 1084-90.
66. Ribarov S.R., Benov L.C., Marcova V.I., Benchev I.C. Hemoglobin-catalyzed lipid peroxidation in the presence of mercuric chloride. *Chem Biol Interact* 1983; 45(1): 105-12.
67. Milaeva E., Petrosyan V., Berberova N., Pimenov Y., Pellerito L. Organic derivatives of mercury and tin as promoters of membrane lipid peroxidation. *Bioinorg Chem Appl* 2004; 2(1-2): 69-91.
68. Lee Y.W., Ha M.S., Kim Y.K. Role of reactive oxygen species and glutathione in inorganic mercury-induced injury in human glioma cells. *Neurochem Res* 2001; 26(11): 1187-93.
69. James S.J., Slikker W.3rd, Melnyk S., New E., Pogribna M., Jernigan S. Thimerosal neurotoxicity is associated with glutathione depletion: protection with glutathione precursors. *Neurotoxicology* 2005; 26(1): 1-8.
70. Chang J.Y., Tsai P.F. Prevention of methylmercury-induced mitochondrial depolarization, glutathione depletion and cell death by 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J(2). *Neurotoxicology* 2008; 29(6): 1054-61.
71. Stringari J., Nunes A.K., Franco J.L., Bohrer D., Garcia S.C., Dafre A.L., Milatovic D., Souza D.O., Rocha J.B., Aschner M., Farina M. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 227(1): 147-54.
72. Sin W.C., Wong M.K., Sin Y.M. Changes in tissue glutathione and mercury concentrations in rats following mercuric chloride injection through the hepatic portal vein. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989; 42(6): 942-8.
73. Woods J.S., Ellis M.E. Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury. Relationship to mercury-induced oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(10): 1719-24.

74. Kobal A.B., Prezelj M., Horvat M., Krsnik M., Gibicar D., Osredkar J. Glutathione level after long-term occupational elemental mercury exposure. *Environ Res* 2008; 107(1): 115-23.
75. Hirota Y., Yamaguchi S., Shimojoh N., Sano K.I. Inhibitory effect of methylmercury on the activity of glutathione peroxidase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 53(1): 174-6.
76. Franco J.L., Posser T., Dunkley P.R., Dickson P.W., Matos J.J., Martins R., Bairy A.C., Marques M.R., Dafre A.L., Farina M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(4): 449-57.
77. Farina M., Campos F., Vendrell I., Berenguer J., Barzi M., Pons S., Sunol C. Probenecid increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci* 2009; 112(2): 416-26.
78. Usuki F., Yamashita A., Fujimura M. Post-transcriptional defects of antioxidant selenoenzymes cause oxidative stress under methylmercury exposure. *J Biol Chem* 2011; 286(8): 6641-9.
79. Black R.S., Whanger P.D., Tripp M.J. Influence of silver, mercury, lead, cadmium, and selenium on glutathione peroxidase and transferase activities in rats. *Biol Trace Elem Res* 1979; 1(4): 313-24.
80. Wada O., Yamaguchi N., Ono T., Nagahashi M., Morimura T. Inhibitory effect of mercury on kidney glutathione peroxidase and its prevention by selenium. *Environmental Research* 1976; 12(1): 75-80.
81. Chen C., Yu H., Zhao J., Li B., Qu L., Liu S., Zhang P., Chai Z. The roles of serum selenium and selenoproteins on mercury toxicity in environmental and occupational exposure. *Environ Health Perspect* 2006; 114(2): 297-301.
82. Cuello S., Goya L., Madrid Y., Campuzano S., Pedrero M., Bravo L., Camara C., Ramos S. Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(5): 1405-11.
83. Mykkanen H.M., Ganther H.E. Effect of mercury on erythrocyte glutathione reductase activity. In vivo and *in vitro* studies. *Bull Environ Contam Toxicol* 1974; 12(1): 10-6.
84. Zabinski Z., Dabrowski Z., Moszczynski P., Rutowski J. The activity of erythrocyte enzymes and basic indices of peripheral blood erythrocytes from workers chronically exposed to mercury vapours. *Toxicol Ind Health* 2000; 16(2): 58-64.
85. Benov L.C., Benchev I.C., Monovich O.H. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chem Biol Interact* 1990; 76(3): 321-32.
86. Garcia-Sevillano M.A., Garcia-Barrera T., Navarro F., Gomez-Ariza J.L. Absolute quantification of superoxide dismutase in cytosol and mitochondria of mice hepatic cells exposed to mercury by a novel metallomic approach. *Analytica Chimica Acta* 2014; 842: 42-50.
87. Kumagai Y., Homma-Takeda S., Shinyashiki M., Shimojo N. Alterations in superoxide dismutase isozymes by methylmercury. *Applied organometallic chemistry* 1997; 11(8): 635-643.
88. Kumagai Y., Nagafune J., Mizukado S., Shinyashiki M., Shimojo N. 3C-03 Alterations in Gene Expression, Protein Content and Enzyme Activity of Mouse Kidney Mn-SOD by Inorganic Mercury. *Journal of toxicological sciences* 1997; 22(4): 372.
89. Shimojo N., Kumagai Y., Homma-Takeda S., Shinyashiki M., Takasawa N., Kushida K. Isozyme selective induction of mouse pulmonary superoxide dismutase by the exposure to mercury vapor. *Environ Toxicol Pharmacol* 1996; 2(1): 35-7.
90. Bando I., Reus M.I., Andres D., Cascales M. Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. *J Biochem Mol Toxicol* 2005; 19(3): 154-61.
91. Abdel-Hamid H.A., Fahmy F.C., Sharaf I.A. Influence of free radicals on cardiovascular risk due to occupational exposure to mercury. *The Journal of the Egyptian Public Health Association* 2001; 76(1-2): 53-69.
92. Perrin-Nadif R., Dusch M., Koch C., Schmitt P., Mur J.M. Catalase and superoxide dismutase activities as biomarkers of oxidative stress in workers exposed to mercury vapors. *J Toxicol Environ Health* 1996; 48(2): 107-19.
93. Sorg O., Schilter B., Honegger P., Monnet-Tschudi F. Increased vulnerability of neurones and glial cells to low concentrations of methylmercury in a prooxidant situation. *Acta Neuropathol* 1998; 96(6): 621-7.
94. De Freitas A.S., Funck V.R., Rotta Mdos S., Bohrer D., Morschbacher V., Puntel R.L., Nogueira C.W., Farina M., Aschner M., Rocha J.B. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull* 2009; 79(1): 77-84.
95. Yasutake A., Nakano A., Miyamoto K., Eto K. Chronic effects of methylmercury in rats. I. Biochemical aspects. *Tohoku J Exp Med* 1997; 182(3): 185-96.
96. Barcelos G.R., Grotto D., Serpeloni J.M., Angeli J.P., Rocha B.A., de Oliveira Souza V.C., Vicentini J.T., Emanuelli T., Bastos J.K., Antunes L.M., Knasmuller S., Barbosa F.Jr. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. *Arch Toxicol* 2011; 85(9): 1151-7.
97. Pinheiro M.C., Macchi B.M., Vieira J.L., Oikawa T., Amoras W.W., Guimaraes G.A., Costa C.A., Crespo-Lopez M.E., Herculano A.M., Silveira L.C., do Nascimento J.L. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. *Environ Res* 2008; 107(1): 53-9.
98. Queiroz M.L., Pena S.C., Salles T.S., de Capitani E.M., Saad S.T. Abnormal antioxidant system in erythrocytes of mercury-exposed workers. *Hum Exp Toxicol* 1998; 17(4): 225-30.
99. Holmgren A., Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396(1): 120-4.
100. Hansen J.M., Zhang H., Jones D.P. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(1): 138-45.
101. Wataha J.C., Lewis J.B., McCloud V.V., Shaw M., Omata Y., Lockwood P.E., Messer R.L., Hansen J.M. Effect of mercury(II) on Nrf2, thioredoxin reductase-1 and thioredoxin-1 in human monocytes. *Dent Mater* 2008; 24(6): 765-72.
102. Carvalho C.M., Chew E.H., Hashemy S.I., Lu J., Holmgren A. Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. *J Biol Chem* 2008; 283(18): 11913-23.
103. Carvalho C.M., Lu J., Zhang X., Arner E.S., Holmgren A. Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J* 2011; 25(1): 370-81.
104. Wagner C., Sudati J.H., Nogueira C.W., Rocha J.B. In vivo and *in vitro* inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. *Biometals* 2010; 23(6): 1171-7.
105. Branco V., Canario J., Lu J., Holmgren A., Carvalho C. Mercury and selenium interaction *in vivo*: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(4): 781-93.
106. Sharma S.K., Goloubinoff P., Christen P. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(2): 341-5.
107. Kitamura M., Hiramatsu N. The oxidative stress: endoplasmic reticulum stress axis in cadmium toxicity. *Biometals* 2010; 23(5): 941-50.
108. Qian Y., Tiffany-Castiglioni E. Lead-induced endoplasmic reticulum (ER) stress responses in the nervous system. *Neurochem Res* 2003; 28(1): 153-62.
109. Qian Y., Falahatpisheh M.H., Zheng Y., Ramos K.S., Tiffany-Castiglioni E. Induction of 78 kD glucose-regulated protein (GRP78) expression and redox-regulated transcription factor activity by lead and mercury in C6 rat glioma cells. *Neurotox Res* 2001; 3(6): 581-9.
110. Usuki F., Fujita E., Sasagawa N. Methylmercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. *Neurotoxicology* 2008; 29(1): 22-30.
111. Stacchiotti A., Li Volti G., Lavazza A., Rezzani R., Rodela L.F. Schisandrin B stimulates a cytoprotective response in rat liver exposed to mercuric chloride. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(11): 2834-40.
112. Liu H., Qian J., Wang F., Sun X., Xu X., Xu W., Zhang X., Zhang X. Expression of two endoplasmic reticulum stress markers, GRP78 and GADD153, in rat retinal detachment model and its implication. *Eye (Lond)* 2010; 24(1): 137-44.
113. Usuki F., Fujimura M., Yamashita A. Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. *Sci Rep* 2013; 3: 2346.
114. Ou Y.C., Thompson S.A., Kirchner S.C., Kavanagh T.J., Faustman E.M. Induction of growth arrest and DNA damage-inducible genes Gadd45 and Gadd153 in primary rodent embryonic cells following exposure to methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 147(1): 31-8.
115. Faustman E.M., Ponce R.A., Ou Y.C., Mendoza M.A., Lewandowski T., Kavanagh T. Investigations of methylmercury-induced

alterations in neurogenesis. *Environ Health Perspect* 2002; 110(5): 859-64.

116. Zhang Y., Jiang X., Zhao X., Qian H., Wang S., Xing G., Wang S., Lu R. Time-course effect and region-specificity of endoplasmic reticulum stress in rat brains acutely exposed by methylmercury. *Wei Sheng Yan Jiu* 2010; 39(3): 271-4 [Article in Chinese].

117. Zhang Y., Lu R., Liu W., Wu Y., Qian H., Zhao X., Wang S., Xing G., Yu F., Aschner M. Hormetic effects of acute methylmercury exposure on grp78 expression in rat brain cortex. *Dose Response* 2013; 11(1): 109-20.

118. Lee A.S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005; 35(4): 373-81.

119. Stacchiotti A.I., Morandini F., Bettoni F., Schena I., Lavazza A., Grigolato P.G., Apostoli P., Rezzani R., Aleo M.F. Stress proteins and oxidative damage in a renal derived cell line exposed to inorganic mercury and lead. *Toxicology*. 2009 Oct 29;264(3):215-24. doi: 10.1016/j.tox.2009.08.014. Epub 2009 Aug 29.

120. Goering P.L., Thomas D., Rojko J.L., Lucas A.D. Mercuric chloride-induced apoptosis is dependent on protein synthesis. *Toxicol Lett* 1999; 105(3): 183-95.

121. Carranza-Rosales P., Said-Fernandez S., Sepulveda-Saavedra J., Cruz-Vega D.E., Gandolfi A.J. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology* 2005; Jun 1;210(2-3): 111-21

122. He X., Liang M. Shortening of Mitochondria and Dilation of Endoplasmic Reticulum in the Medullary Thick Ascending Limb of Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertension* 2013; 62(3) — A479

123. Gardner R.M., Nyland J.F., Silva I.A., Ventura A.M., de Souza J.M., Silbergeld E.K. Mercury exposure, serum antinuclear/antinucleolar antibodies, and serum cytokine levels in mining populations in Amazonian Brazil: a cross-sectional study. *Environ Res* 2010; 110(4): 345-54.

124. Nyland J.F., Fillion M., Barbosa F.Jr., Shirley D.L., Chine C., Lemire M., Mergler D., Silbergeld E.K. Biomarkers of methylmercury exposure immunotoxicity among fish consumers in Amazonian Brazil. *Environ Health Perspect* 2011; 119(12): 1733-8.

125. Gump B.B., MacKenzie J.A., Dumas A.K., Palmer C.D., Parsons P.J., Segu Z.M., Mechref Y.S., Bendinskas K.G. Fish consumption, low-level mercury, lipids, and inflammatory markers in children. *Environ Res* 2012; 112: 204-11.

126. Nyland J.F., Wang S.B., Shirley D.L., Santos E.O., Ventura A.M., de Souza J.M., Silbergeld E.K. Fetal and maternal immune responses to methylmercury exposure: a cross-sectional study. *Environ Res* 2011; 111(4): 584-9.

127. Kim S.H., Johnson V.J., Sharma R.P. Oral exposure to inorganic mercury alters T lymphocyte phenotypes and cytokine expression in BALB/c mice. *Arch Toxicol* 2003; 77(11): 613-20.

128. Kim S.H., Sharma R.P. Mercury alters endotoxin-induced inflammatory cytokine expression in liver: differential roles of p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2005; 27(1): 123-35.

129. Tunali-Akbay T., Sener G., Salvarli H., Sehirli O., Yarat A. Protective effects of Ginkgo biloba extract against mercury(II)-induced cardiovascular oxidative damage in rats. *Phytother Res* 2007; 21(1): 26-31.

130. Rumbeiha W.K., Fitzgerald S.D., Vrable R.A. P3B72-Pro-inflammatory cytokine pattern in urine and serum of mice given a sub-nephrotoxic dose of mercuric chloride. *Toxicology Letters* 1998; 95: 169-170.

131. Liu J., Lei D., Waalkes M.P., Beliles R.P., Morgan D.L. Genomic analysis of the rat lung following elemental mercury vapor exposure. *Toxicol Sci* 2003; 74(1): 174-81.

132. Gardner R.M., Nyland J.F., Evans S.L., Wang S.B., Doyle K.M., Crainiceanu C.M., Silbergeld E.K. Mercury induces an unopposed inflammatory response in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Environ Health Perspect* 2009; 117(12): 1932-8.

133. Gardner R.M., Nyland J.F., Silbergeld E.K. Differential immunotoxic effects of inorganic and organic mercury species *in vitro*. *Toxicol Lett* 2010; 198(2): 182-90.

134. Villanueva M.B.G., Koizumi S., Jonai H. Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells after exposure to heavy metals. *Journal of health science* 2000; 46(5): 358-362.

135. Hemdan N.Y., Lehmann I., Wichmann G., Lehmann J., Emmrich F., Sack U. Immunomodulation by mercuric chloride *in vitro*: application of different cell activation pathways. *Clin Exp Immunol* 2007; 148(2): 325-37.

136. De Vos G., Jerschow E., Liao Z., Rosenstreich D. Effects of fluoride and mercury on human cytokine response *in vitro*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 113(2): S66.

137. De Vos G., Abotaga S., Liao Z., Jerschow E., Rosenstreich D. Selective effect of mercury on Th2-type cytokine production in humans. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2007; 29(3-4): 537-48.

138. Zdzolek J.M., Soder O., Hultman P. Mercury induces *in vivo* and *in vitro* secretion of interleukin-1 in mice. *Immunopharmacology* 1994; 28(3): 201-8.

139. Pollard K.M., Landberg G.P. The *in vitro* proliferation of murine lymphocytes to mercuric chloride is restricted to mature T cells and is interleukin 1 dependent. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(3): 581-93.

140. Hu H., Abedi-Valugerdi M., Moller G. Pretreatment of lymphocytes with mercury *in vitro* induces a response in T cells from genetically determined low-responders and a shift of the interleukin profile. *Immunology* 1997; 90(2): 198-204.

141. Wu Z., Turner D.R., Oliveira D.B. IL-4 gene expression up-regulated by mercury in rat mast cells: a role of oxidant stress in IL-4 transcription. *Int Immunol* 2001; 13(3): 297-304.

142. Walczak-Drzewiecka A., Wyczolkowska J., Dastych J. c-Jun N-terminal kinase is involved in mercuric ions-mediated interleukin-4 secretion in mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136(2): 181-90.

143. Dastych J., Walczak-Drzewiecka A., Wyczolkowska J., Metcalfe D.D. Murine mast cells exposed to mercuric chloride release granule-associated N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and secrete IL-4 and TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(6): 1108-14.

144. Kempuraj D., Asadi S., Zhang B., Manola A., Hogan J., Peterson E., Theoharides T.C. Mercury induces inflammatory mediator release from human mast cells. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 20.

145. Kim S.H., Johnson V.J., Sharma R.P. Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. *Nitric Oxide* 2002; 7(1): 67-74.

146. Park H.J., Youn H.S. Mercury induces the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Toxicol Ind Health* 2013; 29(2): 169-74.

147. Baldwin A.S.Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-83.

148. Zefferino R., Piccaluga S., Lasalvia M., D' Andrea G., Margaglione M., Ambrosi L. Role of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in promoter effect induced by mercury in human keratinocytes. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19(4): 15-20.

Received

Universal mechanisms of mercury toxicity

Tinkov A.A.^{1,2}, Ajsuvakova O.P.³, Skalnaya M.G.⁴, Popova E.V.¹, Sinitskiy A.I.⁵, Nemereshina O.N.¹, Gatiatulina E.R.¹, Skalny A.V.^{2,4}, Nikonorov A.A.¹

¹ — Department of Biochemistry, Orenburg State Medical Academy, Russia, Orenburg, 460000, Sovetskaya St., 6

² — Laboratory of biotechnology and applied bioelementology, Yaroslavl State University, Russia, Yaroslavl, 150000, Sovetskaya st., 14

³ — Department of Chemistry and Methods of Chemistry Teaching, Orenburg State Pedagogical University, Russia, Orenburg, 460014, Sovetskaya st., 19

⁴ — Autonomous non-commercial organization «Centre for Biotic Medicine», Russia, Moscow 105064, Zemlyanoy Val St. 46

⁵ – Department of chemistry of the pharmaceutical faculty, South Ural State Medical University, Russia, Chelyabinsk, 453092, Vorovskogo st., 64

Mercury is the one of the most toxic inorganic pollutants. Despite the presence of multiple pathologic states associated with mercury exposure, their pathogenesis involves universal mechanisms of mercury toxicity. The existing scholarly data indicate a significant role of oxidative and endoplasmic reticulum stress and inflammation in mercury toxicity. The present review summarizes current data on prooxidant effect of mercury, its influence on certain enzymatic and non-enzymatic antioxidants. The development of endoplasmic reticulum stress and inflammation in response to mercury exposure is also reviewed. The existing data indicate a significant therapeutic potential of modulation of these processes in treatment of mercury intoxication

Key words: mercury, oxidative stress, inflammation, endoplasmic reticulum stress

Сравнительный анализ воздействия р199 на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов человека

Кожина К.В.^{1,2}, Сабурова И.Н.¹, Горкун А.А.¹, Зурина И.М.¹,
Кошелева Н.В.^{1,3}, Волкова Е.Н.², Морозов С.Г.¹

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», РФ, 1253158, Москва, Балтийская ул., д.8

² — ООО «Центр восстановительной медицины», РФ, 123098, Москва, ул. Маршала Василевского, д.11, к1

³ — Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, РФ, 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12

E-mail: stgork@gmail.com

Сегодня биотехнологии открывают путь к применению широкого спектра эффективных и инновационных косметических активных веществ. Современное развитие клеточных технологий теоретически позволяет полностью заменить животные модели для анализа и развития косметических препаратов на культуры клеток, которые являются высокочувствительными к токсическому эффекту, простыми в применении и предпочтительными с точки зрения биоэтики. Монослойная культура дермальных фибробластов является широко распространенной модельной системой в области тестирования и разработки косметических препаратов. Но сфероиды, полученные из дермальных фибробластов, могут стать моделью, более соответствующей нативной тканевой организации при сохранении высокой пропускной способности к анализу. В данном исследовании сравнивали дозозависимый эффект пептида р199 на экспрессию коллагенов I, III и IV типов, а также фибронектина как в 2D, так и в 3D культуре дермальных фибробластов человека. Использование трехмерной модели позволило не только оценить изменения в уровне экспрессии белков внеклеточного матрикса, но и их структуру при синтезе во внеклеточное пространство.

Ключевые слова: тестирование косметических препаратов, культура клеток, фибробласты, сфероиды, коллаген, фибронектин

Введение

Сегодня биотехнологии открывают путь к применению широкого спектра эффективных и инновационных косметических активных веществ. Современное развитие клеточных технологий теоретически позволяет полностью заменить животные модели для анализа и развития косметических препаратов на культуры клеток, которые являются высокочувствительными к токсическому эффекту, простыми в применении и предпочтительными с точки зрения биоэтики. Производители косметики обязаны предоставлять потребителю следующую информацию:

- 1) оценка безопасности продукта для здоровья человека;
- 2) существующие данные о нежелательных последствиях для здоровья человека в результате использования продукта;
- 3) доказательства эффективности, заявленной для косметического продукта.

Именно на эти критерии опираются исследователи при подборе экспериментальных тестов, которые могут выявить и классифицировать биологическую косметическую активность.

Органотипические культуры, реконструированные из диссоциированных клеток, были впервые разработаны в 1980-х годах. Наиболее хорошо охарактеризованной такой культурой является эквивалент кожи, разработанный в 1980 г. и используемый и в настоящее время [15]. Эквиваленты кожи, состоящие из фибробластов внутри коллагена и кератиноцитов на его поверхности, были успешно трансплантированы донорам клеток для замены поврежденной кожи. С 1990-х годов используются для изучения антиоксидантной защиты против фотостарения, метаболизма лекарственных препаратов, процессов дифференцирования, генной терапии и иммунной системы [2]. Од-

нако создание и поддержание *in vitro* эквивалентов тканей представляет собой дорогой и трудоемкий процесс [12]. Тогда как предпочтительно, чтобы модель, используемая для скринингового анализа, давала быстрый результат при применении относительно простых и недорогих аналитических методов [8].

Основные подходы к скрининговому анализу, основанному на культурах клеток [17]:

1. Исследование вторичных мессенджеров — мониторинг передачи сигнала после активации поверхностных клеточных рецепторов;
2. Анализ репортерных генов — изучение клеточного ответа на уровне транскрипции и трансляции;
3. Анализ клеточной пролиферации и цитотоксичности — контроль пролиферации и гибели клеток в ответ на внешние сигналы и стресс.

В основном в исследованиях используют иммортализованные клеточные линии, первичные культуры клеток и линии раковых клеток. Иммортализованные и раковые линии имеют ограничения в анализе в результате содержащихся мутаций, которые могут исказить полученные результаты. Первичные культуры обеспечивают репрезентативный клеточный ответ, однако имеют ограниченное время жизни, сложны в культивировании и трансфекции. Революцию в анализе лекарственных препаратов совершили недавние исследования с применением стволовых клеток: раковых стволовых клеток, мезенхимных стромальных клеток, эмбриональных стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных клеток. Применение подобных клеток помогло комбинировать адекватный ответ и простоту культивирования — ключевые параметры для применения метода в фармакологическом скрининге [17].

Монослойные культуры позволяют быстро и легко получить результат, однако они не отражают реального микроокружения клеток, взаимодействий клетка-клетка и клетка-матрикс, вследствие чего полученные результаты могут не соответствовать нормальной физиологии ткани. Но именно монослойные культуры являются более эффективными в отношении исследования цитотоксичности и, например, антимикобактериальной активности препарата [16].

3D культуры могут лучше воспроизвести клеточные ответы на медикаментозное лечение и имеют потенциал, чтобы стать превосходной платформой для нового развития лекарственных средств. Тем не менее, 3D культуры создают неоднородную среду, в которой трудно контролировать изменения в клетках и их деятельности, используя обычные методы анализа, применяемые для 2D культур. Таким образом, существует большая потребность в создании новых методов *in vitro* анализа на 3D культурах, которые могут стать «мостом» между 2D монослойными культурами клеток и животными моделями. В настоящее время ряд исследователей эффективно использует сфероиды из раковых стволовых клеток для скрининга противоопухолевых препаратов [7]. В данном исследовании для сравнительной оценки эффективности косметического препарата p199, обладающего антивозрастным эффектом, в качестве объекта выбрана культура фибробластов человека. Это связано с тем, что наиболее значимые изменения, происходящие в процессе старения кожи, наблюдаются в дерме, где происходит дезорганизация взаимодействия фибробластов и интерстициального матрикса. Фибробласты играют ключевую роль в морфогенезе и динамическом ремоделировании дермы, включая синтез компонентов внеклеточного матрикса и специфических ферментов, деградирующий его. Следовательно, воздействие препарата должно быть направлено именно на фибробласты, которые поддерживают структуру и функциональность кожной матрицы. Целями такого исследования являются подтверждение и улучшение предыдущих результатов с использованием более сложных аналитических методов для измерения динамического синтеза компонентов внеклеточного матрикса в сфероиде, где фибробласты находятся в более физиологичной среде. В этой трехмерной модели фибробласты не пролиферируют и окружены собственным новосинтезированным матриксом с организацией, очень похожей на нормальную дерму.

Материалы и методы

Первичную культуру дермальных фибробластов получили с добровольного информированного согласия пациента (пол — женский, возраст — 54 года) из биоптата кожи посредством механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки 0,25% раствором трипсина. Высеивали на чашки Петри в плотности 1×10^5 — 2×10^5 клеток/см² в ростовую среду DMEM/F12, дополненную 2мМ L-глутамином, гентамицином (50 мкг/мл) и 10% фетальной телячьей сыворотки, среду заменяли каждые двое суток. Культивировали в стандартных условиях (+37°C, 5% CO₂) до 4 пассажа, описывали клетки по экспрессии характерных маркеров и криоконсервировали аликвоты культуры по 1×10^6 клеток, создавая банк первичной куль-

туры дермальных фибробластов человека, на которой проводили все дальнейшие исследования.

Для анализа размораживали две аликвоты культуры, одну из которых культивировали до появления всех признаков репликативного старения дермальных фибробластов (18 пассаж, P18). Размороженная, не пассированная культура клеток 4 пассажа (P4) считалась контрольной и соответствовала по своим характеристикам фибробластам молодой кожи. Сфероиды 3D культуры P18 и P4 получали, высевая клетки на агарозные планшеты (3DPetriDish, MicrotissueTM, США) в концентрации 25×10^4 клеток/мл.

Чтобы исследовать дозозависимое воздействие на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов, аликвоты (500 мкл) пептида p199, растворенного в солевом буфере смешивали с полной ростовой средой в соотношении 1:10, 1:100 и культивировали клетки и сфероиды в присутствии пептида в течение 72 ч. Исследовали морфологию клеток и экспрессию маркеров: коллагенов I, III и IV типов и фибронектина. Далее для проведения иммуноцитохимического анализа клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида (4°C, 20 мин). Сфероиды затем помещали в 20% раствор сахарозы (4 ч, +4°C) и готовили серию срезов толщиной 10–20 мкм на криотоме SM1850UV (Leica, Германия). Результат экспрессии визуализировали с помощью последовательной инкубации образцов с первичными и вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами FITC (E = 525 nm) и DyLight594 (E = 617 nm). Ядра докрашивали раствором Hoechst 33258 (0,004 мг/мл). Анализ проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV10 (Olympus, Япония).

Результаты и обсуждение

Использование в исследовании одной и той же первичной культуры клеток позволяет сопоставлять и сравнивать полученные данные. Как показал предварительный анализ, монослойная культура дермальных фибробластов P18 демонстрировала признаки репликативного старения: индекс пролиферации был ниже 1,5, средний диаметр клеток приближался к 20 мкм, тогда как индекс пролиферации культуры P4 был равен 2–2,5, а средний диаметр клеток был равен 13 мкм. Кроме того, культура P18 практически не экспрессировала коллагены I, III и IV типов и фибронектин и не формировала сфероиды в 3D культуре, что также подтверждает процесс «старения» клеток в культуре.

Далее приведены результаты экспрессии ключевых белков внеклеточного матрикса (ВКМ), обеспечивающих целостность и функциональность здоровой и молодой кожи, в 2D и 3D культуре фибробластов при культивировании в присутствии различных концентраций p199. Как показано на рис. 1 и 2, экспрессия коллагенов I и III типов в культуре P18 соответствует экспрессии в культуре P4 независимо от внесенной концентрации белка p199, тогда как экспрессия коллагена IV типа (рис. 3) и фибронектина (рис. 4) явно имеет дозозависимый характер: интенсивность флуоресценции изменяется при воздействии различных концентраций препарата. Локализацию белков ВКМ в клетках наблюдали следующую: коллагенов I и IV типов — околоядерную, коллагена III типа — равномерную по цитоплазме, фибронектина — вдоль мембран в цитоплазме и во внеклеточном пространстве.

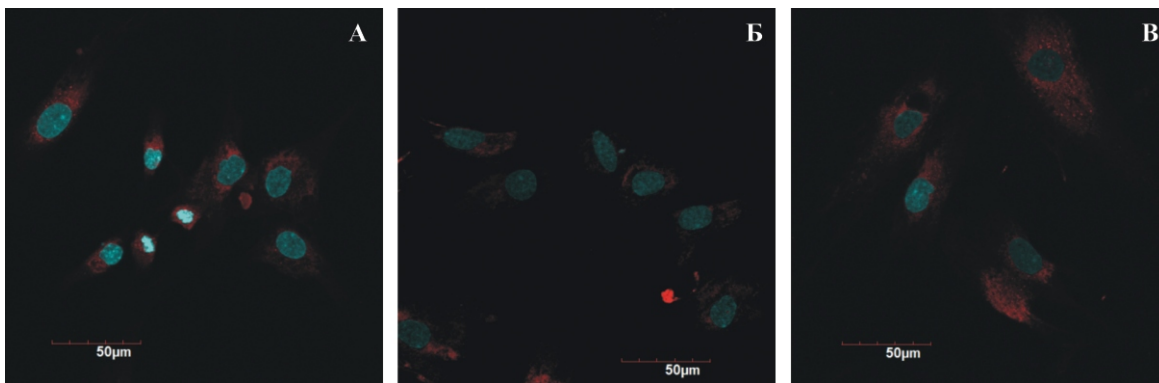


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена I (красный) в 2D культуре фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

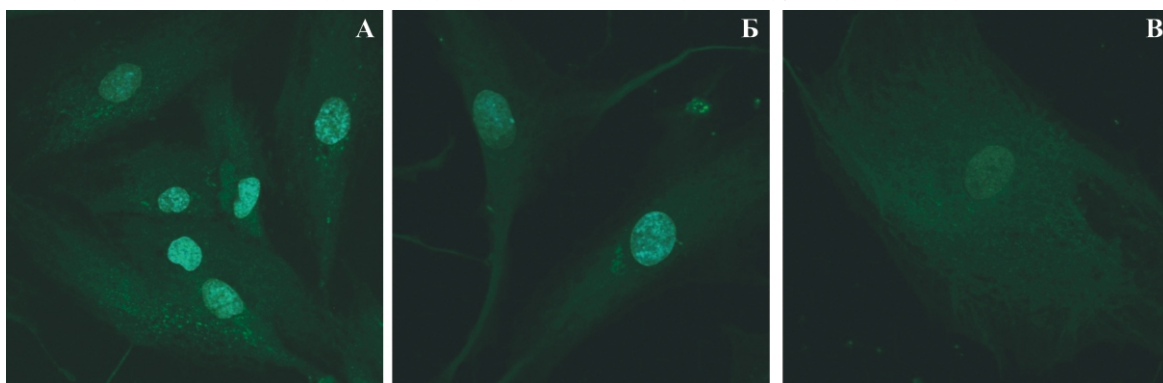


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена III (зеленый), α SMA (красный) в 2D культуре фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

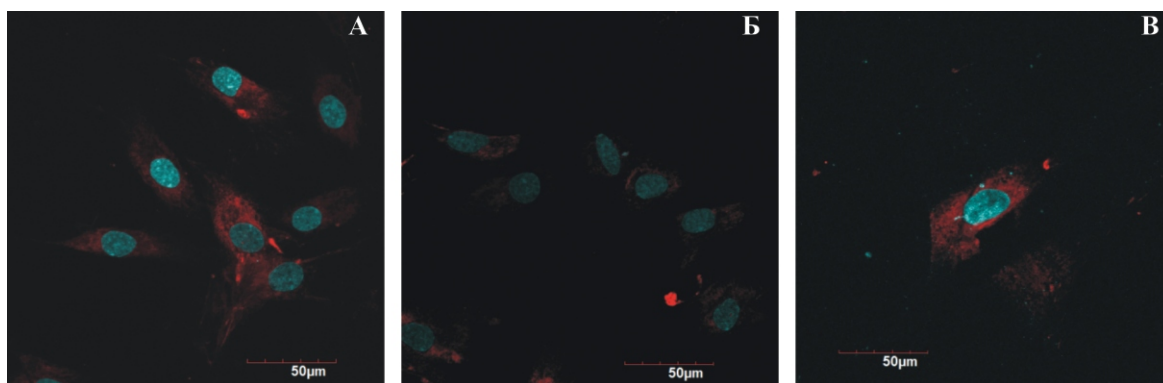


Рис. 3. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена IV (красный) в 2D культуре фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В).

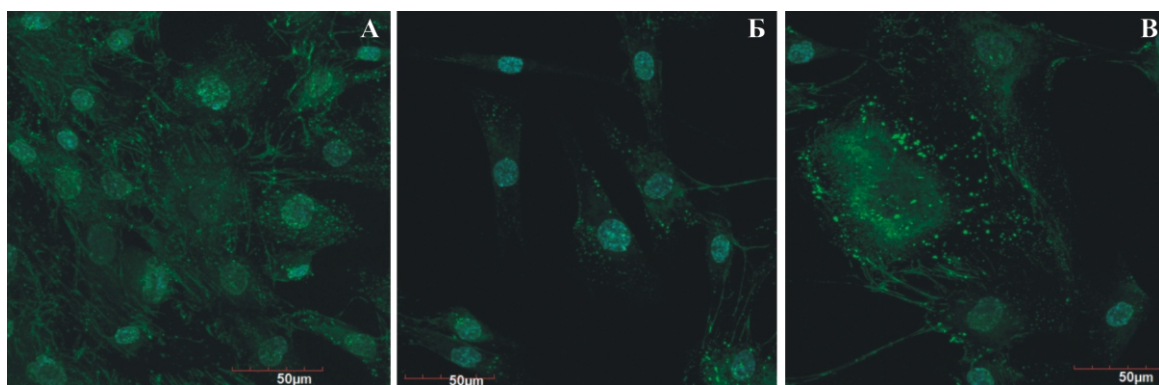


Рис. 4. Иммуноцитохимический анализ экспрессии фибронектина (зеленый) в 2D культуре P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

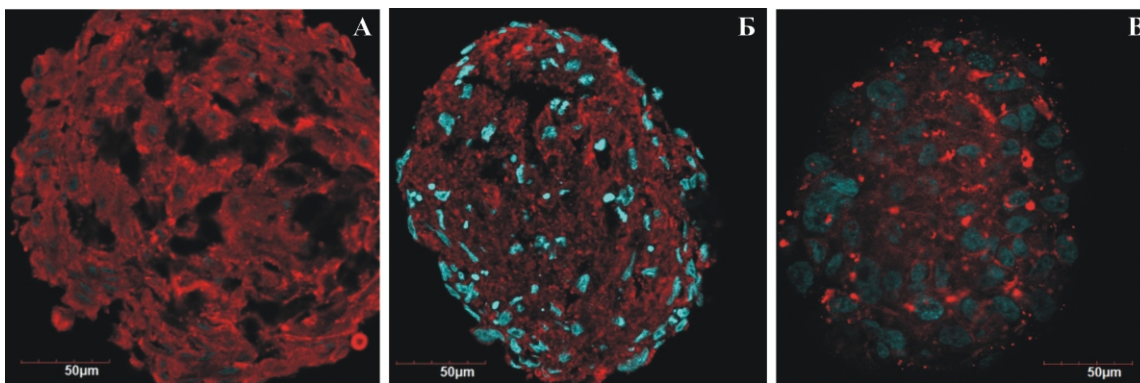


Рис. 5. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена I (красный) в сфероидах, полученных из фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

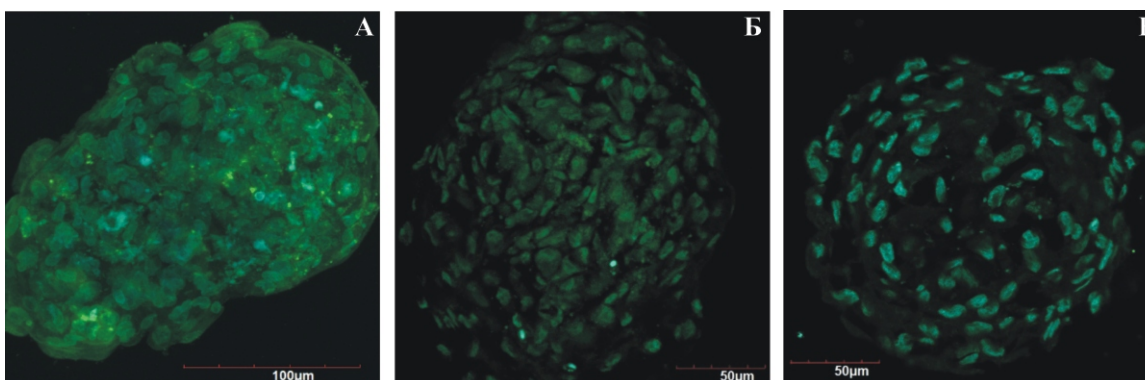


Рис. 6. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена III (зеленый), α SMA (красный) в сфероидах, полученных из фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

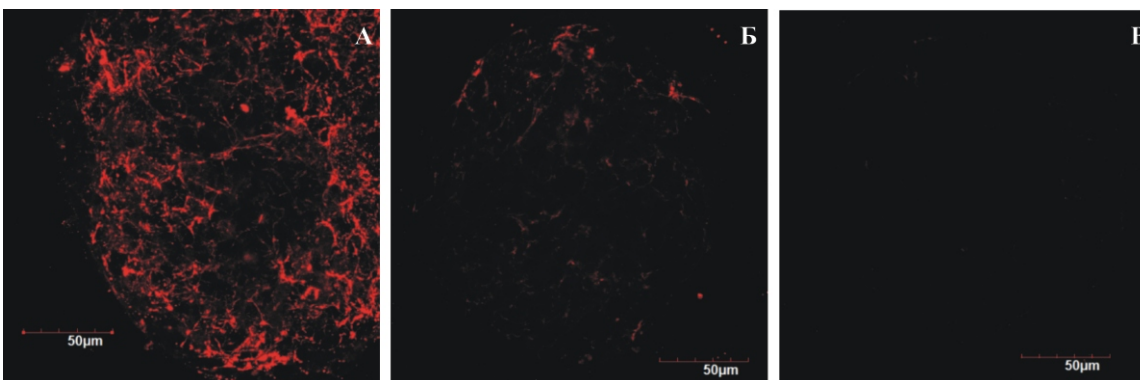


Рис. 7. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена IV (красный) в сфероидах, полученных из фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В).

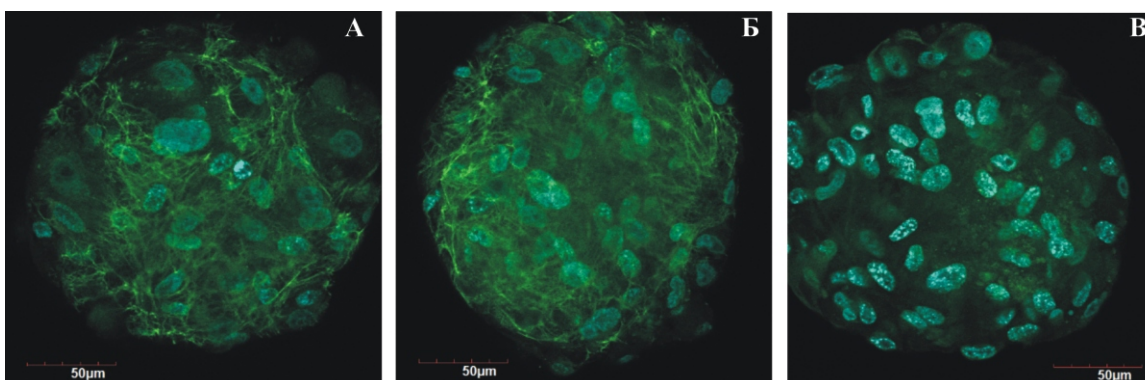


Рис. 8. Иммуноцитохимический анализ экспрессии фибронектина (зеленый) в сфероидах, полученных из фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

Анализ экспрессии белков ВКМ в сфероиде фибробластов показал, что в 3D культуре клетки синтезируют белки матрикса не только внутри клетки, но и во внеклеточное пространство, позволяя таким образом оценить структуру новообразованного каркаса. В 3D культуре коллаген I (рис. 5) и III (рис. 6) типов формируют плотную оболочку, окружая все клетки сфероида, экспрессия белков носит дозозависимый характер: интенсивность флуоресценции выше при разведении препарата p199 в ростовой среде 1:10. Однако изменения в интенсивности флуоресценции метки коллагенов I и III не так значительны, как для коллагена IV типа (рис. 7). Коллаген IV типа формирует во внеклеточном пространстве сетевидный каркас, расположенный преимущественно в центральной части сфероида. Экспрессия коллагена IV типа полностью коррелирует с концентрацией p199 в среде, более того экспрессия этого белка ВКМ во внеклеточном пространстве полностью отсутствует в контрольной группе, которую не инкубировали с пептидом p199. Экспрессия фибронектина также зависит от концентрации препарата p199, увеличиваясь в соответствии с его концентрацией и превышая уровень экспрессии белка в контрольной группе (рис. 8). Структура новосинтезированного фибронектина во внеклеточном пространстве — нитевидная, матрикс объединяет клетки сфероида в единую сеть, участвуя, вероятно, в компактизации сфероида.

Коллаген — фибриллярный секреторный белок, наиболее распространенный в организме человека. Он образует волокна, переплетающиеся как нити в ткани. Коллаген и эластин формируют волокнистый каркас, в который могут вращаться новые клетки, и обеспечивают коже упругость и эластичность, а нарушение их синтеза приводит к потере этих свойств. По морфологии коллаген принято делить на три группы: фибриллярный коллаген: коллагены I, II, III и V типов; сетевидный коллаген — коллаген IV типа, образующий опорную сеть базальных мембран; нитевидный коллаген — коллаген VI типа.

Коллагены I и III типов формируют основной каркас дермы, но их соотношение в коже меняется с возрастом [4]. В результате старения в коже происходит накопление активных форм кислорода (АФК), которые повышают уровень пептида-активатора 1 (AP-1), стимулирующего активность матричных металлопротеиназ 1, 2 и 9 (ММП1, 2, 9), что приводит к разрушению внеклеточного матрикса кожи. В то же время АФК снижают содержание фактора TGF- β 2, отвечающего за синтез нового коллагена. Таким образом, формируется дисбаланс белков ВКМ [6].

Коллаген IV типа — уникальный член семейства коллагенов, который присутствует только в базальной мембране, характерен только для эмбрионального и детского возраста и с годами быстро уменьшается [9]. Фибробласты, которые были использованы для данного исследования, были выделены из кожи человека, возраст которого составлял 54 года, поэтому экспрессия коллагена IV в контрольной группе выявлена не была. Однако именно данный параметр может стать наиболее показательным в доказательстве эффективности антивозрастной активности косметических препаратов. Как следует из сопоставления результатов экспрессии 2D (рис. 3) и 3D (рис. 7) культуры фибробластов, клетки человека с возрастом не утрачивают полностью способность синтезировать коллаген IV типа (рис. 3, B), однако это не означает, что при этом фибробласты сохраняют способность синте-

зировать его во внеклеточное пространство для формирования каркаса дермы (рис. 7, B). Из представленных результатов следует, что оценить изменения в синтезе и структуре ключевых белков ВКМ возможно только в 3D культуре.

Из приведенных выше результатов, также было установлено, что препарат 199 положительно влияет на уровень экспрессии фибронектина (рис. 8), который вместе с гликозаминогликанами составляют аморфный (основной) компонент межклеточного матрикса. Также фибронектин отвечает за адгезию, подвижность, дифференцировку и взаимную ориентацию клеток [3]. Кроме того, при изучении процессов сфероидообразования в культуре дермальных фибробластов было установлено, что клетки, не экспрессирующие фибронектин не могли образовать [14]. В данном исследовании фибробласты P18 не образовывали сфероиды, что, вероятно, было связано именно со сниженной экспрессией фибронектина, и, как следует из представленных результатов, имело обратимый эффект в присутствии анализируемого препарата p199. Поэтому способность клеток формировать сфероиды также можно считать косвенным признаком антивозрастного действия косметических препаратов.

Монослойные клеточные культуры являются признанной модельной системой, используемой в разработке и исследованиях лекарственных средств. Однако такая 2D клеточная модель отличается от естественных условий. Обычная адгезивная культура представляет собой растущие двумерным (2D) монослоем клетки на плоской поверхности. Клетки, прикрепленные к искусственной пластиковой или стеклянной подложке, контактируют с другими клетками с образованием межклеточных контактов только в одной плоскости, что препятствует формированию многомерной структуры. Все органы и ткани, включая кожу, имеют трехмерную клеточную организацию в которой клетки взаимодействуют друг с другом, образуя сложные комплексы контактов с другими клетками и внеклеточным матриксом, формируя, таким образом, уникальное микроокружение. Поэтому «старение» монослойной культуры фибробластов *in vitro* во многом сходно, но не полностью эквивалентно старению кожи *in vivo*. Воспроизвести все возрастные изменения на монослойной культуре в полном объеме не удастся. Это приводит исследователей к переводу модельных систем из 2D в 3D условия культивирования [5]. Одним из вариантов 3D клеточных культур являются сфероиды. Они представляют собой трехмерные самоорганизующиеся в силу природных адгезивных свойств сферические кластеры клеток, состоящие как из одного типа клеток, так и из нескольких [10]. При формировании сфероидов клетки могут восстановить межклеточные контакты и создать микроокружение, поддерживающее их нативный фенотип. Однако не все клетки могут образовывать сфероиды. Низкодифференцированные клетки человека, включая «незрелые» фибробласты, в условиях отсутствия адгезии способны агрегировать друг с другом, формируя новую многоклеточную структуру — сфероид, содержащий эпителиальный и мезенхимный компоненты [1, 11, 13]. Стареющие культуры фибробластов способность к сфероидообразованию утрачивают. Для сфероидообразования важен определенный уровень экспрессии фибронектина и интегринов α 5 и β 1 фибробластами. Дифференцировка и последующее старение клеток сопровождается утратой

способности к мезенхимо-эпителиальному переходу, без которого невозможно формирование сфероидов. Таким образом, сфероидообразование является уникальной простой количественной тестовой системой для определения клеточной зрелости и оценки влияния на нее исследуемых препаратов.

Кроме того, 3D клеточные культуры более стабильны, чем 2D клеточные культуры. Их можно поддерживать в культуре в течение длительного времени — более 3 месяцев, в отличие от монослойных культур, которые быстро достигают конфлюэнтного состояния и требуют постоянного пересева или при отсутствии пролиферации («старые» культуры) погибают. Поэтому именно 3D культуры можно активно использовать при изучении отсроченных эффектов лекарственных препаратов.

Список литературы

1. Кошелева Н.В., Зурина И.М., Сабурин И.Н., Горкун А.А., Колокольцова Т.Д., Борзенко С.А., Репин В.С. Влияние эмбриональной телочной сыворотки на формирование сфероидов из стромальных клеток лимба глаза // Патогенез. — 2015. — Т. 13, №2. — С. 4—11.
2. Augustin C., Frei V., Perrier E., Huc A., Damour O., An in vitro selection of new cosmetic active compounds: From screening tests on monolayered fibroblast culture to efficiency study on 3-D dermal equivalent // J. Appl. Cosmetol. — 1997. — Т. 15. — С. 1—12.
3. Boyer B., Kern P., Fournier A., Labat-Robert J. Age-dependent variations of the biosyntheses of fibronectin and fibrous collagens in mouse skin // Experimental gerontology. — 1991. — Т. 26, № 4. — С. 375—383.
4. Cheng W., Yan-hua R., Fang-gang N., Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury // African Journal of Biotechnology. — 2013. — Т. 10, № 13. — С. 2524—2529.
5. Filatov M.A., Khramova Y.V., Semenova M.L. In Vitro Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art // Acta Naturae. — 2015. — Vol. 7, №2. — P. 48—56.
6. Helfrich Y.R., Sachs D.L., Voorhees J.J. Overview of skin aging and photoaging // Dermatol. Nurs. — 2008. — Т. 20, № 3. — С. 177.
7. Hickman J.A., Graeser R., de Hoogt R., Vidic S., Brito C., Gutekunst M., van der Kuip H. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo // Biotechnol. J. — 2014. — Т. 9, № 9. — С. 1115—1128.
8. Kenny H.A., Lal-Nag M., White E.A., Shen M., Chiang C.-Y., Mitra A.K. Quantitative high throughput screening using a primary human three-dimensional organotypic culture predicts in vivo efficacy // Nature Communications. — 2015. — 6. — P. e6220.
9. Khoshnoodi J., Pedchenko V., Hudson B. G. Mammalian collagen IV // Microscopy research and technique. — 2008. — Т. 71, № 5. — С. 357—370.
10. Kosheleva N., Saburina I., Zurina I., Gorkun A., Kolokoltsova T., Repin V. Studying chimeric cell spheroids in 3D culture // Regenerative Medicine. — 2015. — Vol. 10, №07s — P. 178.
11. Kubatiev A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N., Repin V.S. From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows // Journal of Cytology & Histology. — 2015. — Vol. 6, №6. — P. 378.
12. Reichl S., Bednarz J., Muller-Goymann C.C. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies // The British Journal of Ophthalmology. — 2004. — Т. 88, № 4. — С. 560—565.
13. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2014. — Vol. 158. — Issue 1. — P. 137—144.
14. Salmenpera P., Kankuri E., Bizik J., Siren V., Virtanen I., Takahashi S., Leiss M., Fassler R., Vaheri A. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction // Experimental cell research. — 2008. — Т. 314. — № 19. — С. 3444—3452.

15. Seet W.T., Maarof M., Khairul Anuar K., et al. Shelf-Life Evaluation of Bilayered Human Skin Equivalent, MyDerm™. Brandner JM, ed. // PLoS ONE. — 2012. — Т. 7. — № 8. — P. e40978.

16. Takii T., Yamamoto Y., Chiba T., Abe C., Belisle J.T., Brennan P.J., Onozaki K. Simple fibroblast-based assay for screening of new antimicrobial drugs against Mycobacterium tuberculosis // Antimicrob Agents Chemother. — 2002. — Т. 46, № 8. — С. 2533—2539.

17. Zang R., Li D., Tang I.-C., Wang J., Yang S.-T. Cell-based assays in high-throughputs for drug discovery // International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. — 2012. — Т. 1, № 1. — С. 31.

Поступила 20.09.2015

References

1. Kosheleva N.V., Zurina I.M., Saburina I.N., Gorkun A.A., Kolokoltsova T.D., Borzenok S.A., Repin V.S. The impact of fetal bovine serum on formation of spheroids from eye stromal limbal cells // Patogenez. — 2015. — Vol. 13, №2. — P. 4—11.
2. Augustin C., Frei V., Perrier E., Huc A., Damour O., An in vitro selection of new cosmetic active compounds: From screening tests on monolayered fibroblast culture to efficiency study on 3-D dermal equivalent // J. Appl. Cosmetol. — 1997. — Т. 15. — С. 1—12.
3. Boyer B., Kern P., Fournier A., Labat-Robert J. Age-dependent variations of the biosyntheses of fibronectin and fibrous collagens in mouse skin // Experimental gerontology. — 1991. — Т. 26, № 4. — С. 375—383.
4. Cheng W., Yan-hua R., Fang-gang N., Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury // African Journal of Biotechnology. — 2013. — Т. 10, № 13. — С. 2524—2529.
5. Filatov M.A., Khramova Y.V., Semenova M.L. In Vitro Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art // Acta Naturae. — 2015. — Vol. 7, №2. — P. 48—56.
6. Helfrich Y.R., Sachs D.L., Voorhees J.J. Overview of skin aging and photoaging // Dermatol. Nurs. — 2008. — Т. 20, № 3. — С. 177.
7. Hickman J.A., Graeser R., de Hoogt R., Vidic S., Brito C., Gutekunst M., van der Kuip H. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo // Biotechnol. J. — 2014. — Т. 9, № 9. — С. 1115—1128.
8. Kenny H.A., Lal-Nag M., White E.A., Shen M., Chiang C.-Y., Mitra A.K. Quantitative high throughput screening using a primary human three-dimensional organotypic culture predicts in vivo efficacy // Nature Communications. — 2015. — 6. — P. e6220.
9. Khoshnoodi J., Pedchenko V., Hudson B. G. Mammalian collagen IV // Microscopy research and technique. — 2008. — Т. 71, № 5. — С. 357—370.
10. Kosheleva N., Saburina I., Zurina I., Gorkun A., Kolokoltsova T., Repin V. Studying chimeric cell spheroids in 3D culture // Regenerative Medicine. — 2015. — Vol. 10, №07s. — P. 178.
11. Kubatiev A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N., Repin V.S. From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows // Journal of Cytology & Histology. — 2015. — Vol. 6, №6. — P. 378.
12. Reichl S., Bednarz J., Muller-Goymann C.C. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies // The British Journal of Ophthalmology. — 2004. — Т. 88, № 4. — С. 560—565.
13. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2014. — Vol. 158. — Issue 1. — P. 137—144.
14. Salmenpera P., Kankuri E., Bizik J., Siren V., Virtanen I., Takahashi S., Leiss M., Fassler R., Vaheri A. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction // Experimental cell research. — 2008. — Т. 314, № 19. — С. 3444—3452.
15. Seet W.T., Maarof M., Khairul Anuar K., et al. Shelf-Life Evaluation of Bilayered Human Skin Equivalent, MyDerm™. Brandner JM, ed. // PLoS ONE. — 2012. — Т. 7, № 8. — P. e40978.
16. Takii T., Yamamoto Y., Chiba T., Abe C., Belisle J.T., Brennan P.J., Onozaki K. Simple fibroblast-based assay for screening of new antimicrobial drugs against Mycobacterium tuberculosis // Antimicrob Agents Chemother. — 2002. — Т. 46, № 8. — С. 2533—2539.

Copmarative study of p199 effect on 2D and 3D cultures of human dermal fibroblasts

**Kozhina K.V.^{1,2}, Saburina I.N.¹, Gorkun A.A.¹, Zurina I.N.¹,
Kosheleva N.V.^{1,3}, Volkova E.N.², Morozov S.G.¹**

¹ — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315

² — LLC «Center of restorative medicine», 11-1, Marshal Vasilevsky st., Moscow, Russian Federation, 123098

³ — Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 12-1, Leninskie Gory, Moscow, Russian Federation, 119234

Nowadays, biotechnologies open the way for application of a wide range of effective and innovative cosmetic active substances. Modern development of cell technologies theoretically allows us to completely replace animal models for the development and analysis of cosmetic products with cell cultures, which are relatively easy-to-use, highly sensitive to toxic effects, and preferable in the context of bioethics. Monolayer culture of dermal fibroblasts is a widely used model system in the field of testing and development of cosmetic products. In contrast to 2D monolayer, 3D spheroids from dermal fibroblasts can become a model that would be closer to native tissue organization while maintaining a high throughput analysis capacity. In the current study, we compared the dose-dependent effect of P199 peptide on the expression of I, III and IV types collagen and fibronectin in 2D and 3D cultures of human dermal fibroblasts. By using this three-dimensional model, we were able to evaluate changes in the level of expression of extracellular matrix proteins, as well as their structure during synthesis to the extracellular space.

Key words: *cosmetic products testing, cell culture, fibroblasts, spheroids, collagen, fibronectin*

Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови больных atopическим дерматитом в молодом возрасте

Елистратова И.В.¹, Тарасова М.В.², Морозов С.Г.²

¹ — ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России», 143930, Балашиха, мкр. Никольско-Архангельский, ш. Вишняковское, д. 101

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

Целью данной работы было измерение генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных atopическим дерматитом (АД) в стадии ремиссии и в начальный период обострения. Группу больных и доноров составили молодые мужчины. Для стимуляции NADPH оксидазы использовали fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) или PMA (форболмиристатацетат). Оба вещества повышали генерацию супероксидного аниона у больных atopическим дерматитом в начальный период обострения при легкой степени заболевания (индекс SCORAD < 20). У больных atopическим дерматитом средней степени тяжести выброс супероксидного аниона был достоверно подавлен при использовании как fMLP, так и PMA. В работе также определена кинетика генерации супероксидного аниона нейтрофилами в течение трех часов после приёма стандартного завтрака. Кривая данной динамики значительно различалась для доноров и больных atopическим дерматитом.

Ключевые слова: atopический дерматит, нейтрофилы, супероксидный анион, форболовый эфир, fMLP

Введение

Atopический дерматит — это многофакторное заболевание, в патогенезе которого определенную роль играет стресс, обуславливающий изменения метаболизма клеток иммунной системы [1]. Нейтрофилы являются клетками природного иммунитета, которые при адаптивном иммунитете выполняют эффекторную функцию в межклеточном взаимодействии. Из кровяного русла нейтрофилы мигрируют в ткани в очаги инфекции, где при распознавании инфекционного агента реагируют выбросом реактивных метаболитов кислорода за счёт активации NADPH оксидазы, так называемым «кислородным взрывом». При этом изменяется объем нейтрофилов, а также физико-химические свойства их плазматической мембраны, что связано с действием реактивных метаболитов кислорода на мембранные липиды. Активность NADPH оксидазы, локализованной в плазматической мембране нейтрофилов, может регулироваться локальным изменением pH: оптимальным для стимуляции NADPH является pH 7,0 [2].

Форболмиристатацетат (PMA) — это фармакологический активатор NADPH оксидазы [3]. Контакт нейтрофилов с PMA приводит к фосфорилированию митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) p38 и киназы, отвечающей на экстраклеточные стимулы (ЕРК), что является предшествующими событиями при активации NADPH оксидазы и генерации супероксидного аниона, продукция которого стимулирует ответ клетки на стресс [4].

Рецептор-зависимым стимулом для генерации супероксида нейтрофилами является N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). Действие fMLP на нейтрофилы зависит от концентрации, он стимулирует выход катепсина G, катализирует фосфорилирование киназы Lyn семейства Src киназ, далее сигнальный путь включает перемещение адаптера Tec из цитозоля ко внутренней поверхности плазматической мембраны, далее фосфорилируют-

ся киназы АКТ, p38 МАРК, фосфолипаза C_γ2 (PLC_γ2), протеинкиназа C (PKC) и мембранно-локализованная субъединица p47phox NADPH оксидазы, что приводит к активации фермента [5].

Имеется определенная кинетика выброса супероксида нейтрофилами: в течение первой минуты происходит экспоненциальное повышение генерации супероксида, через 30—40 минут уровень генерации выходит на плато. При определенных условиях продукция супероксида нейтрофилами может продолжаться несколько часов [6].

У больных АД повышена экспрессия генов, кодирующих хемоаттрактанты для нейтрофилов [7]. Однако, по другим данным, при atopическом дерматите ослаблен приток нейтрофилов в ткани [8]. Нарушение функциональной активности нейтрофилов обнаружено у трети больных atopическим дерматитом, нарушение хемотаксиса — у 16,6%, изменение продукции супероксида — у 6%, нарушение бактерицидной активности — у 24,5% больных. Нарушение продукции супероксида коррелировало с наличием абсцессов и инфекцией ЦНС [9]. У больных atopическим дерматитом средней степени тяжести и тяжело го течения показано существенное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, а также ослабление хемотаксической активности в ответ на зимозан [10]. Показано снижение фагоцитарной активности клеток больных atopическим дерматитом в отношении *Klebsiella pneumoniae*, при этом авторы отмечают повышение экспрессии рецепторов CD11b, CD66b, TLR2, TLR4, TLR5 по сравнению со здоровыми лицами [11]. По другим данным у больных atopическим дерматитом функциональная активность нейтрофилов в отношении ответа на рецептор-зависимые стимулы, в том числе fMLP, сопоставима с данными здоровых людей [12].

В связи с неоднозначностью данных литературы об активности нейтрофилов периферической крови больных

АД, целью данной работы было изучение эффектов двух стимуляторов NADPH оксидазы — fMLP и PMA, на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами. Для сравнения функциональной активности нейтрофилов доноров и больных АД в физиологических условиях проведено определение динамики генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови после приема пищи.

Методы

Доноры и пациенты

Для данного исследования отбирались мужчины в возрасте от 18 до 20, больные АД, женщин исключали в связи с возможным влиянием гормональных колебаний на показатели активности нейтрофилов. У всех больных АД с раннего детства, длительность заболевания от 12 до 14 лет. Всем больным проведены биохимические исследования, показатели внутри групп имели минимальный разброс. В первую группу ($n = 16$) вошли больные АД в стадии ремиссии, которые обращались к врачу для проведения аллергопроб. Во вторую группу ($n = 36$) вошли больные, обратившиеся по поводу обострения АД, тяжесть состояния больных оценивали по индексу SCORAD.

Донорами были молодые здоровые мужчины в возрасте 18–20 лет ($n = 22$), проходившие обследование для зачисления на службу, все участвовали в проведении данного эксперимента добровольно. Доноры и пациенты подписывали документ об информированном согласии. Критериями исключения из данного эксперимента были: наличие острых вирусных или бактериальных инфекций, наличие системных аллергических, воспалительных или онкологических заболеваний, а также соматической патологии, которая могла бы повлиять на полученные результаты.

У всех обследованных лиц кровь брали натощак, затем все получали стандартный завтрак (200 мл молока 3,2% жирности, 50 г хлеба «Бородинский» и 1 вареное куриное яйцо стандартного размера). После завтрака кровь брали трижды с интервалов в 1 час. Таким образом, забор крови осуществлён четыре раза у каждого больного и донора.

Выделение нейтрофилов

Работа с кровью людей проводилась по международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натощак из локтевой вены в пробирку с ЭДТА. Чистую популяцию нейтрофилов периферической крови человека выделяли на градиенте плотности Перколла (Percoll, Sigma-Aldrich, USA). Для приготовления градиента использовали фосфатный буфер без кальция и магния (PBSc), чтобы избежать образования конгломератов клеток, а также для исключения влияния кальция на генерацию супероксидного аниона клетками. Для приготовления 10-кратного буфера на 1 литр H_2O добавляли $NaCl$ 77,5 г; KH_2PO_4 2,0 г; K_2HPO_4 15,0 г. Далее разведением готовили однократный буфер (1 x PBSc), растворы доводили до pH 7,0 и фильтровали через одноразовые фильтры ($d = 22$ микрона) в стерильные колбы.

Изотонический 90% раствор Перколла получали из 27 мл исходного Перколла и 3 мл 10-кратного PBSc, его использовали для получения остальных ступеней градиента. Градиенты готовили ex tempore, последовательно наслаивая 90%, 81%, 70% и 60% растворы Перколла, по-

верх наслаивали 5 мл крови, полученную в день исследования утром натощак в вакутейнере с ЭДТА и разведенную 1:1 стерильным физиологическим раствором. Градиенты центрифугировали 20 минут при $t^\circ +22^\circ C$ при ускорении 500g. После центрифугирования на дне пробирки концентрировались эритроциты. Нейтрофилы выделяли в интерфазе между слоями 81% и 70%; Перколла, лимфоциты концентрировались между 70% и 60% слоями Перколла, на поверхности первого слоя градиента выделялись тромбоциты с чистотой ~100%. Полученные популяции клеток отмывали дважды в 1 x PBSc центрифугированием по 10 минут при $t^\circ +22^\circ C$ и ускорении 200g. Контроль выделения клеток проводили как морфологически (по окраске гематоксилин-эозином с последующим анализом в световом микроскопе), так и методом проточной цитометрии (по чистоте гейта соответствующей популяции клеток). Чистота выделенных популяций клеток составляла $94 \pm 3\%$, выход нейтрофилов из 1 мл крови — $1,5 - 5,2 \times 10^6$ клеток.

Измерение уровня супероксидного аниона

Для количественного измерения кислородного взрыва нейтрофилами крови их дважды отмывали PBSc, довели концентрацию клеток до 1×10^6 / мл. По 1 мл взвеси клеток помещали в термостатируемую при $+37^\circ C$ кювету спектрофотометра UV-3000 (Shimadzu Corp., Japan) с программным управлением. Через 5 минут вносили 2 мкл [0,54 мг/мл] цитохрома с (Sigma). Через 10 секунд вносили 10 мкл PMA [0,1 мкМ] или fMLP [5 мкМ] (Sigma) и в течение 30 минут измеряли генерацию супероксидного аниона в режиме реального времени при двух длинах волн — 549 нм и 492 нм. Программа компьютера определяла концентрацию наномолей супероксидного аниона, высвобождаемого в среду одним миллионом клеток в минуту [13]. Для каждого больного ставили подряд три повтора.

Статистический анализ

Результаты экспериментов анализировали по программе ANOVA, данные представлены как $M \pm m$. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, статистический анализ нескольких групп проводился с помощью непараметрического анализа методом множественного сравнения по критерию Ньюмена—Кейлса, $P \leq 0,05$ дается как статистически значимое различие между группами.

Результаты

Все участники данного эксперимента находились в клинике в течение трех часов после приема стандартного завтрака. В нейтрофилах крови, взятой натощак у больных АД в стадии ремиссии, генерация супероксидного аниона под действием fMLP практически не отличалась от показателей доноров ($0,75 \pm 0,14$ vs $0,76 \pm 0,09$ нМ/мл/ 10^6 клеток). Для больных АД в стадии обострения обнаружено статистически достоверное различие ($P < 0,05$) по уровню генерации супероксидного аниона fMLP-стимулированными нейтрофилами по сравнению с донорами (рис. 1).

На рис. 1 приведен сравнительный анализ показателей больных АД в стадии обострения в зависимости от тяжести заболевания. В начальном периоде обострения АД при ин-

Супероксидный анион,
нМ / мл / 10⁶ клеток / мин

Стимуляция fMLP

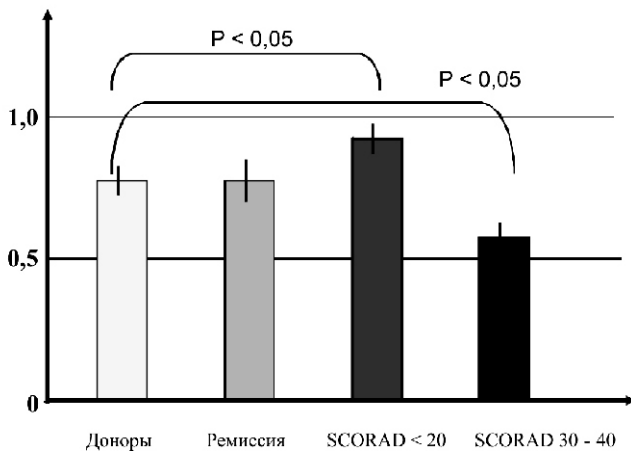


Рис. 1. Стимулированная fMLP продукция супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови здоровых доноров и больных atopическим дерматитом в стадиях ремиссии и обострения.

Супероксидный анион,
нМ / мл / 10⁶ клеток / мин

Доноры

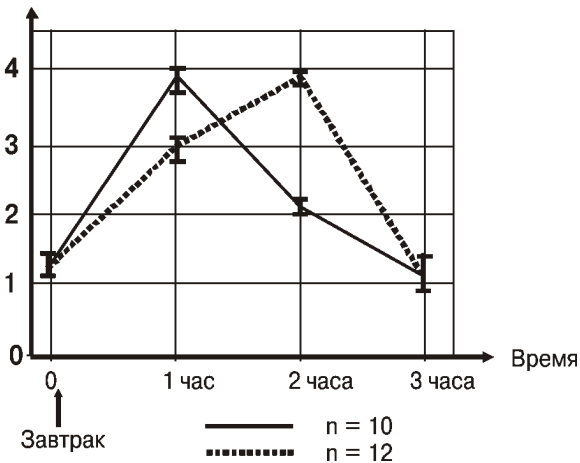


Рис. 2. Динамика генерации супероксидного аниона стимулированными форболовым эфиром нейтрофилами периферической крови здоровых доноров. Измерения проведены натощак и трижды с интервалом в час после приема стандартного завтрака.

декс SCORAD < 20 активность нейтрофилов повышается (концентрация супероксида $0,92 \pm 0,11$ нМ/мл/10⁶ клеток). При обострении АД и распространенном процессе (индекс SCORAD 30—40) нейтрофилы генерируют супероксидный анион в концентрациях, достоверно меньшей по сравнению с донорами и с АД легкой степени ($0,61 \pm 0,10$ нМ/мл/10⁶ клеток, $P < 0,05$).

Активация NADPH оксидазы нейтрофилов наступает при связывании рецепторов, в том числе для fMLP, или при активации цитозольных сигнальных путей, например, при контакте с PMA. У больных АД уровень генерации супероксидного аниона нейтрофилами при стимуляции PMA значительно выше, чем под действием fMLP, однако имеется та же тенденция, то есть наблюдается повышение концентрации супероксида при легкой степени течения АД (индекс SCORAD < 20) и снижение его уровня при более тяжелом течении (индекс SCORAD 30—40) (таблица).

Большинство работ, касающихся исследования функциональной активности нейтрофилов, проведено на крови, взятой натощак. Однако функционирование клеток происходит при разных физиологических состояниях, в том числе после приема пищи. В этом случае нейтрофилы подвергаются дополнительному воздействию липопропротеидов и макронутриентов. Для сравнения динамики активности нейтрофилов крови доноров и больных АД был проведен эксперимент с приемом стандартного завтрака, после которого трижды осуществлен забор крови.

На рис. 2 представлены результаты доноров по генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови, взятой натощак и после приема стандартного завтрака в течение трех часов. Несмотря на однородность группы доноров по возрасту, полу и биохимическим показателям, среди них четко выделялись две подгруппы. В одной из них ($n = 10$) пик активности нейтрофилов приходился на первый час после приема завтрака, другая подгруппа доноров ($n = 12$) реагировала с замедлением пика активности до второго часа после завтрака. У всех обследованных доноров концентрация высвобождаемого супероксидного аниона приходила к первоначальному уровню через 3 часа после завтрака.

По сравнению с донорами больные АД в стадии ремиссии отвечали более однородно (рис. 3), пик активности приходился на первый час после завтрака, однако часть больных ($n = 9$) имела достоверно более высокие значения концентрации супероксида в этот период ($P < 0,05$). В этой подгруппе больных АД было более существенное снижение концентрации выделяемого супероксида через 3 часа после завтрака, то есть в тот период, когда у доноров происходило восстановление показателей.

У больных АД в стадии обострения кривая динамики генерации супероксидного аниона нейтрофилами существенно отличается от таковой у доноров и больных АД в стадии ремиссии (рис. 4). В этом случае мы также разделили показатели на две подгруппы, поскольку данные этих пациентов существенно различались. У одной подгруппы больных ($n = 8$) не было выраженного пика гене-

Таблица

Генерация супероксидного аниона (нМ/мл/10⁶ клеток) стимулированными форболовым эфиром (PMA) нейтрофилами периферической крови доноров и больных atopическим дерматитом (натощак)

	Доноры (n = 22)	Больные atopическим дерматитом. Классификация по индексу SCORAD		
		Ремиссия (n = 16)	Легкая степень < 20 (n = 15)	Средняя тяжесть 30—40 (n = 21)
Уровень O ₂	$1,21 \pm 0,12$	$1,33 \pm 0,21$	$1,77 \pm 0,17$	$0,93 \pm 0,11$
(+) $P < 0,05$ (по отношению к донорам)			+	+

рации супероксида через час после завтрака, возможно, что он приходился на интервал между первым и вторым часом эксперимента, а так как забор крови осуществлялся ежечасно, то мы не получили в этот период искомого результата.

У больных АД со средней степенью тяжести (индекс SCORAD 30–40) (рис. 5) достоверно снижен уровень генерации супероксидного аниона нейтрофилами, полученными натощак, а также в первый час после приема завтрака, по сравнению со всеми другими группами лиц, участвующих в данном исследовании ($P < 0,05$). Среди этих больных также выделялись две подгруппы на основании пиков генерации супероксидного аниона. Максимальный уровень выброса супероксида в одной подгруппе ($n = 13$) регистрировался в первый час после приема пищи, а во второй ($n = 8$) — через два часа после приема стандартного завтрака.

Таким образом, мы впервые обнаружили различия в функциональной активности нейтрофилов периферической крови, выделенных после приема пищи, между здоровыми молодыми мужчинами и больными atopическим дерматитом.

Уровень генерации супероксидного аниона определяет, в том числе, активацию сигнальных путей апоптоза. Мы измерили уровень спонтанного и индуцированного апоптоза нейтрофилов крови доноров и больных atopическим дерматитом (Елистратова и др., 2016, данные в печати) и показали, что у больных он достоверно выше, чем у здоровых лиц. Этот факт может объяснить низкую активность выделенных от больных АД нейтрофилов активированными в них сигнальными путями апоптоза, что согласуется с данными других авторов [14].

Обсуждение

Исследование выделенной популяции нейтрофилов (с частотой $> 94\%$ клеток), которые поддерживают в течение нескольких часов оптимальную функциональную активность, позволяет проводить сравнительные исследования влияния разных факторов на одного и того же больного. В данной работе было установлено, что нейтрофилы больных существенно различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецептор — зависимые стимулы (fMLP) и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва — форболмиристатацетат (РМА). Известно, что действие fMLP на нейтрофилы зависит от концентрации, при 1мкМ он индуцирует поляризацию клеток и дегрануляцию с выходом лактоферрина [15]. В нашей работе fMLP оказывал достоверно менее выраженный эффект на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови.

По данным литературы повышение уровня гистамина у больных аллергией ингибирует дегрануляцию нейтрофилов под действием fMLP [15]. Препятствует активации нейтрофилов fMLP и, соответственно, снижает уровень генерации супероксидного аниона, связывание хемотаксическими пептидами G-протеин сопряженных рецепторов, привлекающими нейтрофилы в очаг воспаления [16].

Несмотря на различные сигнальные пути, сопряженные с fMLP и РМА в нейтрофилах человека, их эффекты в отношении нейтрофилов больных и здоровых доноров показывают сходную тенденцию. Так, у больных atopическим дерматитом легкой степени тяжести в начале про-

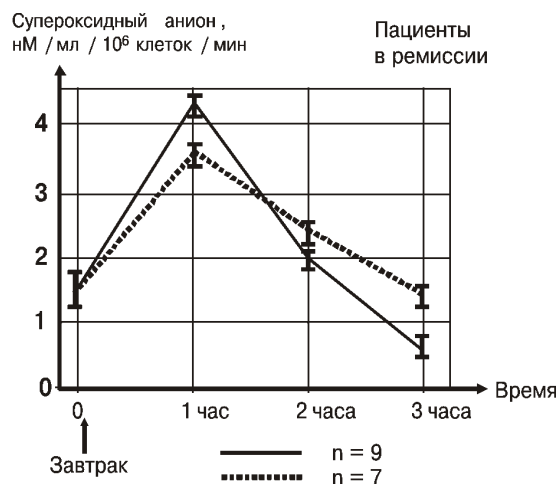


Рис. 3. Динамика генерации супероксидного аниона стимулированными форболовым эфиром нейтрофилами периферической крови больных atopическим дерматитом в стадии ремиссии. Измерения проведены натощак и трижды с интервалом в час после приема стандартного завтрака.

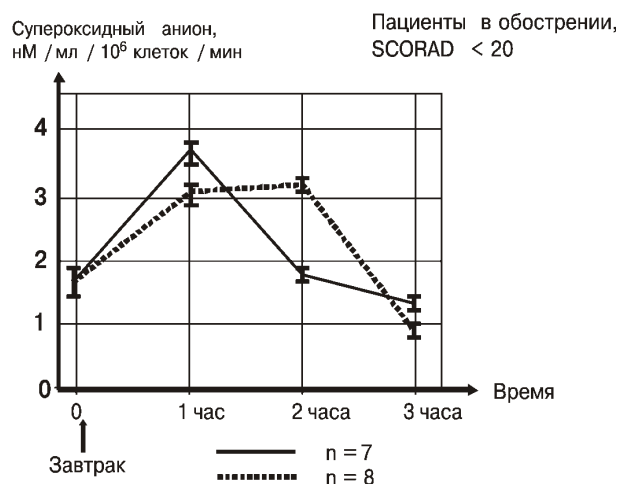


Рис. 4. Динамика генерации супероксидного аниона стимулированными форболовым эфиром нейтрофилами периферической крови больных atopическим дерматитом в стадии обострения с легким течением заболевания. Измерения проведены натощак и трижды с интервалом в час после приема стандартного завтрака.



Рис. 5. Динамика генерации супероксидного аниона стимулированными форболовым эфиром нейтрофилами периферической крови больных тяжелым atopическим дерматитом средней степени тяжести. Измерения проведены натощак и трижды с интервалом в час после приема стандартного завтрака.

цесса обострения наблюдается повышение уровня генерации супероксидного аниона по сравнению со здоровыми донорами. У больных с более выраженными клиническими признаками заболевания и контаминированных бактериальной инфекцией, генерация супероксидного аниона нейтрофилами была супрессирована и существенно изменена динамика активности клеток в ответ на физиологические воздействия.

Необходимо также учитывать тот факт, что при обострении atopического дерматита больные подвергаются психологическому стрессу, который обуславливает супрессию функциональной активности нейтрофилов [17, 18]. Острый ментальный стресс обуславливает снижение продукции супероксидного аниона нейтрофилами [19].

Заключение

В данной работе впервые изучена динамика активности нейтрофилов крови больных atopическим дерматитом в физиологических условиях после приёма стандартного завтрака. Эти исследования интересны не только с точки зрения сравнения показателей больных и здоровых людей, но также и для понимания естественных процессов, происходящих в организме. Все люди регулярно принимают пищу, макронутриенты и микронутриенты которой оказывают существенное влияние на активность клеток иммунной системы. Проведенными нами исследованиями установлено, что приём пищи оказывает разное действие на активность нейтрофилов больных и здоровых лиц. Следует подчеркнуть, что для этого эксперимента группы больных подбирались не рандомизировано, а только по идентичности таких показателей, как пол, возраст и метаболическая активность, чтобы минимизировать естественные колебания активности нейтрофилов. Даже при такой выборке имелись различия в пике концентрации супероксидного аниона, который у ряда здоровых доноров приходился на первый час после приёма завтрака, а у других лиц — на второй час. То есть у молодых здоровых людей активность нейтрофилов периферической крови достоверно различается.

Ещё в прошлом веке была установлена гетерогенность циркулирующих в кровяном русле нейтрофилов на основании электрического заряда на поверхности клеток и электрофоретической подвижности клеток. Наименее электронегативные клетки генерируют супероксид в 2 раза больше максимально электронегативных клеток [20]. То есть, различные субпопуляции нейтрофилов по-разному активированы у здоровых лиц и больных atopическим дерматитом.

Таким образом, показано изменение уровня генерации супероксидного аниона у больных atopическим дерматитом под действием fMLP и фторболового эфира PMA, а также установлена различная динамика выброса супероксида при активации нейтрофилов PMA, что отражает окислительный статус больных.

Выводы

1. Показано, что нейтрофилы больных atopическим дерматитом различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецептор-зависимую стимуляцию fMLP и в ответ на прямой активатор NADPH оксидазы — фторболмиристатацетат (PMA). fMLP оказывал до-

стоверно менее выраженный эффект по сравнению с PAM на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови.

2. Эффекты fMLP и PMA в отношении нейтрофилов больных и здоровых доноров показывают сходную тенденцию. У больных atopическим дерматитом легкой степени тяжести в начале периода обострения повышена генерация супероксидного аниона нейтрофилами в ответ на стимулы по сравнению со здоровыми донорами. У больных atopическим дерматитом средней тяжести генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно снижена ($P < 0, 05$).

3. Впервые изучена динамика активности нейтрофилов крови больных atopическим дерматитом в физиологических условиях после приёма стандартного завтрака. У больных atopическим дерматитом изменена кинетика активности нейтрофилов в ответ на стимулы при почасовом измерении генерации супероксидного аниона по сравнению со здоровыми донорами.

Список литературы

1. Елистратова И.В., Морозов С.Г., Захарова И.А. Экспрессия рецепторов PAR-2 на нейтрофилах периферической крови больных atopическим дерматитом и их связь с белками теплового шока HSP90, *Росс. Ж. Кож. Вен. Болезней*, 2016, (1): 53—57.
2. Suzuki Y., Lehrer R. NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate, *J. Clin. Invest.*, 1980, 66(6): 1409—1418.
3. Kuwabara W., Zhang L., Schuiki I., Curi R., Volchuk A., Alba-Loureiro T. NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species induces endoplasmic reticulum stress in neutrophil-like HL60 cells, *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116410.
4. Keshari R., Verma A., Barthwal M., Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils, *J. Cell. Biochem.*, 2013; 114(3): 532—540.
5. Liao H., Chien C., Chen J., Lee T., Lin S., Tseng C. The anti-inflammatory effect of 2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enyl-phenol by targeting Lyn kinase in human neutrophils, *Chem. Biol. Interact.*, 2015, 236: 90—101.
6. Black C., Samuni A., Cook J., Krishna C., Kaufman D., Malech H., Russo A. Kinetics of superoxide production by stimulated neutrophils, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, 286(1): 126—131.
7. Choy D., Hsu D., Seshasayee D., Fung M., Modrusan Z., Martin F. et al. Comparative transcriptomic analyses of atopical dermatitis and psoriasis reveal shared neutrophilic inflammation, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, 130(6): 1335—1343.
8. Dhingra N., Suarez-Farignas M., Fuentes-Duculan J., Gittler J., Shemer A., Raz A. et al. Attenuated neutrophil axis in atopical dermatitis compared to psoriasis reflects TH17 pathway differences between these diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, 132(2): 498—501.
9. Wolach B., Gavrieli R., Roos D., Berger-Achituv S. Lessons learned from phagocytic function studies in a large cohort of patients with recurrent infections, *J. Clin. Immunol.*, 2012, 32(3): 454—466.
10. Forte W., Guardian V., Mantovani P., Dionigi P., Menezes M. Evaluation of phagocytes in atopical dermatitis, *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*, 2009; 37(6): 302—308.
11. Fierro M., Banche G., Marengo F., Novelli M., Allizond V., Mandras N. et al. Functional and phenotypical impairment of polymorphonuclear cells in atopical dermatitis: an additional cause for the known susceptibility to infections? *Dermatology*, 2012, 224(4): 323—330.
12. Mrowietz U., Konter U., Traut R., Schroder J., Christophers E. Atopical dermatitis: influence of bacterial infections on human monocyte and neutrophil granulocyte functional activities, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1988; 82(6): 1027—1036.
13. Woodman R., Newburger P., Anklesaria P. et al. A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells, *Blood*, 1995; 85(1): 231—241.

14. Кандалова О.В., Таратутина Т.В., Мартынова Е.А. Сравнение спонтанного и церамид-индуцированного апоптоза в клетках кожи больных atopическим дерматитом, экземой и псориазом, Патогенез, 2012, 10(4): 60–65.

15. Dib K., Perecko T., Jenei V., McFarlane C., Comer D., Brown V. et al. The histamine H4 receptor is a potent inhibitor of adhesion-dependent degranulation in human neutrophils, J. Leukoc. Biol., 2014; 96(3): 411–418.

16. Karlsson J., Bylund J., Movitz C., Bjorkman L., Forsman H., Dahlgren C. A methodological approach to studies of desensitization of the formyl peptide receptor: Role of the read out system, reactive oxygen species and the specific agonist used to trigger neutrophils, J. Immunol. Methods., 2010; 352(1–2): 45–53.

17. De Benedetto A., Agnihothri R., McGirt L., Bankova L., Beck A. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? J. Invest. Dermatol., 2009, 129(1): 14–30.

18. Sadik C., Sezin T., Kim N. Leukotrienes orchestrating allergic skin inflammation, Exp. Dermatol., 2013, 22(11): 705–709.

19. Khanfer R., Phillips A., Carroll D., Lord J. Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress. Psychosom. Med., 2010, 72(7): 636–640.

20. Eggleton P., Fisher D., Crawford N. Heterogeneity in the circulating neutrophil pool: studies on subpopulations separated by continuous flow electrophoresis, J. Leukoc. Biol., 1992; 51(6): 617–625.

Послупила 01.10.2015

References

Received 01.10.2015

Superoxide anion releasing by neutrophils from young adult atopic dermatitis patients

Elistratova I.V.¹, Tarasova M.V.², Morozov S.G.²

¹ – The main military clinical hospital of internal troops of the MIA Russia, 143930, Balashikha, Nikol'sko-Archangelsky, 101 Sh. Vishnyakovskoe

² – Scientific research institute of the general pathology and pathophysiology, 125315, Moscow, 8 Baltiyskaya St.

The aim of this work was the investigation of superoxide anion generation by purified blood neutrophils obtained from young adult men with atopic dermatitis. Both, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) and receptor independent stimulation by phorbol myristate acetate (PMA) were used for NADPH oxidase stimulation and superoxide anion production. Both, fMLP and PMA have been found to slightly increase the superoxide production by neutrophils at the initial period of atopic dermatitis relapse (if index SCORAD was less than 20 points) compared with healthy donors. The superoxide anion generation by neutrophils have been found to be depressed at the moderate atopic dermatitis compared with donors and the mild atopic dermatitis patients. Also, the dynamic of neutrophil activity has been measured during three hours after breakfast feeding. The curve of this activity was considerably different between healthy donors and atopic dermatitis patients. At the moderate atopic dermatitis, superoxide production has been shown to be significantly suppressed compared with healthy donors and atopic patients with mild case of disease.

Key words: atopic dermatitis, neutrophils, superoxide anion, PMA, fMLP

Многоцветная флуоресцентная иммуногистохимическая окраска коры головного мозга человека*

Ефимова О.И.¹, Попов К.В.², Петренко Н.В.³, Анохин К.В.^{1,4}

¹ — Курчатowskiй комплекс НБИКС-технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатowskiй институт», 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

² — Ресурсный центр Нейрокогнитивных исследований Курчатowskiго комплекса НБИКС-технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатowskiй институт», 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

³ — Патологоанатомическое отделение Государственного бюджетного учреждения «Городская клиническая больница №12 Департамента здравоохранения г.Москвы», 115516, Россия, Москва, ул. Бакинская, д. 26

⁴ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Разработан способ многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски постмортальных образцов мозга человека, позволяющий визуализировать на одном срезе до пяти маркеров одновременно. В связи с тем, что основной трудностью флуоресцентной иммуногистохимии нервной ткани человека является высокая автофлуоресценция фона, вызванная формальдегидной фиксацией и флуоресценцией липофусциновых гликолипопротеидов, целью работы было минимизировать автофлуоресценцию и, одновременно, усилить иммуногистохимический сигнал молекулярных маркеров белков интереса. В работе представлены результаты мультифлуоресцентной иммуногистохимической окраски 30 мкм срезов префронтальной коры человека с использованием антител к AQP1, CHRNВ3, GFAP, визуализацией клеточных ядер и кровеносных сосудов. Показано, что мягкая формальдегидная фиксация и обработка 1% раствором судана черного В в 70% этиловом спирте, наряду с использованием растворов, блокирующих неспецифическое связывание антител, стрептавидиновых конъюгатов и AlexaFluor, снижают автофлуоресценцию фона, а использование вторичных и третичных систем детекции с флуоресцентными красителями AlexaFluor и стрептавидиновых конъюгатов усиливают специфический иммуногистохимический сигнал.

Ключевые слова: иммуногистохимия, флуоресценция, постмортальные образцы мозга человека, конфокальная микроскопия

Для исследования принципов организации мозга в норме и патологии необходима визуализация микроархитектуры его клеточных компонентов и особенностей их связей. Иммуногистохимическое окрашивание с помощью хромогенных систем детекции и методов широкопольной световой микроскопии не позволяет детально охарактеризовать фенотип клеток, экспрессирующих белок интереса. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия обладает улучшенной разрешающей способностью за счет апертуры, ограничивающей поток фонового рассеянного света, и позволяет регистрировать мультиспектральные изображения с высокой степенью разделения сигналов от разных флуорохромов, что критически необходимо для исследования колокализации различных маркеров [2]. Основной трудностью флуоресцентного иммуногистохимического окрашивания нервной ткани человека является высокая автофлуоресценция фона образца, вызванная формальдегидной фиксацией и флуоресценцией липофусциновых гликолипопротеидов в цитоплазме нейронов, которая может маскировать специфический сигнал [5].

Целью работы было разработать способ многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски постмортальных образцов мозга человека, позволяющий

минимизировать фоновую автофлуоресценцию ткани и, одновременно, усилить иммуногистохимический сигнал молекулярных маркеров белков интереса, а также валидировать разработанный метод на образцах префронтальной коры человека с одновременной визуализацией до пяти каналов флуоресценции на одном срезе.

Исследования проводили на постмортальных образцах левого полушария мозга человека ($n = 3$, мужчины, $74 \pm 4,58$ года, постмортальный интервал $13,67 \pm 1,75$ (mean \pm SD), без неврологических и психиатрических нарушений), предоставленных патологоанатомическим отделением ГКБ №12. Образцы мозга были вырезаны в соответствии с Атласом цитоархитектоники коры большого мозга человека [1], в локализованном месте цитоархитектонического поля 10 Бродмана. Препараты нарезали на блоки толщиной 10 мм и фиксировали в свежеприготовленном растворе 4% параформальдегида в 0,1M фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,4 при 4°C в течение 5 дней. Затем образцы промывали несколько раз в PBS и хранили в PBS с добавлением 0,01% азида натрия при 4°C до последующего использования. Из фиксированных 10 мм блоков с помощью вибрирующего микротомы Leica VT1200S изготавливали серийные срезы толщиной 30 мкм. Все операции со срезами проводили в 24-луночных куль-

* Работа выполнена в соответствии с планом НИЦ «Курчатowskiй институт» ГЗ 2015 г. по пункту 1.2 на оборудовании Ресурсного центра Нейрокогнитивных исследований Курчатowskiго комплекса НБИКС-технологий.

туральных планшетах с индивидуальными вставками в лунки, имеющими сетчатое дно (Savillex, 700-724), если не указано иначе.

Для демаскирования антигенов плавающие срезы помещали в микропробирки с 10 мМ цитратным буфером, рН 6.0, инкубировали их в термошейкере при 95°C 10 мин, и перекладывали во вставки культуральных планшетов, где промывали PBS с 0,5% Triton X-100 (0,5% PBST) три раза по 10 мин при комнатной температуре, перекладывая пинцетом вставки со срезами в лунки с новым раствором. Пермеабиллизацию и блокирование неспецифического связывания антител проводили в блокирующем буфере, содержащем 5% нормальную лошадиную сыворотку, 5% нормальную ослиную сыворотку и 5% нормальную козью сыворотку в 1% PBST в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере, отмывали 0,5% PBST три раза по 10 мин.

Реакцию со смесью первичных антител (1:500, см. табл. 1) проводили в 0,5% PBST, содержащем 5% нормальную лошадиную сыворотку, 5% нормальную ослиную сыворотку и 5% нормальную козью сыворотку, в течение 48 ч при 4°C на шейкере. После отмывки в 0,5% PBST и инкубации со вторичными биотинилированными антителами, сделанными в лошади против антител кролика в 0,5% PBST (1:250, см. табл. 2) в течение 2 ч при комнатной температуре срезы промывали в 0,5% PBST и с помощью реагента Image-iT FX Signal Enhancer (Molecular Probes) блокировали неспецифическое связывание флуоресцентных конъюгатов AlexaFluor в течение 30 мин при комнатной температуре. Срезы отмывали в 0,5% PBST и инкубировали в смеси антител с флуоресцентной меткой — антителами против мыши, сделанными в осле, конъюгированными с зеленым флуоресцентным красителем AlexaFluor488, антителами против курицы, сделанными в козе, конъюгированными

ми с красным флуоресцентным красителем AlexaFluor568, и стрептавидином, конъюгированным с дальним красным флуоресцентным красителем AlexaFluor647 (1:500—1:1000, см. табл. 2) в течение 16—18 ч при 4°C, затем срезы отмывали в PBS.

Для блокирования автофлуоресценции липофусцина срезы помещали в 1% раствор судана черного В в 70% этаноле на 10 мин [6], затем промывали три раза по 10 мин в PBS. Окрашенные срезы приклеивали на предметные стекла, оставляли на 5 мин на воздухе, наносили заливку для флуоресцентных препаратов на водной основе Fluoromount (Sigma), в которую предварительно добавляли флуоресцентный ядерный краситель DAPI (0.5 мкг/мл, Molecular probes), покрывали срезы покровными стеклами и герметизировали их прозрачным лаком.

Контроль специфичности связывания антител проводили методом пропуска первичных и/или вторичных антител. Контроль неспецифического связывания стрептавидина проводили с использованием набора Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Lab). За исключением автофлуоресценции крови в сосудах постмортальной ткани, видимой в синем и зеленом каналах, на всех контрольных микропрепаратах отсутствовало неспецифическое окрашивание.

Изображения микропрепаратов получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FluoView10i с использованием водно-иммерсионного объектива UPLSAPO 60X с числовой апертурой 1.20. Съемку проводили последовательно в разных каналах, чтобы избежать неспецифической засветки из других каналов: DAPI, AlexaFluor488, AlexaFluor568, AlexaFluor647 и фазовый контраст. Совмещение и анализ изображений проводили с помощью компьютерного обеспечения Imaris 7.2.3 (Bitplane).

Таблица 1

Первичные антитела, использованные для мультифлуоресцентной иммуногистохимии

№	Наименование	Хозяин	Клональность	Титр	Производитель, кат. №
1	Антитела к AQP1	Мышь	Моноклональные	1:500	Santa Cruz, sc-55466
2	Антитела к CHRNB3	Кролик	Поликлональные	1:500	Novus Biologicals, NBP1-91783
3	Антитела к GFAP	Курица	Поликлональные	1:500	Abcam, ab134436

Таблица 2

Вторичные антитела и красители, использованные для мультифлуоресцентной иммуногистохимии

№	Наименование	Хозяин	Конъюгат	Титр	Производитель, кат. №
1	Антитела к иммуноглобулинам IgG мыши	Осел	AlexaFluor488	1:1000	Molecular Probes, A-21202
2	Антитела к иммуноглобулинам IgG кролика	Лошадь	Биотин	1:250	Vector Labs, BA-1100
3	Антитела к иммуноглобулинам IgY курицы	Коза	AlexaFluor568	1:1000	Molecular Probes, A-11041
4	Стрептавидин		AlexaFluor647	1:500	Molecular Probes, S-21374
5	DAPI			1:500	Molecular Probes, D1306

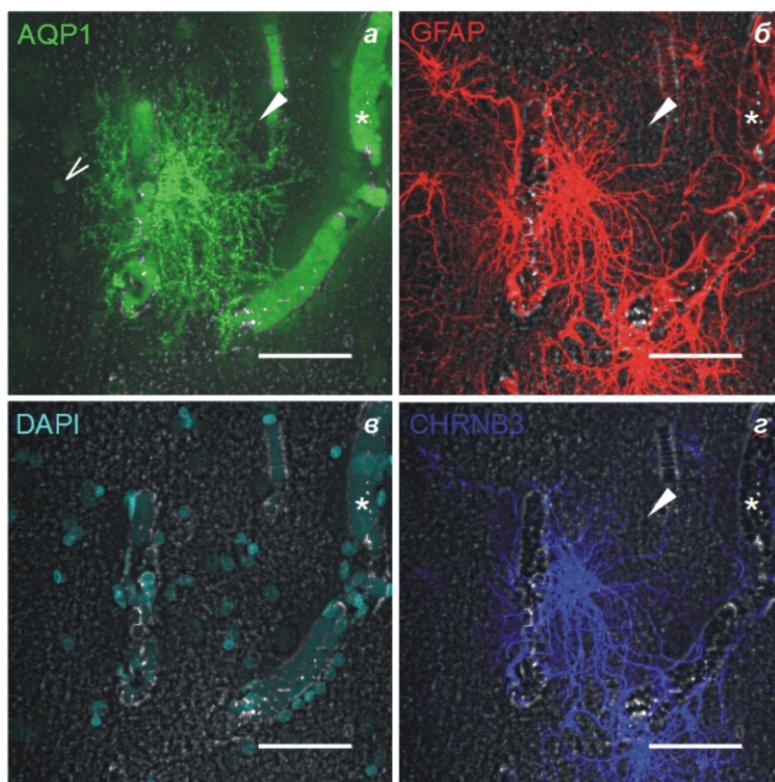


Рис. 1. Флуоресцентная иммуногистохимическая окраска префронтальной коры человека: *а* – антитела к аквапорину 1 (AQP1); *б* – антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP); *в* – флуоресцентная окраска ядер DAPI; *г* – антитела к никотиновому ацетилхолиновому рецептору $\beta 3$ (CHRNB3). Шкала – 50 мкм. Серый фон – изображение среза в режиме фазового контраста. Звездочкой обозначена автофлуоресценция одного из кровеносных сосудов. Залитая стрелка указывает на иммунореактивность в цитоплазме и отростках некоторых клеток. Открытая стрелка показывает на слабую иммунореактивность в ядрах некоторых клеток.

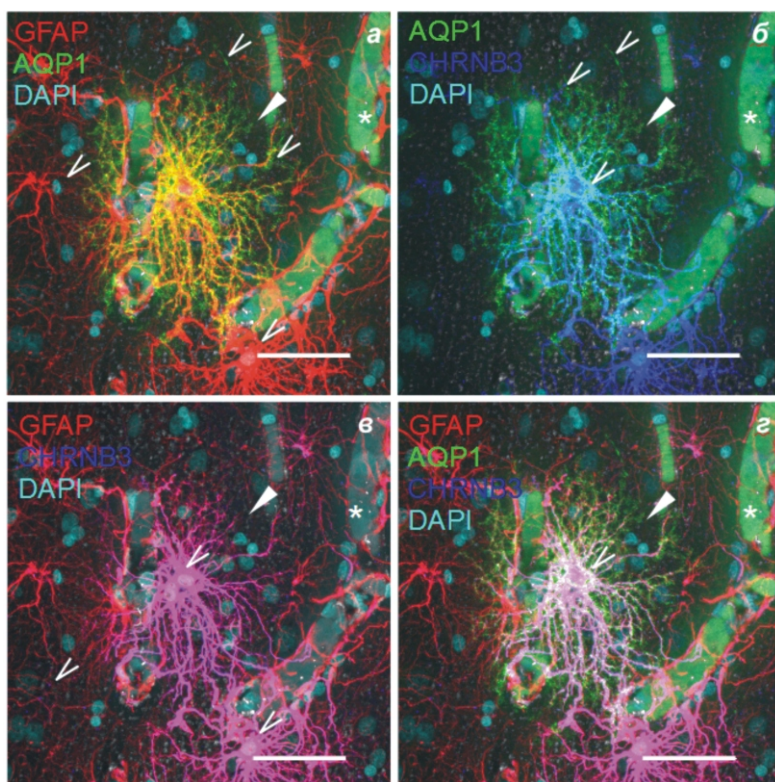


Рис. 2. Колокализация многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски префронтальной коры человека: *а* – наложение изображений окраски антителами к аквапорину 1 (AQP1) и маркеру астроцитов (GFAP); *б* – наложение изображений окраски антителами к AQP1 и никотиновому ацетилхолиновому рецептору $\beta 3$ (CHRNB3); *в* – наложение изображений окраски антителами к CHRNB3 и GFAP; *г* – наложение изображений окраски антителами к AQP1, CHRNB3 и GFAP. Шкала – 50 мкм. DAPI – флуоресцентная окраска ядер, серый фон – изображение среза в режиме фазового контраста. Звездочкой обозначена автофлуоресценция одного из кровеносных сосудов. Залитая стрелка указывает на астроцитарную локализацию иммунореактивности к AQP1 и CHRNB3. Открытые стрелки показывают особенности экспрессии AQP1, CHRNB3 и GFAP.

Валидацию разработанного способа мультифлуоресцентной иммуногистохимической окраски проводили на срезах префронтальной коры человека с использованием антител к аквапорину 1 (AQP1), никотиновому ацетилхолиновому рецептору $\beta 3$ (CHRNВ3), глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) — маркеру астроцитов, а также с одновременной визуализацией клеточных ядер и кровеносных сосудов. Выбор антител к AQP1 и CHRNВ3 представлял дополнительную актуальность в связи с тем, что функции и паттерны экспрессии AQP1 и CHRNВ3 в мозге человека очень мало изучены, хотя их мутации у человека связаны с развитием нейропатологий [3, 4].

Флуоресцентная иммуногистохимическая окраска показала, что белки AQP1 и CHRNВ3 экспрессируются в цитоплазме и отростках субпопуляции клеток префронтальной коры человека (рис. 1а и 1б соответственно). Отростки этих клеток ассоциированы с кровеносными сосудами, выявляемыми по автофлуоресценции крови и изображению среза в фазовом контрасте (рис. 1а, 1б, 1г). Слабая иммунореактивность к AQP1 наблюдалась также в ядрах некоторых клеток (рис. 1а, 1б, 1в).

Колокализацию многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски префронтальной коры человека анализировали после наложения изображений, полученных в разных каналах. Методом наложения было показано, что AQP1 и CHRNВ3 экспрессируются в некоторых GFAP+ астроцитах (рис. 2а, 2б). Экспрессия AQP1 наблюдалась преимущественно в проксимальных отростках астроцитов и имела субклеточную локализацию, отличную от CHRNВ3. Обнаружены отдельные субпопуляции астроцитов, экспрессирующие CHRNВ3 и экспрессирующие AQP1 и CHRNВ3 (рис. 2б, 2в, 2г). Полученные результаты указывают на специфический характер локализации AQP1 и CHRNВ3 в астроцитах и требуют дальнейших исследований выявленных субпопуляций астроцитов в норме и при патологии.

Таким образом, мягкая формальдегидная фиксация и обработка 1% раствором судана черного В в 70% этиловом спирте, наряду с использованием растворов, блокирующих неспецифическое связывание антител, стрептавидиновых конъюгатов и AlexaFluor, эффективно снижают фоновую автофлуоресценцию образцов коры головного мозга человека, а использование вторичных и третичных систем детекции с флуоресцентными красителями AlexaFluor и стрептавидиновых конъюгатов усиливают специфический иммуногистохимический сигнал. Разработанный способ многоцветной флуоресцентной иммуногистохимической окраски образцов коры головного мозга может быть использован для детальной визуализации микроархитектуры нервной ткани человека в норме и патологии.

Список литературы

1. Саркисов С.А., Филимонов И.Н., Кононова Е.П. и др. Атлас цитоархитектоники коры большого мозга человека. — М.: Медгиз., 1955. — 280 с.
2. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биологической химии. — 2007. — Т. 47. — С. 371—410.
3. Badaut J., Fukuda A.M., Jullienne A., Petry K.G. Aquaporin and brain diseases // Biochim Biophys Acta. — 2014. — Vol. 1840. — №5. — P. 1554—65.
4. Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Gan-Or Z, Giladi E, Giladi N, Orr-Urtreger A. CHRNВ3 c.-57A>G functional promoter change affects Parkinson's disease and smoking // Neurobiol Aging. — 2014. — Vol. 35. — №9. — P. 2179.e1-6.
5. Diez-Fraile A., Van Hecke N., Guerin C.J., D'Herde K. Optimizing multiple immunostaining of neural tissue: Applications of immunocytochemistry // InTech Publishing. — 2012. — P. 29—48.
6. Schnell S.A., Staines W.A., Wessendorf M.W. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue // J Histochem Cytochem. 1999. — Vol. 47. — № 6. — P. 719—30.

Получена 12.10.2015

Received 12.10.2015

Multicolor fluorescence immunohistochemistry of human prefrontal cortex

Efimova O.I.¹, Popov K.V.², Petrenko N.V.³, Anokhin K.V.^{1,4}

¹ — Kurchatov complex of NBICS-technologies, National research centre «Kurchatov Institute», 123182, Russia, Moscow, Akademika Kurchatova sq., 1

² — Resource centre of Neurocognitive research, Kurchatov complex of NBICS-technologies, National research centre «Kurchatov Institute», 123182 Russia, Moscow, Akademika Kurchatova sq., 1

³ — Department of Pathologoanatomy, State Budgetary Healthcare Institution of Moscow «City Clinical Hospital №12», 115516, Russia, Moscow, Bakinskaya str., 26.

⁴ — P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, 125315 Russia Moscow, Baltiyskaya str, 8.

Multicolor fluorescence immunohistochemistry on human postmortal brain samples was optimized to allow simultaneous imaging of more than five markers on one section. The main difficulty of fluorescence immunohistochemistry on human nervous tissue is its high background autofluorescence due to formaldehyde fixation and lipofuscin glycolipoprotein fluorescence. We aimed to minimize background autofluorescence and, simultaneously, enhance signal from molecular markers of the proteins of interest. Here we present the results of multicolor fluorescence immunohistochemistry on 30 mkm sections of human prefrontal cortex stained with antibodies against AQP1, CHRNВ3, GFAP and cellular nuclei and blood vessels imaging. We demonstrated, that mild formaldehyde fixation and treatment with 1% Sudan black B in 70% ethanol together with blocking steps, preventing unspecific binding of antibodies, streptavidin conjugates and AlexaFluor, decreased background fluorescence, and application of secondary / tertiary detection systems with AlexaFluor / streptavidin conjugates enhanced specific immunohistochemical signal.

Keywords: immunohistochemistry, fluorescence, postmortal human brain samples, confocal microscopy

Регистрация изотипического состава иммунных комплексов как новая диагностическая процедура

Ланда С.Б.¹, Иванов А.В.², Комличенко Е.В.², Филатов М.В.¹

¹ — Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»
Гатчина, Россия; e-mail: fil_53@mail.ru

² — Клиника Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

В работе предложен новый подход анализа циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), образующихся в гетерогенных биологических жидкостях. Метод основан на анализе вклада иммунных комплексов в светорассеяние, регистрируемое с помощью спектрометра динамического светорассеяния с гетеродинамической схемой измерения [4]. Предлагаемый подход способен регистрировать иммунные комплексы, образующиеся при добавлении антигена в концентрации, превышающей 50 пг в мл. Увеличение размера иммунных комплексов за счет их дальнейшей агрегации с помощью антител, специфичных для различных иммуноглобулинов человека позволяет определять изотипический состав и гетерогенность комплексов.

Ключевые слова: динамическое светорассеяние, распределение частиц по размерам, циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), изотипы иммуноглобулинов

Введение

Многочисленные аллергические, аутоиммунные и инфекционные заболевания, сопровождаются появлением циркулирующих в плазме крови иммунных комплексов (ЦИК). Данные об их концентрации могут служить основой для прогноза развития патологии [1]. ЦИК, или комплексы антиген-антитело — макромолекулярные структуры, образующиеся в результате специфического взаимодействия антигенов с бивалентными и мультивалентными антителами. При их эквивалентных соотношениях или при умеренном избытке антигена формируются крупные молекулярные образования, состоящие из множества частиц антигена и молекул антител. Образование и удаление ЦИК представляет собой естественную часть иммунного ответа, обеспечивающее защитные потребности организма. В то же время, образование ЦИК может приводить к развитию патологических анафилактических реакций [1]. Выявление ЦИК, и идентификация антигенов в их составе — является актуальной проблемой, решение которой в дальнейшем будет способствовать развитию диагностических подходов и выработке стратегий лечения инфекций, аллергических и аутоиммунных заболеваний.

Существует значительное разнообразие методов регистрации иммунных комплексов, возникающих в плазме крови и других биологических жидкостях. Недостатком данных методов является значительная сложность в исполнении и большое количество преаналитических этапов, большое разнообразие и высокая стоимость расходных материалов, надежность анализа. Поэтому ВОЗ рекомендует использовать не менее двух тестов, которые основаны на различных иммунологических свойствах ЦИК [2]. К сожалению, все эти методы предполагают разделение макромолекулярных систем на компоненты. Необходимы поиски альтернативных путей исследования биологических агрегатов, позволяющих изучать структурно-функциональные особенности организации нативных комплексов.

Нам представляется, что наиболее перспективным методом для решения таких задач является метод динамического светорассеяния (ДСР), [3] позволяющий без внесения внешних возмущающих воздействий получать информацию о распределении частиц по размерам в поли-

дисперсных растворах, каковыми и являются биологические жидкости [4]. Уникальность метода ДСР заключается в том, что он может регистрировать образование макромолекулярных комплексов в сложных биологических системах, не прибегая к фракционированию или каким либо другим процедурам, нарушающим нативные условия, в которых происходит образование комплексов и, таким образом, получать более достоверную информацию. Радикальное увеличение светорассеяния с увеличением линейных размеров макромолекулярных образований в сочетании с возможностью оценивать их реальные размеры, позволяет регистрировать и идентифицировать образование комплексов различными компонентами биологических жидкостей, даже когда возникающее их количество очень невелико. Ранее нами было показано, что обычно размер иммунных комплексов колеблется в среднем от 100 до 300 нм [6]. Более крупные комплексы размером до 1000 нм можно получить, используя специальные подходы. Более подробно на этом вопросе мы остановимся ниже.

В данной работе мы попытаемся продемонстрировать возможности ДСР для идентификации иммунных комплексов в плазме периферической крови.

Материалы и методы

Применяемые антигены

В качестве антигенов в данном исследовании мы применяли как стандартные аллергены производства ФГУП НПО «Микроген», Россия с исходной концентрацией 10000 PNU, чистые химические соединения (Например циклоцитрулин) в конечной концентрации 1 мкг/мл.

Подготовка образцов крови для анализа методом ДСР

Для исследования использовали плазму крови, полученную в течение предшествующих суток путем стандартного взятия венозной крови у доноров. Забор крови проводили строго натощак. Получение плазмы крови осуществляли общепринятым методом [5]. В качестве антикоагулянта использовался гепарин в конечной концентрации 50 ед. на мл.

Плазма получалась путем удаления форменных элементов крови центрифугированием при 1500G в течение 15 мин. Супернатант отбирали и для осаждения тромбоцитов и продуктов распада клеточных элементов 1 мл центрифугировали 30 мин при 12000g. Затем образец разбавляли в 3 раза стандартным изотоничным фосфатным буфером (pH 7,2) с ионной силой, соответствующей ионной силе физиологического раствора (150 мМ NaCl), содержащим 10мМ ЭДТА. Непосредственно перед проведением измерений образцы фильтровали сначала через 0.22 μ M PVDF фильтр (Ref. № Millex-GV SLGV013SL) для префильтрации, а затем через 0.10 μ M Omnipore JV фильтр (Ref. № Millipore JWVP 01300).

Отфильтрованный образец делили на аликвоты объемом 0.18 мл по количеству исследуемых антигенов + 1 аликвота (без добавления антигена) в качестве контроля. К исследуемым аликвотам добавляли по 200 PNU мл антигена, тщательно перемешивали, и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре.

Измерения проводили на лазерном корреляционном спектрометре — «ПЛСС» производства «ООО ИНТОКС МЕД» (Регистрационное удостоверение на медицинское изделие МЗ РФ № РЗН 2014/1650 от 09 июня 2014 г.). Измерения и расчет размеров частиц в образцах биологических жидкостей проводили согласно методикам и программным продуктам, описанным ранее [7]. Результат измерений представляется в виде гистограммы распределения частиц по размерам (PSD), в которой ось абсцисс — шкала размеров в нанометрах, а по оси ординат отложен вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах. При этом суммарное рассеяние всех частиц образца принимается за 100%. Для каждого образца измерения проводили не менее 3 раз, и данные, полученные в результате регуляризации, усредняли. Это позволило получить среднее и дисперсию размера и вклада в рассеяние для каждой фракции частиц, имеющихся в измеряемом образце. О положительной реакции на антиген свидетельствовало отсутствие в исходной плазме частиц с Rh крупнее 100 нм, и появление таких частиц после воздействия антигена.

Результаты и обсуждение

Как показали наши предыдущие исследования, гидродинамический радиус ИК лежит в диапазоне 100–250 нм [6]. Частицы такого размера легко могут быть зарегистрированы в плазме крови методом ДСР. Концентрационная чувствительность метода составляла порядка 50 пикограмм антигена/мл. Такого типа частицы могут быть удалены фильтрованием через фильтр с размером пор 100 нм, например 0.10 μ M Omnipore JV.

Если к фильтрованной плазме, в которой содержатся связывающие какой-либо антиген антитела, добавить небольшое количество данного антигена, то *de novo* произойдет образование ЦИК, содержащих данный антиген, и специфичные к нему иммуноглобулины. При этом, если молекулярный вес этого агента и его количество невысоки, то вносимый им самим вклад в динамическое рассеяние образцов плазмы крови будет пренебрежимо мал по сравнению с вкладом остальных частиц плазмы и никак не скажется на полученной гистограмме. Наиболее убедительно данное утверждение может быть проиллюстрировано на примере аллергической реакции организма на природные аллергены: пищевые, растительные, бытовые и т.д. Подобные реакции

на уровне организма вызывают ряд широко известных симптомов, при наличии которых пациенту ставится диагноз аллергии на тот или иной антиген. Чаще всего для этого используется кожный скарификационный тест и определение титра свободно циркулирующего иммуноглобулина Е в плазме крови. С помощью динамического светорассеяния мы определили содержание ЦИК в плазме ряда пациентов с ярко выраженной аллергической реакцией на различные аллергены. Наиболее яркий пример описан ниже.

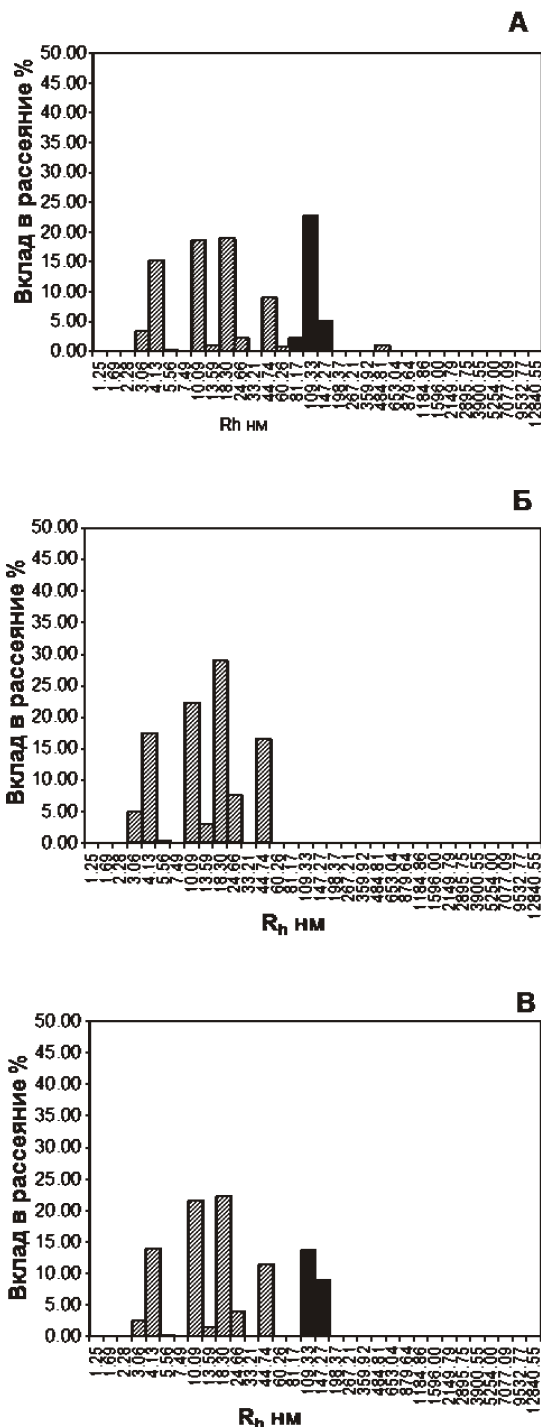


Рис. 1. Гистограммы распределения частиц по размерам исходной плазмы (А), плазмы, фильтрованной через фильтр 0.10 μ M Omnipore JV с диаметром пор 100 нм, (Б) и фильтрованной плазмы после добавления стандартного аллергена домашней пыли. По оси X — гидродинамический радиус частиц в нм, по оси Y — вклад в рассеяние в %.

Пациент Б. 52 года. Диагноз: аллергический риноконъюнктивит средней тяжести. Симптомы: отек слизистой носа, кашель, зуд. Скарификационный тест со стандартным аллергеном домашней пыли — положительный. Общий IgE — 560 кЕ/л.

Перед исследованием плазму крови пациента разводили в 3 раза изотоническим фосфатным буфером pH 7,2 с добавлением натриевой соли ЭДТА (10 mM) и фильтровали через фильтр 0.10 µM Omnipore JV с диаметром пор 100 нм. Данная процедура позволяла убрать все частицы с R_n более 50 нм, в том числе и крупные иммунные комплексы. Измерения проводили по стандартной процедуре. Как видно рис. 1, на котором приведены гистограммы распределения частиц по размерам (PSD) число таких частиц падает с 30 % в исходном образце плазмы (рис. 1 А) до нуля (рис. 1 Б). Добавление к 0.2 мл образца 200 единиц PNU стандартного аллергена домашней пыли вызывает образование крупных иммунных комплексов с R_n более 100 нм, вклад в рассеяние которых составляет более 20%. (рис. 1 В). На данном основании может быть подтверждено наличие у пациента аллергии на домашнюю пыль.

Приведенный пример не является единственным. В табл. 1 приведены данные исследований образования ЦИК у 25 чел., 15 из которых страдают тем или иным видом аллергии, а 10 обозначены нами как здоровые. Это не значит, что данные пациенты не страдают теми или иными заболеваниями, а означает только то, что у них в анамнезе отсутствует диагноз аллергии. Мы исследовали процесс образования ЦИК в плазме крови данных пациентов (строки таблицы) на 4 пищевых, 2 растительных и 5 бытовых аллергенов (столбцы таблицы). В ячейках таблице приведены величины вклада в рассеяние частиц с R_n от 70 до 500 нм. Если данные в ячейке таблицы отсутствуют, значит исследование реакции на данный аллерген у данного пациента не проводилось.

Как видно из данных таблицы, у пациентов с выраженной аллергией наблюдается образование иммунных комплексов в ответ на действие одного или нескольких исследованных аллергенов. Выраженность реакции организма пациента на тот или иной аллерген может сильно варьировать. (По приведенным в таблице данным вклад ЦИК в рассеяние может колебаться от 0% до 25%). Эмпирически выраженную реакцию мы определяем, когда

Таблица 1

**Образование иммунных комплексов
в плазме пациентов с различными аллергиями и без выраженных аллергических реакций
в ответ на добавление некоторых широко распространенных аллергенов в концентрации 200 PNU/мл**

	ID	Пищевые				Растительные		Бытовые				
		Говядина	Свинина	Цельное яйцо	Микс цитрусовые	Микс пыльцы деревьев	Пыльца амброзии	Шерсть кошки	Шерсть собаки	Перо подушек	Домашняя пыль	ДСП
Аллергии	A-1	2,9	6,3	5,1	16,6		2,3	9,8		2,4	0,0	8,0
	A-2					10,2		4,3	2,3	4,4	3,9	5,0
	A-3							7,4	8,4			
	A-4								7,9			
	A-5										16,3	
	A-6					9,2		6,3			4,5	
	A-7						12,4					14,4
	A-8					25,0						
	A-9					11,9						
	A-10								8,3		7,1	
	A-11	0,0	0,0	0,0	0,0	7,8	5,5	1,3		0,0	1,4	1,1
	A-12					0,0		0,4		1,2	6,4	1,9
	A-13										7,7	
	A-14	0,0	0,0	8,1	0,0	11,8		1,7	3,0	8,0	2,8	1,4
	A-15	0		1,2	1,2	0	0	1,3	0	0,7	3,4	0
Здоровые	З-1	0,0	0,0	0,0	0,0							
	З-2							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	З-3						0,0	0,0	0,0		0,0	
	З-4	0,0	0,0	0,0	0,0							
	З-5					0,0						
	З-6					0,0						
	З-7	0,0	0,0	0,0	0,0			0,0			0,0	0,0
	З-8							0,0				
	З-9							0,0	0,0		0,0	
	З-10							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

вклад в рассеяние данных частиц превышает 5%. Отрицательная реакция на аллерген — полное отсутствие образования ЦИК при добавлении в плазму аллергена (вклад в рассеяние 0%). В случае, если вклад в рассеяние ЦИК составляет менее 5% (но не 0%) реакция считается слабой. Как видно из приведенных в таблице данных у всех пациентов с аллергическими расстройствами имеется как минимум один аллерген, вызывающий выраженную реакцию. В то же время у условно здоровых людей реакции образования иммунных комплексов на все исследованные аллергены никогда не наблюдается (даже слабой). Таким образом, мы показали, что метод динамического светорассеяния может быть использован для диагностики аллергий и скрининга наиболее значимых для данного пациента аллергенов.

В тех случаях, когда для конкретного заболевания известен маркерный антиген, как в случае ревматоидного артрита — циклоцитрулин он с успехом может быть использован в качестве инициатора образования ЦИК, специфичных для данной патологии. При этом информация об изотипическом составе данных ЦИК представляет зна-

чительный интерес для диагностики и контроля тяжести течения заболевания. Данное положение иллюстрируется следующим примером.

Пациент К. 49 лет. Диагноз — ревматоидный артрит. Целью исследования было зафиксировать изменения в изотипическом составе ИК на фоне проведения терапевтического лечения. В качестве стандартного антигена использовали раствор циклоцитрулина в конечной концентрации 1 мкг/мл. Образцы плазмы готовили как описано выше, с тем отличием, что кроме циклоцитрулина к образцам добавляли по 20 мкл моноклональных антител к человеческим иммуноглобулинам различных изотипов, как в чистом виде, так и в различных сочетаниях. В данном случае, в образцы фильтрованной плазмы с циклоцитрулином добавляли антитела к иммуноглобулинам IgG1, IgG3, IgG4, IgE и смеси антител к IgG1 и антител к IgG3, антител к IgG1 и антител к IgE, антител к IgG3 и антител к IgE.

На рис. 2 выборочно представлены только наиболее характерные варианты распределения частиц по размерам. Как видно из приведенных распределений в филь-

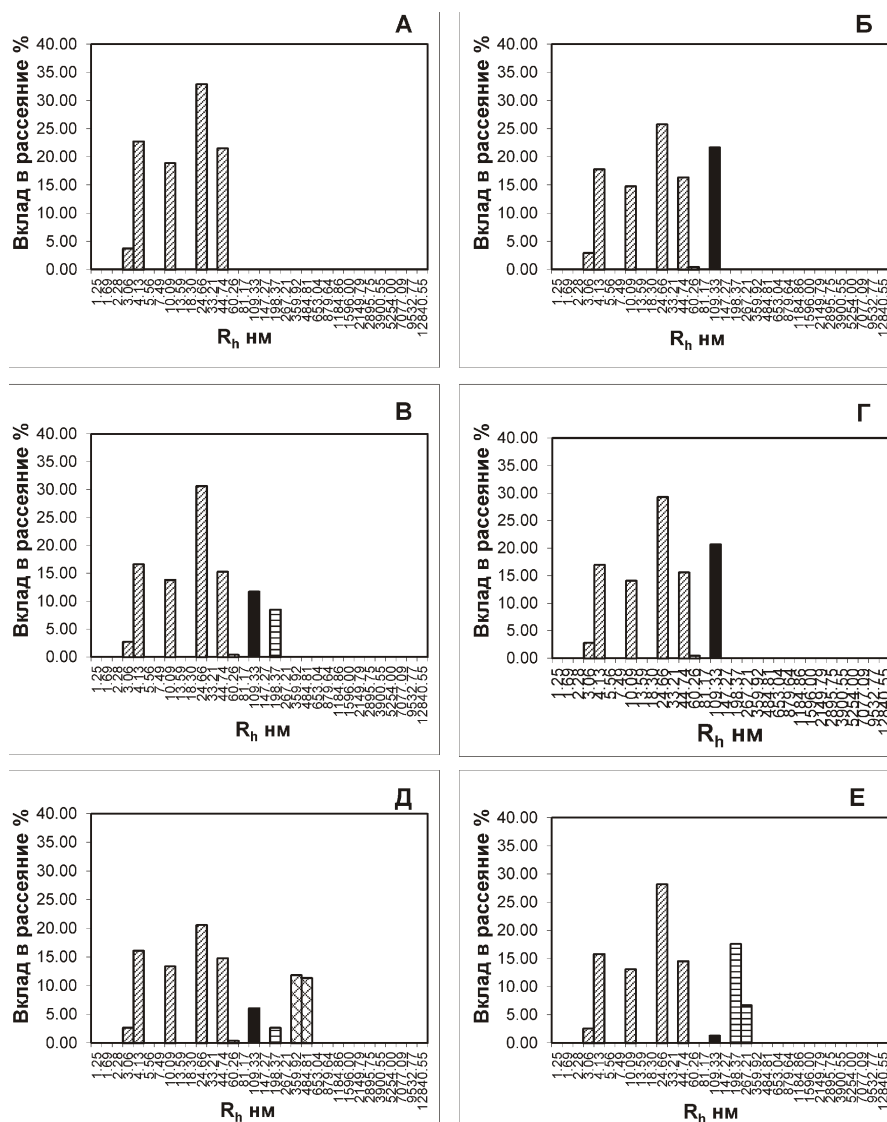


Рис. 2. Гистограммы распределения частиц по размерам фильтрованной плазмы (А), той же плазмы после добавления циклоцитрулина (Б), циклоцитрулина и антителами к IgG3 (В), циклоцитрулина и смеси антител к IgG1 и IgG3 (Г) и циклоцитрулина и смеси антител к IgG3 и IgE (Д). По оси X — гидродинамический радиус частиц в нм, по оси Y — вклад в рассеяние в %.

Изменение изотипического состава иммунных комплексов у пациента в процессе лечения

№	Образец	Вклад в рассеяние ИК, %				
		При поступлении	1 срок	2 срок	3 срок	4 срок
1	Исходная плазма	19,8	10,1	19,4	13,8	14,5
2	Фильтрованная плазма	0	0	0	0	0
3	ЦиклоЦитрулин	9,4	5,8	13,0	11,4	7,8
4	Анти IgG1	0	0	0	4,5	7,6
5	Анти IgG2	—	—	—	—	—
6	Анти IgG3	9,3	5,6	12,2	8,6	4,2
7	Анти IgG4	0	0	0	0	0
8	Анти IgA	0	0	0	0	0
9	Анти IgE	0	0	3,4	3,6	2,8
10	Анти IgG1 + Анти IgG3	—	—	—	5,7 Мераагpp.	8,9 Мераагpp.
11	Анти IgG1 + Анти IgE	—	—	—	8,5 Аггр.	3,6 Мераагpp.
12	Анти IgG3 + Анти IgE	—	—	—	13,0 Аггр.	7,7 Аггр.

трованной плазме пациента отсутствуют частицы с R_h более 50 нм (рис. 2 А). После добавления к данной плазме циклоцитрулина происходит образование иммунных комплексов, о чем свидетельствует появление пика на гистограмме с R_h порядка 100 нм (рис. 2 Б — данный пик обозначен черным цветом). Если образовавшиеся иммунные комплексы содержат иммуноглобулины интересующего нас изотипа, (в данном конкретном случае IgG3 — рис. 2 В) на гистограмме появляется еще один пик с большим R_h , порядка 200 нм (горизонтальная штриховка пика). Вклад данных частиц в рассеяние позволяет примерно оценить долю иммуноглобулинов данного изотипа в общем пуле иммуноглобулинов. Однако эта оценка не может быть строго количественной в силу сильной нелинейности зависимости вклада в рассеяние частиц от их размера. В случае, если иммуноглобулины определенного изотипа (в данном конкретном случае IgG4) в иммунных комплексах отсутствуют нового пика на гистограмме не появляется (рис. 2 Г).

В случае использования смесей антител к различным иммуноглобулинам картина носит еще более сложный характер. Если иммунные комплексы гомогенны по своему составу, при добавлении смеси антител мы будем иметь картину, сходную с описанной выше (рис. 2 Е) Отличия от гистограммы на рис. 2 В заключаются в заметно большем вкладе в рассеяние крупных агрегатов, так как они образуются из иммунных комплексов, содержащих иммуноглобулины обоих изотипов. Если иммунные комплексы гетерогенны, и содержат иммуноглобулины обоих изотипов, происходит образование еще более крупных мегаагрегатов с R_h порядка 400 нм (рис. 2 Д) (крестообразная штриховка пика). В силу упомянутой выше нелинейности зависимости вклада в рассеяние от размера частиц, в данном случае мы можем только зафиксировать гетерогенность комплексов, но не можем ничего сказать о доле таких гетерогенных ИК в общем пуле. Пик с R_h порядка 100 нм в этом случае характеризует иммунные комплексы, не содержащие иммуноглобулины, антитела к которым добавлены в образец. После анализа данных по всем вариантам можно сделать заключение, что в данном конкретном случае, ЦИК, содержащие иммуноглобулины изотипов IgG3 и IgG1 образуют гетерогенные иммунные

комплексы, а иммунные комплексы, содержащие иммуноглобулин изотипа IgE — гомогенны. Содержание иммуноглобулинов остальных изотипов находится на уровне ошибки определения (вклад в рассеяние таких ЦИК менее 1%).

Мы проследили изменение изотипического состава иммунных комплексов у данного пациента в процессе лечения, которое проводилось в клинике СПбГУ. Изменение изотипического состава иммунных комплексов у данного пациента в процессе лечения представлено в табл. 2. Из данных таблицы видно, что изотипический состав ЦИК в процессе лечения претерпевает существенные изменения: если на вначале (1 срок) картина не отличается от исходной и в плазме пациента содержатся иммунные комплексы образованные исключительно иммуноглобулинами типа IgG3, то начиная со 2 срока в составе иммунных комплексов появляются иммуноглобулины типа IgE. Начиная с 3 срока, в составе иммунных комплексов появляются иммуноглобулины типа IgG1, при этом он образует гетерогенные комплексы с иммуноглобулином IgG3. Комплексы, содержащие иммуноглобулин IgE остаются однородными. На последнем сроке иммуноглобулин IgG1 становится основным в составе иммунных комплексов.

Приведенные данные показывают, что метод динамического рассеяния с успехом может использоваться для обнаружения и исследования изотипического состава иммунных комплексов, образующихся в плазме крови под действием различных антигенов. На основании данного метода могут быть разработаны методы диагностики и контроля эффективности применяемых методов терапии различных аллергических расстройств и аутоиммунных заболеваний.

Список литературы

1. Ohyama K., Ueki Y., Kawakami A., Kishikawa N., Tamai M., Osaki M., Kamihira S., Nakashima K., Kuroda N. Immune complex analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis // J. Clin Chem. — 2011. — Vol. 57, № 6. — P. 905—599.
2. Lambert P.H., Dixon F.J., Zubler R.H., Agnello V., Cambiaso C., Casali P. et al. A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum // J. Clin. Lab. Immunol. — 1978. — Vol. 1. — P. 1—15.

3. Cohen R.J., Benedek G.B. Immunoassay by light scattering spectroscopy // *Immunochemistry*. — 1975. — Vol. 12. — P. 349–351.

4. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostic // *Appl. Opt.* — 1997. — Vol. 36. — P. 7518–7522.

5. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.

6. Кораблев П.В., Ланда С.Б., Семенова Е.В., Филатов М.В. Динамическое светорассеяние — простой и чувствительный метод, позволяющий определять появление иммунных комплексов в биологических жидкостях // *Биопрепараты*. — 2015. — Т. 54, № 2. — С. 53–58.

7. Ланда С.Б., Филатов М.В., Арутюнян А.В., Варфоломеева Е.В. Исследование образования мегамолекулярных комплексов в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии // *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2008. — № 4. — С. 37–41.

Поступила 22.09.2015

References

1. Ohyama K., Ueki Y., Kawakami A., Kishikawa N., Tamai M., Osaki M., Kamihira S., Nakashima K., Kuroda N. Immune comple-

xome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis // *J. Clin. Chem.* — 2011. — Vol. 57, № 6. — P. 905–599.

2. Lambert P.H., Dixon F.J., Zubler R.H., Agnello V., Cambiaso C., Casali P. et al. A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum // *J. Clin. Lab. Immunol.* — 1978. — Vol. 1. — P. 1–15.

3. Cohen R.J., Benedek G.B. Immunoassay by light scattering spectroscopy // *Immunochemistry*. — 1975. — Vol. 12. — P. 349–351.

4. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostic // *Appl. Opt.* — 1997. — Vol. 36. — P. 7518–7522.

5. Laboratornie metody issledovaniya v klinike: spravochnik / V.V. Menshikov Ed. — M: Medicina. — 1987. — 368 p.

6. Korablev P.V., Landa S.B., Semenova E.V., Filatov M.V. Dynamic light scattering — a simple and sensitive method of determination immune complexes in biological liquids. // *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. — 2015. — Vol. 54, № 2. — P. 53–58.

7. Landa S.B., Filatov M.V., Arutiunian A.V., Varfolomeeva E.V. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy // *Klin Lab Diagn.* — 2008. — № 46. — P. 37–41.

Received 22.09.2015

Registration of isotype composition of immune complexes as a new diagnostic procedure

Landa S.B.¹, Ivanov A.V.², Komlichenko E.V.², Filatov M.V.¹

¹ — B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute NRC «Kurchatov Institute» Gatchina, RF, e-mail: fil_53@mail.ru

² — University Hospital of Sait-Petersburg State University Sait-Petersburg, RF

In this paper we propose a new approach analysis of circulating immune complexes (CIC) formed in heterogeneous biological fluids. The method is based on an analysis of the contribution of immune complexes in light scattering that is logged by using dynamic light scattering spectrometer with heterodyne measurement scheme [4]. The proposed approach is capable of detecting immune complexes formed by the addition of the antigen in a concentration greater than 50 pg per ml. Increased immune complexes due to their size further aggregation using antibodies specific for the various human immunoglobulin isotype allows to determine the heterogeneity of the composition and complexes.

Key words: *Dynamic light scattering, particle size distribution, circulating immune complexes, immunoglobulin isotypes*

Влияние низких доз излучения иттербия-169 на пролиферацию и гибель клеток человека в культуре*

Гильяно Н.Я., Коневега Л.В., Журишкина Е.В., Степанов С.И., Носкин Л.А.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова.

В работе изучен эффект источников ионизирующего излучения на основе иттербия 169 на пролиферацию, прогрессию по циклу, апоптоз и уровень хромосомных аберраций в клетках карциномы (линия HeLa G63) и эндотелиоцитах (линия ECV304) человека в культуре. Показано, что облучение клеток ИИИ на основе ^{169}Yb - (в диапазоне доз от 0,33–1,2 Гр) приводило к блокированию клеток в G_2/M фазах клеточного цикла. Блокирование прогрессии клеток зависело от дозы и носило необратимый характер, что приводило к репопуляционным изменениям и снижению концентрации клеток в образцах в различные временные интервалы после облучения. Ингибирование роста клеток ^{169}Yb носило дозозависимый характер. Регистрация эффектов в отдаленные сроки после облучения ^{169}Yb и сохранение их на протяжении нескольких клеточных генераций указывает на то, что под влиянием низких доз облучения происходит системное изменение метаболизма клетки. Включаются механизмы «чек-поинтного» (check point) контроля и апоптотической гибели клетки. Морфологический анализ клеток выявил индукцию апоптотической формы гибели не только и не столько в облученных клетках, сколько в их потомках, в которых регистрируются также и патологические митозы, нарушение митотического аппарата деления клеток. Некротическая форма гибели регистрировалась только после пролонгированного облучения клеток источниками ^{169}Yb . Реализация эффекта облучения ^{169}Yb в отдаленные сроки после облучения, предполагает возможность их модификации, что важно в клинической практике.

Ключевые слова: иттербий 169, клетки человека в культуре, хромосомные аберрации, клеточный цикл, апоптоз, проточная цитометрия

Введение

В патогенезе интоксикационных воздействий на организм определяющим является поддержание баланса между процессами клеточного деления и гибелью клеток. Нарушение баланса вызывает или быстрый рост нежелательных и потенциально опасных клеток и/или потерю клеток, необходимых для сохранения функций тканей. И то и другое может приводить к опасным для жизни заболеваниям. К заболеваниям, ассоциированным с увеличением клеточного деления, относится рак, поэтому и радио-, и химиотерапия онкологических заболеваний — это, прежде всего, ингибирование деления клеток. Источники ионизирующего излучения (ИИИ) наряду с хирургией и химиотерапией широко применяются в онкологии. В последнее время все чаще используют контактную лучевую терапию (брахитерапию), при которой источник излучения вводится внутрь патологически измененного органа, в отличие от наружной лучевой терапии. Это позволяет облучать максимальными дозами непосредственно очаг опухоли при минимальном воздействии на окружающие здоровые ткани. В качестве источника излучения обычно используют радиоактивные изотопы ^{226}Ra , ^{192}Ir , ^{125}I , ^{137}Cs , ^{60}Co . В настоящее время в качестве перспективного радионуклида для брахитерапии рассматривается иттербий-169 (^{169}Yb) [1]. Иттербий-169 благодаря своим ядерно-физическим свойствам (мягкий спектр γ -излучения, высокая удельная активность) является радионуклидом с большим потенциалом использования для брахитерапии опухолей. Его возможное применение в качестве клинического радионуклида рассматривается международной

фармацевтической компанией (Amersham International). К сожалению, источников ^{169}Yb для брахитерапии в коммерческой доступности пока еще нет. Используемые нами источники ^{169}Yb - были разработаны в ООО «Делиз» [2] в инновационном порядке.

Цель работы состояла в оценке эффективности летального и цитогенетического действия трех образцов ^{169}Yb - на перевиваемых клеточных линиях человека. Эффективность действия источников ИИ на основе ^{169}Yb проводили по ряду клинически приемлемых клеточных параметров, таких как: идентификация живых и умирающих клеток по изменению проницаемости клеточной мембраны; прогрессия клеток по клеточному циклу; изменение скорости роста клеток; индукция асимметричных хромосомных аберраций и изменения морфологии клеток.

Методика

Работа выполнена на культуре клеток человека: карциномы (линия HeLa-G63) и эндотелиоцитах (линия ECV 304). Клетки культивировали на среде Игла с добавлением 10% эмбриональной сыворотки. В качестве антибиотика использовали гентамицин. Облучение клеток проводили, помещая образцы ^{169}Yb в эппендорфы с клетками в питательной среде. После облучения клетки рассеивали в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Клетки росли на поверхности покровного стекла и на поверхности флакона, что позволяло одновременно проводить морфологический и цитометрический анализ одной и той же популяции клеток. Для регистрации морфологи-

* Авторы выражают благодарность зав. лаб. медицинской физики ФГБУ Институт ядерных исследований, д.ф.-м.н. Акулиничеву Сергею Всеволодовичу, генеральному директору ООО «Делиз», к.т.н. Держиеву Василию Ивановичу за предоставленные источники ИИ на основе иттербия-169 и их дозиметрические характеристики.

ческих изменений клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали этанолом, затем окрашивали ацетоорсеином и анализировали на световом микроскопе «Motic», снабжённом цифровой фотокамерой. На стёклах регистрировали клетки с морфологическими признаками, характерными для апоптоза, и хромосомные aberrации (мосты и фрагменты в анафазе). Клетки, выросшие на поверхности флаконов, снимали раствором Версена. Полученную клеточную суспензию центрифугировали, осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 0,1% бромистого этидия за 15 мин до анализа на проточном цитометре. Цитометрический анализ распределения клеток по содержанию ДНК проводили на проточном цитометре, созданном Степановым С.И. в лаборатории медицинской биофизики ПИЯФ [3]. Распределение клеток по содержанию ДНК позволяет проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2 с — G1; 3 с — S; 4 с — G2/M, так и оценить цитотоксичность препаратов, анализируя долю клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или sub-G1-популяцию), которые появляются в результате фрагментации ядра в процессе апоптотической гибели клеток [4]. Кроме того, цитометрический анализ позволяет оценить концентрацию клеток в образце. При посеве равной концентрации клеток и последующем анализе равного количества их и фиксированной скорости подачи клеток, различия в концентрации будут отображать репопуляционные изменения, индуцированные той или иной обработкой клеток. Анализ гистограмм (процентное соотношение клеток с различным содержанием ДНК к общему числу проанализированных клеток) проводили с помощью компьютерной программы, написанной Степановым С.И., которая является модифицированной формой программы [5]. В каждом случае анализировали от 10 до 20 тыс. клеток. Цитометрический анализ оценки жизнеспособности клеток по целостности клеточной мембраны проводены путем инкубирования их с флуоресцентным красителем пропидиум иодидом [6]. Клетки, выросшие на поверхности флакона, снимали раствором Версена. Проницаемость цитоплазматической мембраны используется как маркер жизнеспособных клеток, для этого используют флюорохромы, которые проникают только через поврежденные мембраны нежизнеспособных клеток. Они легко идентифицируются и визуальны в микроскоп, и более ярко флюоресцируют при проточно-цитометрическом анализе.

Клеточную суспензию помещали на лед и затем добавляли раствор пропидиум иодида (конечная конц. 1 мкг/мл) и сразу анализировали на проточном цитометре.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты оценки жизнеспособности клеток по целостности клеточной мембраны при инкубировании их с флуоресцентным красителем пропидиум иодидом сразу после облучения. Как видно из гистограмм, облучение клеток ^{169}Yb в дозе 0,33Гр не меняло соотношения слабо флюоресцирующих клеток (1—20 канал) к ярко флюоресцирующим (100—1000 канал) клеток по сравнению с необлученным контролем. Спектры флюоресценции необлученных и облученных клеток полностью совпадают. Отсутствие эффекта излучения ^{169}Yb на проницаемость клеточной мембраны (рис.1А), возможно, связано с недостаточно высо-

кой дозой и/или малым вкладом прямых радиационных повреждений в регистрируемый эффект. При облучении тех же клеток γ -квантами ^{60}Co в более высоких дозах (10 Гр) наглядно выявляется эффект облучения, а именно увеличивается доля ярко флюоресцирующих клеток, что свидетельствует об увеличении проницаемости клеточной мембраны (рис. 1Б). Очевидно, что при облучении клеток в высоких дозах γ -квантами ^{60}Co вклад прямых поражений (клеточных мембран/ молекул ДНК) больше, чем при облучении ^{169}Yb . Нарушение клеточной пролиферации, индуцированное облучением источниками ИИ на основе ^{169}Yb регистрировали по распределению клеток по содержанию ДНК при окрашивании бромистым этидием — флуоресцентным интелекалирующим красителем, количественно связывающимся с ДНК. Клетки с одного матраса были сняты раствором Версена и распределены в 3 эппендорфа. В каждом эппендорфе 1 мл среды содержал 5×10^5 клеток. Для того, чтобы выявить зависимость эффективности источников от дозы и мощности дозы, мы в 1-й эппендорф помещали два источника (общая доза облучения 1,1 Гр), во 2-й — один источник (доза облучения 0,33 Гр), 3-й эппендорф без источника ИИ служил контролем. По окончании облучения эппендорфы центрифугировали и к осадку добавляли 0,5 мл раствора Версена, затем осадки ресуспендировали и переносили суспензию в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами и 3 мл питательной среды, оставляя расти в течение следующих 96 часов. Анализ состава клеточной популяции, проведенный сразу после облучения, существенных различий в сравнении с необлученным контролем не выявил (рис. 2А), а через 96 часов после облучения регистрировали изменения в распределении клеток по содержанию ДНК по отношению к необлученному контролю (рис. 2 Б и В). Из гистограмм видна дозозависимая аккумуляция тетраплоидных клеток, что соответствует G2/M фазам клеточного цикла (18% в необлученном контроле, 30% после облучения в дозе 1,1 Гр и 25% — в дозе 0,33 Гр). Увеличивается также доля гиподиплоидных клеток (sub-G1 популяция): 4,8% в контроле и 7% после облучения. Почти втрое снижается концентрация клеток в облученном образце (в контроле было 152,5 клеток в секунду,

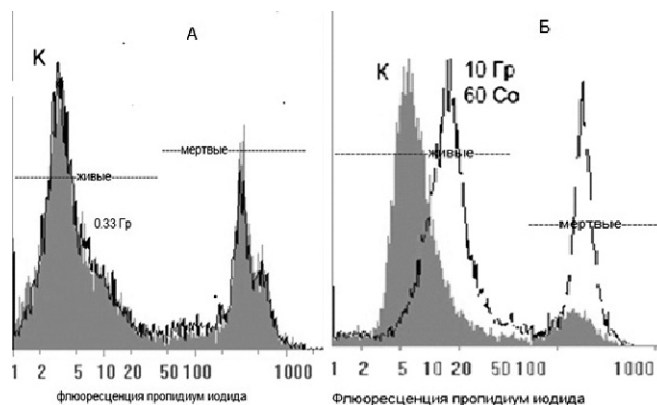


Рис. 1. Идентификация нежизнеспособных клеток HeLa G63 после облучения источниками ^{169}Yb в дозе 0,33 Гр (А) и после облучения ^{60}Co в дозе 10 Гр (Б) с помощью пропидиум иодида.

По оси абсцисс — интенсивность флюоресценции; по оси ординат — количество клеток (отн.ед.).

Нежизнеспособные клетки светят на 2 порядка ярче, чем живые клетки. Область от 1—20 — живые, от 100—1000 мертвые.

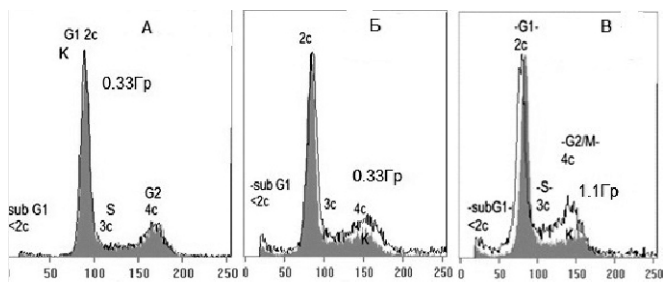


Рис. 2. Распределение клеток HeLa G63 по содержанию ДНК до (А) и через 96 часов (Б и В) после инкубации их с источниками ^{169}Yb . По оси абсцисс — номер канала флуоресценции; по оси ординат — количество клеток (отн.ед.).

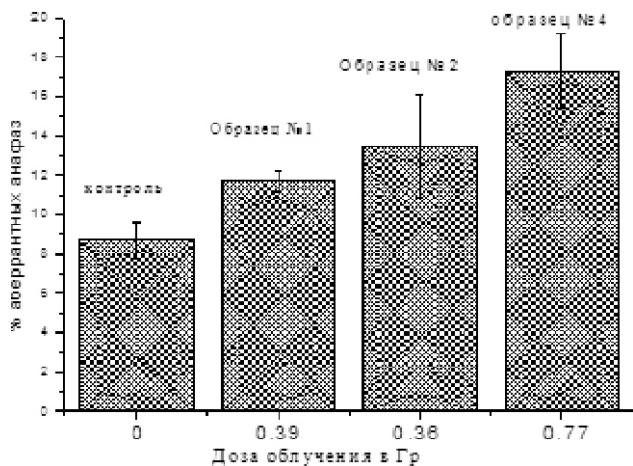


Рис. 3. Уровень асимметричных хромосомных aberrаций в клетках HeLa G63 индуцированный ИИ различных образцов ^{169}Yb . По оси абсцисс — доза облучения в Гр; по оси ординат — процент aberrантных анафаз.

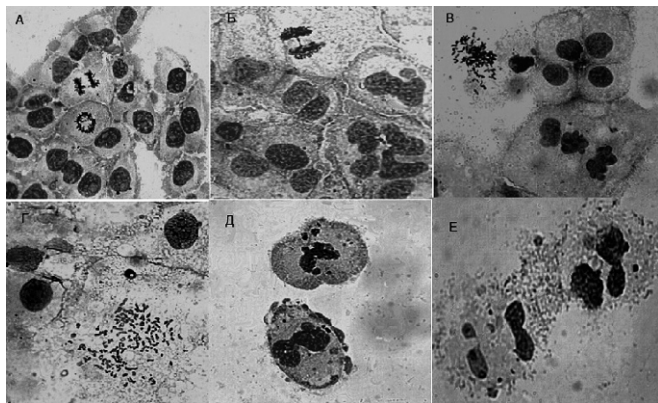


Рис. 4. Морфологический анализ популяции клеток HeLa G63 и ECV304, выращенных на покровных стеклах, после инкубации клеток с образцами ^{169}Yb (увеличение 40x20):

А — клетки HeLa без облучения;
 Б — клетки HeLa G63 через 48 часов после облучения образцами ^{169}Yb (1,2 Гр); видна aberrантная анафаза (мост между хромосомами, разделяющимися на дочерние клетки), и полиплоидные клетки с морфологическими признаками апоптоза (фрагментация ядра при сохранении клеточной мембраны);
 В — клетки HeLa G63 через 96 часов после облучения ^{169}Yb -образцами в дозе 1,2 Гр, наблюдается апоптоз и anomальная метафаза (нарушение расхождения хромосом по дочерним клеткам, или блокирование клеток в метафазе);
 Г — клетки ECV 304 К-митоз (нарушение расхождения хромосом по дочерним клеткам, или блокирование клеток в метафазе, или метафазно/анафазный блок) после облучения образцами ^{169}Yb (в дозе 1,2 Гр);
 Д—Е — клетки HeLa G63 после пролонгированного облучения образцами ^{169}Yb в дозе 2,6 Гр регистрируется и некроз (дробление ядра и нарушение клеточной мембраны).

а в облученном образце 57,3 клеток в секунду) при исходно равных концентрациях при посеве клеток, равном количестве проанализированных клеток (12 000) и фиксированной скорости анализа клеток. Снижение концентрации клеток в облученных образцах может свидетельствовать как о необратимости блокирования клеток в G2/M, так и о снижении скорости роста клеток. Регистрация эффектов излучения ^{169}Yb на протяжении 96 часов инкубации после облучения, а это 4 клеточных цикла (продолжительность одного клеточного цикла HeLa G63 — 24 часа) свидетельствует о включении механизмов пролонгации действия ИИ. Это отсроченные (задержанные) эффекты действия ИИ, которые следует учитывать при планировании режимов облучения опухолей.

Известно, что основными причинами необратимого блокирования клеток в G2/M фазах цикла являются нерепарированные повреждения наследственных структур клетки [7, 8]. Мы оценили эффективность каждого источника ^{169}Yb в индукции асимметричных хромосомных повреждений (мосты и фрагменты в анафазе). Результаты анализа представлены на рис. 3, из которого видно, что все образцы ^{169}Yb индуцировали увеличение уровня повреждений хромосом. При этом следует отметить, что по сравнению с необлученным контролем это увеличение было незначительным (4—9%). Очевидно, что в пределах исследуемых доз облучения выявить существенные различия по этому критерию сложно, хотя дозовая зависимость прослеживается. Можно также предположить, что разрывы ДНК, лежащие в основе образования хромосомных aberrаций, не являются единственной причиной гибели клетки после облучения источниками ^{169}Yb в столь низких дозах. На этой же линии клеток ранее нами были оценены уровни aberrантных анафаз после облучения γ -квантами ^{137}Cs , β -частицами ^3H и рентгеновыми лучами. По эффективности индукции хромосомных повреждений образцы ^{169}Yb соответствуют рентгеновым лучам. Доза в 1 Гр рентгеновского излучения индуцировала от 14 до 18,0% aberrаций в зависимости от стадии клеточного цикла.

Морфологический анализ состава клеточной популяции после облучения клеток HeLa G63 и ECV 304, представленный на рис. 4, показал, что после облучения их источниками ИИ на основе ^{169}Yb включаются различные механизмы гибели клеток. Наряду с повреждениями генетического аппарата клетки имеют место разрывы ДНК и неправильное соединение разорванных концов (мосты в анафазе) (рис. 4 Б), клетки теряют свою жизнеспособность до наступления анафазы в метафазе, образуя anomальные метафазы и К-митоз (рис. 4 В, Г). Гибель клеток проходит как через митотическую катастрофу, так и через апоптоз (фрагментация клеточного ядра при сохранении целостности клеточной мембраны) (рис. 4 Б, В.). После пролонгированного облучения (70 часов облучения, накопленная доза — 2,6 Гр) регистрировали некротические клетки (рис. 4, Д, Е) с фрагментированным клеточным ядром и с нарушениями целостности клеточной мембраны. Очевидно, что включение некротической формы гибели после пролонгированного облучения следует также учитывать при планировании режимов облучения опухолей. Некроз можно описать как неспецифическое набухание клетки и ее мембранных органелл, которое завершается нарушением их целостности. В результате разрывов в плазматической мембране содержимое клетки оказыва-

ется во внеклеточном пространстве, что приводит к целому ряду осложнений. В отличие от некроза апоптоз является регулируемым процессом гибели клеток, который происходит при нормальном развитии клеток. Апоптоз подразделяется на апоптоз одноядерных клеток и митотическую катастрофу. Митотическая катастрофа — это тип клеточной гибели, который осуществляется как в ходе деления клетки, так и через короткое время после нерегулируемого/незавершенного митоза. Под митотической катастрофой принято понимать гибель клетки в результате грубых нарушений митоза, таких, как отставание хромосом в мета- и анафазе, К-митозы, мультиполюсные и мультигрупповые мета- и анафазы. Регистрация всех этих форм гибели после облучения источниками ИИ на основе ^{169}Yb приводила к снижению концентрации клеток в облученных образцах. На рис. 5 представлены результаты эксперимента по оценке влияния облучения образцами ^{169}Yb на рост клеток. В пробах «до-» и в различные сроки «после инкубации» клеток с образцами ^{169}Yb просчитывали их концентрацию. Исходно концентрация клеток во всех пробах была одинаковой. Реализация эффектов облучения ИИ регистрировалась через 2 и 4 цикла удвоения (генерации) клеток. Из диаграмм видно, что уже через 48 часов (2 цикла удвоения) количество клеток в облученных образцах снижается по сравнению с необлученным контролем, при этом инкубация клеток с двумя образцами ^{169}Yb одновременно (1,1 Гр) эффективнее ингибировала рост клеток по сравнению с облучением одним образцом (0,33 Гр). Эти два режима облучения отличались как дозой, так и мощностью дозы. В первом случае эти параметры были втрое больше. Очевидно, что исследуемые образцы ^{169}Yb ингибируют рост клеток дозозависимым образом. Регистрация эффектов облучения ИИИ на основе ^{169}Yb в отдаленные сроки после облучения и сохранение этих эффектов на протяжении нескольких клеточных генераций указывает на то, что под влиянием низких доз облучения происходит системное изменение метаболизма клетки. Включаются механизмы контроля в точках сверки (check point) и апоптотической гибели клетки, для реализации которой требуется определенный лаг-период, поскольку апоптоз состоит из ряда этапов:

- 1) индукция, или запуск программы апоптоза;
- 2) активация проапоптотических белков;
- 3) каскад каспаз, расщепляющих белки-мишени;
- 4) разрушение внутриклеточных органелл или их перестройка;
- 5) фрагментация клетки на апоптотические тельца;
- 6) подготовка клетки и ее фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками [9].

Из вышеизложенного следует, что облучение клеток ИИ на основе ^{169}Yb приводит к нарушению прогрессии клеток по циклу, которое сопровождается блокированием клеток в G2/M фазах. Блокирование прогрессии клеток носило необратимый характер, что приводило к репуляционным изменениям, снижению концентрации клеток в образцах в различные временные интервалы после облучения. Морфологический анализ клеток выявил включение апоптотической формы гибели не только и не столько в облученных клетках, сколько в их потомках, в которых регистрируются также и патологические митозы, нарушение митотического аппарата деления клеток. Аналогичные результаты были нами получены при хроническом облучении клеток в дозах 0,21—20 сГр β -части-

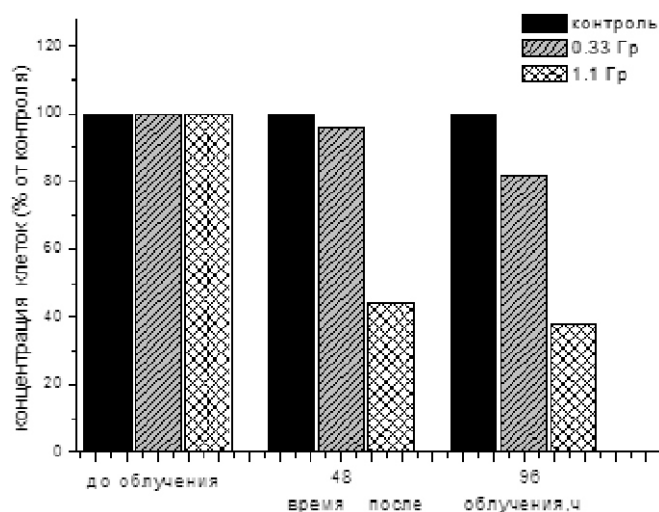


Рис. 5. Концентрация клеток в пробах до и в различные сроки после облучения образцами ^{169}Yb (1,1 Гр) и (0,33 Гр).

цами, испускаемыми тритием, инкорпорированным в ДНК клеток китайского хомячка, линия V-79 [10]. Потомки облученных клеток стойко демонстрировали нарушение перехода из метафазы в анафазу на протяжении 120 исследованных нами генераций. Агенты, специфически действующие на делящиеся клетки, издавна привлекают внимание онкологов, поскольку активное деление — одна из особенностей опухолевых клеток. Некротическая форма гибели регистрируется только после продолжительного облучения клеток источниками ^{169}Yb . Следует также подчеркнуть, что поскольку все эти патологии реализуются в отдаленные сроки после облучения, то это допускает возможность модификации эффекта облучения. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что испытанные источники ИИ на основе ^{169}Yb обладают выраженным антипролиферативным эффектом, реализующимся в индукции апоптотической гибели потомков облученных клеток.

Список литературы

1. Loft S.M., Coles I.P., Dale R.G. The potential of ytterbium 169 in brachytherapy: a brief physical and radiobiological assessment // *Br. J. Radiol.* — 1992. — Mar. — Vol. 65(771). — P. 252—257.
2. Акулиничев С.В., Антанович А.А., Бражкин В.В., Держнев В.И., Зибров И.П., Филоненко В.П. Источник для брахитерапии. Патент № 131302 от 23.05.2013.
3. Stepanov S.I., Konyshev V.N., Kotlovanova L.V. et al. Karyotyping of individual cells with flow cytometry // *Cytometry.* — 1996. — Vol. 23. — P. 279—283.
4. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* — 2005.
5. Dean P.N., Cray J.W., Dolbear F.A. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry // *Cytometry.* — 1982. — 3. — P. 188—195.
6. «Assessment of cell viability using probes for membrane integrity» *Current Protocols in Cytometry.* — 1997, supplement 15, 9.2.1-9.2.14.
7. Durante M., Furusawa Y., Majima H. et al. Association between G2-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes // *Radiat. Res.* — 1999. — Vol. 151. — P. 670—676.
8. Гильяно Н.Я., Коневега Л.В., Степанов С.И. и др. Блокирование пролиферации эндотелиальных клеток человека в культуре β и γ -излучением от инкорпорированных и внешних источ-

ников. G₂-блок, индуцированный β-частицами ³H-тимидина и γ-квантами ¹³⁷Cs // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47, № 1. — С. 108—116.

9. Jonathan E.C., Bernhard E.J., McKenna W.G. How does radiation kill cells? // Curr. Opin. Chem. Biol. — 1999. — 3. — P. 77—83.

10. Гильяно Н.Я., Большакова О.И., Лаврова Г.А. и др. Характеристика адаптивного ответа к действию γ-лучей, индуцированного малыми дозами ¹⁴C в фибробластах Китайского хомячка // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1998. — Т. 38, № 5. — С. 663—671.

Поступила 26.09.2015

References

1. Loft S.M., Coles I.P., Dale R.G. The potential of ytterbium 169 in brachytherapy: a brief physical and radiobiological assessment // Br. J. Radiol. — 1992. — Mar. — Vol. 65(771). — P. 252—257.

2. Акулиничев С.В., Антанович А.А., Бражкин В.В., Держиев В.И., Зибров И.П., Филоненко В.П. Источник для брахитерапии. Патент № 131302 от 23.05.2013.

3. Stepanov S.I., Konyshev V.N., Kotlovanova L.V. et al. Karyotyping of individual cells with flow cytometry // Cytometry. — 1996. — Vol. 23. — P. 279—283.

4. Watson J.V. Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics. — 2005.

5. Dean P.N., Cray J.W., Dolbear F.A. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry // Cytometry. — 1982. — 3. — P. 188—195.

6. «Assessment of cell viability using probes for membrane integrity» Current Protocols in Cytometry. — 1997, supplement 15, 9.2.1-9.2.14.

7. Durante M., Furusawa Y., Majima H. et al. Association between G₂-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes // Radiat. Res. — 1999. — Vol. 151. — P. 670—676.

8. Гильяно Н.Я., Конева Л.В., Степанов С.И. и др. Блокирование пролиферации эндотелиальных клеток человека в культуре β и γ-излучением от инкорпорированных и внешних источников. G₂-блок, индуцированный β-частицами ³H-тимидина и γ-квантами ¹³⁷Cs // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47, № 1. — С. 108—116.

9. Jonathan E.C., Bernhard E.J., McKenna W.G. How does radiation kill cells? // Curr. Opin. Chem. Biol. — 1999. — 3. — P. 77—83.

10. Гильяно Н.Я., Большакова О.И., Лаврова Г.А. и др. Характеристика адаптивного ответа к действию γ-лучей, индуцированного малыми дозами ¹⁴C в фибробластах Китайского хомячка // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1998. — Т. 38, № 5. — С. 663—671.

Received 25.09.2015

Effect of low doses of radiation ¹⁶⁹Yb- on proliferation and cell death in human cells in culture

Giliano N.Ya., Konevega L.V., Stepanov S.I., Zhurishkina E.V., Noskin L.A.

National Research Center «Kurchatov Institute»,

V.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute,

Orlova Roscha, 1, Gatchina, Leningrad dist. 188300, Russia, e-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru

In this work we study the effect of sources of ¹⁶⁹Yb- on the proliferation, progression of the cell cycle, apoptotic death and the level of chromosome aberrations in carcinoma (HeLa G63) and endothelial (ECV304) human cells in culture. It has been shown that exposure of cells by ¹⁶⁹Yb- with doses 0.33–1.2 Gy leads to cell blocking in G₂/M phases of the cell cycle. We found that the blocking the progression of cells is dose dependent and become irreversible, resulting in repopulation changes. The ¹⁶⁹Yb radiation also inhibited the growth of cells in a dose dependent manner. We found that the level of the chromosome aberrations induced in HeLa G63 cells by the ytterbium exposure of 1.1 Gy was close to the same level induced by X-rays exposure of 1 Gy. Morphological analysis of the cells identified of apoptotic form of cellular death, not only and not so much in irradiated cells, as their descendants. In the latter case we also recorded an abnormal mitosis, a damage of the mitotic apparatus of cell division. Necrotic form of cellular death was registered only after prolonged exposure of ytterbium irradiation. Observation of the irradiation effects for several cellular generations indicates that low doses of radiation induce systemic change of cellular metabolism, which was accompanied by activation of mechanism of «check-point» control and apoptosis. The observed manifestation of the damaging effect late after the irradiation by ytterbium sources may significantly contribute to the total effect of treatment, which is important in clinical practice.

Key words: ytterbium 169, human cells in culture, chromosome aberrations, cell cycle, apoptosis, flow cytometry

Липопротеиды плазмы крови и вариабельность толщины интима-медиального слоя сонных артерий: сравнение московской и парижской популяций*

Чернова Е.В.¹, Кириченко Т.В.², Орехова В.А.³, Никитина Н.А.³, Карагодин В.П.², Орехов А.Н.², Жираль Ф.⁴, Собенин И.А.^{1,2}

- ¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д 8, niiorp@mail.ru
- ² — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 143025, Москва, ул. Новая, д 100, office@inat.ru
- ³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д 15а, cclibr@cardio.ru
- ⁴ — Национальный институт здравоохранения и медицинских исследований (INSERM) и Университет Пьера и Марии Кюри, университетская больница Питье Сальпетриер, Париж, Франция

В эпидемиологическом, международном, кросс-секционном исследовании приняли участие 1200 условно здоровых субъектов мужчин и женщин без клинических проявлений атеросклероза, в том числе, добровольцы с повышенным риском развития заболеваний атеросклеротического генеза из российской и французской популяций. Для оценки предрасположенности к развитию атеросклероза использовали метод ультразвукового сканирования сонных артерий в режиме высокого разрешения. Был проведен анализ вариабельности показателя толщины интима-медиального слоя (ТИМС) сонных артерий в двух выборках (мужчины и женщины) из Парижа и Москвы. Была изучена роль таких традиционных факторов риска, как возраст, индекс массы тела, уровень липопротеидов плазмы крови в формировании изменений в ТИМС. Было установлено, что московская выборка субъектов в большей степени предрасположена к развитию атеросклероза: данная тенденция определялась большей выраженностью таких факторов, как возраст и уровень холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛНП) в крови.

Ключевые слова: атеросклероз; вариабельность; факторы сердечно-сосудистого риска; толщина интима-медиального слоя сонных артерий

Введение

Субклинический атеросклероз является наиболее широко распространенной патологией; атеросклеротические поражения артерий выявляются уже у молодых лиц и неуклонно прогрессируют в течение десятилетий, прежде чем приводят к развитию клинических проявлений. Уже в среднем возрасте у лиц без клинических проявлений атеросклероза частота выявления атеросклеротических поражений сосудов приближается к 100% [1].

Раннее выявление пациентов с высоким риском развития атеросклероза и проведение своевременной профилактики является актуальной медико-социальной задачей, решение которой должно привести к снижению сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности. В решении этой задачи идентификация маркеров субклинического атеросклероза является основополагающим фактором. Общеизвестным неинвазивным маркером субклинического атеросклероза является комплекс толщины интима-медиального слоя (ТИМС) сонных артерий, определяемый методом ультразвукового сканирования [2]. Так как этот показатель является маркером субклинического атеросклероза, он широко используется в клинических и эпидемиологических исследованиях для оценки влияния традиционных и новых факторов сердечно-сосудистого риска на развитие данной патологии. Кроме того, была показана ассоциация ТИМС с распространенностью и возникновением ишемической болезни сердца (ИБС) [3].

Результаты ранее проведенных многоцентровых исследований выявили существенные межпопуляционные различия в вариабельности ТИМС, которые лишь частично объясняются различиями в вариабельности традиционных факторов риска [4]. Было высказано предположение о существовании географического градиента предрасположенности к атеросклерозу и ССЗ [5].

В данном исследовании проведен анализ прямого и опосредованного влияния таких факторов сердечно-сосудистого риска, как возраст, индекса массы тела и показатели липидного профиля сыворотки крови на вариабельность ТИМС сонных артерий у субъектов из французской (Париж) и российской (Москва) популяций. Проведена оценка роли уровня различных фракций липопротеидов крови, как широко используемого в современной клинической практике параметра в прогнозировании развития атеросклероза.

Материалы и методы

Участники и дизайн исследования

В эпидемиологическое, международное, кросс-секционное исследование были включены мужчины и женщины в возрасте от 40 до 80 лет, имеющих не менее трех традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний и не имеющих клинических проявлений атеросклероза, таких, как инфаркт миокарда, нарушение мозгового

* Исследование было поддержано Министерством образования и науки РФ (проект RFMEFI61314X0006 в части обследования выборки из российской популяции).

кровообращения, перемежающаяся хромота, стенокардия, аневризма аорты. Финальная выборка составила 1200 чел. из российской ($n = 600$) и французской ($n = 600$) популяций. Исследование было организовано в соответствии с международными и отечественными стандартами качественной клинической практики, и было одобрено Комитетом по этике при медицинском учреждении. Все добровольцы, соответствующие критериям включения, давали информированное согласие на участие в исследовании. У всех добровольцев оценивали традиционные факторы риска, такие как возраст, индекс массы тела, а также показатели липидного профиля (общий холестерин, триглицериды, холестерин липопротеинов высокой плотности, холестерин липопротеинов низкой плотности) и наличие или отсутствие терапии гиперлипидемии. Анализ предполагал выделение четырех групп, сформированных по гендерному и территориальному признаку — мужчины и женщины из московской и парижской популяций соответственно.

Липидный анализ

Кровь для липидного анализа в количестве 7—10 мл брали утром натощак из локтевой вены в сухую пластиковую пробирку объемом 15 мл, не содержащую антикоагулянтов. После свертывания крови в течение 2 часов при комнатной температуре и ретракции сгустка при 4°C в течение 1 часа сгусток отделяли от стенок пробирки стеклянной палочкой. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 4500 об./мин в центрифуге Beckman TJ-6 (США). Сыворотку крови отбирали в пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и хранили при -20°C до проведения липидного анализа. Сывороточные концентрации холестерина и триглицеридов определяли ферментативным методом с помощью наборов Холестерин-12-Витал (Витал Диагностикс СПб, Санкт-Петербург, Россия). Содержание холестерина липопротеидов высокой плотности определяли также ферментативным методом после осаждения липопротеидов других классов с помощью преципитирующего реагента Boehringer Mannheim (Германия). Содержание этерифицированного холестерина липопротеидов низкой плотности определяли по формуле Фридевальда.

Ультразвуковое сканирование сосудов

При исследовании московской популяции для оценки состояния стенки сонных артерий использовали ультразвуграфию высокого разрешения в В-режиме с использованием линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц на ультразвуковом сканере SonoScape SSI-1000 (Китай). Система Biosound Technos MPX (Esaote, Генуя, Италия) сканер, оснащенный 5—10 МГц линейным датчиком использовался для исследования выборки из популяции Парижа.

Сканирование выполнял обученный и сертифицированный оператор УЗДГ сосудов головы и шеи. Ультразвуковой протокол предполагал визуализацию дистальной стенки первого сантиметра правой и левой общих сонных артерий (ОСА), в трех различных проекциях (передней, боковых и задней). Для статистического анализа ультразвуковых данных, использовали средние и максимальные значения ТИМ общих сонных артерий. Левая и правая сонные артерии были измерены в 2 см ОСА проксимально от бифуркации. Все изображения были записаны и ко-

личественно проанализированы с помощью специализированного программного обеспечения M'Ath (SRL Metris, Франция), которое обеспечивает полуавтоматическое определение ведущего края эхогенных линий интима-медиального комплекса [6].

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием программы Stata 9.1 (StataCorp LP, США). Результаты выражали в виде средних значений \pm стандартное отклонение (SD). Проводили анализ с использованием статистического пакета Mplus (Muthen & Muthen, США), в рамках которого имеется возможность спецификации путевых и структурно-ковариационных моделей. Базовые модельные предположения путевого анализа идентичны таковым для регрессии, что определило необходимость проверки распределения зависимых переменных на нормальность и отсутствие мультиколлинеарности предикторов. Оценку нормальности распределения осуществляли с помощью теста Колмогорова—Смирнова. Тест на наличие мультиколлинеарности предикторов заключался в оценке непараметрической корреляционной матрицы Спирмена. Путевые модели были построены с помощью программного пакета Mplus с использованием методов однофакторного и многофакторного вариационного анализа, кросс-табуляционного анализа, непараметрического корреляционного анализа. Путевой анализ в отличие от традиционного регрессионного анализа позволяет оценить более сложные причинные отношения между переменными и включить в анализ как непосредственно влияющие, так и медиативные связи: для каждой переменной, используемой в модели в качестве зависимой, оценивали регрессионный коэффициент, демонстрирующий степень влияния на другие переменные, участвующие в качестве предикторов. Кроме этих достоинств, специфицированная путевая модель имеет своей целью достижение скорее высокой предсказательной способности, чем причинного объяснения рассматриваемых процессов, что в итоге обусловило наш выбор. Выбор между тестами по Mann—Whitney, Welch's и Kruskal—Wallis обусловлен нормальностью распределения и равенством дисперсий. Показатели чувствительности и специфичности диагностики определены методом анализа площади под кривой операторского теста.

Результаты и обсуждение

Основной задачей проведенного анализа была оценка влияния факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний на показатель толщины интима-медиального слоя сонных артерий. В рамках сформулированной модели оценивали как прямое влияние факторов, так и их опосредованное влияние на указанный зависимый признак.

Клинико-антропометрическая характеристика участников исследования представлена в табл. 1, из которой видно, что женщины из московской популяции имели достоверно более высокие показатели ИМТ, средней ТИМС, и ниже — показатель наличия терапии гиперлипидемии, чем женщины из выборки парижской популяции. Мужчины из московской популяции имели достоверно более высокие показатели общего холестерина, триглицеридов, и более низкий показатель холестерина ЛВП, по сравнению с мужчинами из выборки парижской

Характеристики участников исследования

Переменные	Женщины (n = 600)			Мужчины (n = 600)		
	Москва	Париж	P	Москва	Париж	P
Возраст (лет)	60,6 (11,3)	60,2 (11,5)	0,968	60,7 (10,8)	60,8 (10,7)	0,988
Индекс массы тела (кг/м ²)	27,1 (4,8)	25,9 (5,4)	<0,001	26,7 (4,0)	26,8 (4,1)	0,611
Общий холестерин (г/л)	2,4 (0,4)	2,4 (0,5)	0,093	2,2 (0,4)	2,1 (0,5)	<0,001
Триглицериды (г/л)	1,1 (0,5)	1,1 (0,7)	0,234	1,2 (0,7)	1,5 (0,9)	<0,001
Холестерин ЛВП (г/л)	0,7 (0,2)	0,7 (0,2)	<0,001	0,6 (0,2)	0,5 (0,1)	<0,001
Холестерин ЛНП (г/л)	1,5 (0,4)	1,4 (0,6)	0,077	1,4 (0,4)	1,3 (0,5)	<0,001
Терапия гиперлипидемии (%)	4,0	55,3	<0,001	3,7	65,7	<0,001
Средняя ТИМС (мм)	0,78 (0,15)	0,63 (0,13)	<0,001	0,84 (0,15)	0,67 (0,14)	<0,001

Таблица 2

Значения стандартизованных коэффициентов регрессии для группы мужчин

Показатель	Москва		Париж	
	Станд. коэффициент, B (S.E.)	Значимость различий, P	Станд. коэффициент, B (S.E.)	Значимость различий, P
Возраст	0,455 (0,034)	<0,001	0,492 (0,028)	<0,001
ИМТ	0,100 (0,037)	0,007	0,157 (0,030)	<0,001
Триглицериды	—	н.д.	—	н.д.
Холестерин ЛВП	—	н.д.	-0,086 (0,034)	0,011
Холестерин ЛНП	0,089 (0,035)	0,010	—	н.д.

популяции. Применение холестерин снижающих препаратов у участников исследования из Москвы составило 3,8%, в то время как у парижан этот показатель достигал 60,5%. Среднее значение показателя ТИМС для совокупной выборки было 0,73 (0,14) с минимумом 0,5, и максимумом 1,8. Среднее значение этого параметра для парижан составило 0,65 (0,13), для москвичей — 0,81 (0,15).

Моделирование влияния выделенных фенотипических факторов на показатель ТИМС, выполненное через спецификацию путевых моделей для группы мужчин и женщин совпало и имело вид, представленный на рисунке.

В данной модели представлены регрессионные связи между переменными, а также продемонстрировано влияние факторов, не включенных в модель, что позволяет оценить важность традиционных факторов риска для прогнозирования значения зависимой переменной, то есть комплекса интима-медии. Параметры специфицированной путевой модели были оценены для каждой из четырех анализируемых групп в отдельности (сформированных по гендерному и территориальному признаку), для наглядности графическая визуализация результатов была объединена.

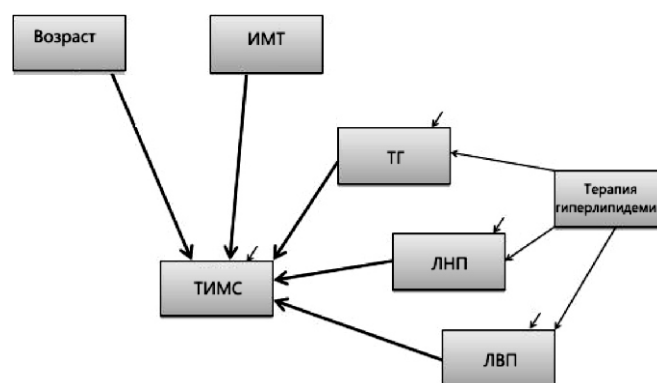
Значения стандартизованных коэффициентов регрессии, стандартной ошибки и соответствующий им уровень значимости отличий представлены в табл. 2 и 3.

На основании результатов, представленных в табл. 2, можно сделать вывод, что статистически значимое влияние на показатель ТИМС для группы мужчин из московской популяции оказывают возраст, индекс массы тела и уровень ЛНП. Они оказывают непосредственное воздействие на показатель ТИМС. Отсутствие статистически значимого влияния фактора терапии гиперлипидемии

связано с недостаточностью объема выборки в данной группе — лица, принимающие холестерин снижающие средства, составляют лишь 3,7% от анализируемой группы мужчин московской популяции.

Общий набор исследуемых факторов объясняет 26% вариабельности признака толщины интима-медиа (значение скорректированного R² составило 0,260).

В группе мужчин из парижской популяции показатели возраста и индекса массы тела оказывают наибольшее воздействие на показатель ТИМС и имеют наибольшую предсказательную способность. Обратную корреляцию с ТИМС демонстрирует в исследуемой группе уровень ЛВП. Указанные факторы оказывают непосредственное воздействие на исследуемую зависимую переменную, в то время, как специфицированные опосредованные связи не имеют статистически значимого влияния.



Путевая прогностическая модель:

ИМТ — индекс массы тела; ЛВП — уровень липопротеидов высокой плотности; ЛНП — уровень липопротеидов низкой плотности; ТГ — уровень триглицеридов; ТИМС — толщина интима-медиа слоя.

Общий набор представленных факторов объясняет 23% вариабельности зависимой переменной (значение скорректированного R^2 составило 0,230).

Таким образом, наблюдаемые различия по представленным факторам риска для мужчин из московской и парижской популяций определяют различия в предсказательной и объяснительной способности сформулированной модели. При наличии безусловных универсальных предикторов (возраст, индекс массы тела), оказывающих статистически значимое влияние на зависимый признак (ТИМС сонных артерий) в обеих группах, степень их значимости для москвичей и парижан различна. Кроме того, варьируется предсказательная способность показателей уровня липопротеидов различной плотности. Так в московской популяции наибольшее влияние демонстрирует уровень липопротеинов низкой плотности (положительно ассоциированный с ТИМС), а в парижской популяции — уровень липопротеинов высокой плотности (отрицательно ассоциированный с ТИМС). Это обусловлено тем, что московская популяция характеризуется высокими значениями дисперсии именно ЛНП при низких абсолютных показателях и низкой дисперсии ЛВП, а парижская популяция демонстрирует обратную тенденцию — средний уровень и невысокую дисперсию ЛНП.

Как видно из табл. 3, для группы женщин из московской популяции статистически значимое и прямое положительно ассоциированное воздействие на толщину сосудистой стенки оказывает возраст участников исследования. Менее значительное, но статистически значимое непосредственное влияние на комплекс интима-медии оказывает ЛВП. Непосредственное влияние данного фактора обладает достаточно высокой прогностической способностью.

Общая модель, включающая как прямые, так и опосредованные связи, объясняет 37% общей вариабельности зависимой переменной (значение скорректированного R^2 составило 0,370).

Для группы женщин из парижской популяции наиболее значимое влияние на зависимую переменную в рассматриваемой части совокупности факторов также оказы-

вает возраст, обладающий максимальной предсказательной способностью, и уровень ЛВП.

Путевая модель, включающая прямые и опосредованные связи, объясняет 12% общей дисперсии зависимой переменной (значение скорректированного R^2 составило 0,120).

Из табл. 4 следует, что среди женщин московской и парижской популяций набор выявленных статистически значимых факторов идентичен, порядковая значимость которых также соизмерима. Однако, данный набор факторов в московской популяции объясняет 37% вариабельности ТИМС сонных артерий, в парижской — лишь 12%. Таким образом, относительная значимость факторов, не включенных в модель, как и прогностическая способность представленных традиционных факторов риска в значительной степени различается между двумя рассматриваемыми выборками из популяций Москвы и Парижа.

Представленные оценки параметров модели позволяют заключить, что традиционные факторы риска обладают невысокой прогностической способностью, что определяется значительной дисперсией результатов между рассмотренными группами. Анализ данных позволяет выявить наиболее значимые в прогностическом отношении факторы — возраст, индекс массы тела и показатель ЛВП. Однако данные факторы не являются универсальными предикторами (так, у мужчин из московской популяции фактор риска уровень ЛВП оказался статистически незначим), степень их влияния оказывается различной для сравниваемых групп и набор этих факторов также значительно различается.

Результаты оценки параметров рассматриваемой модели, применительно к московской популяции демонстрируют более высокую прогностическую способность (26% и 37% объясненной дисперсии для мужчин и женщин соответственно) по сравнению с парижской популяцией (23% и 12% объясненной дисперсии для мужчин и женщин соответственно). Таким образом, можно предположить наличие других факторов, не включенных в модель, в большей степени определяющих вариабельность показателя ТИМС, по сравнению с представленными традиционными факторами сердечно-сосудистого риска.

Таблица 3

Значения стандартизованных коэффициентов регрессии для группы женщин

Показатель	Москва		Париж	
	Станд. коэффициент, В (S.E.)	Значимость различий, P	Станд. коэффициент, В (S.E.)	Значимость различий, P
Возраст	0,525 (0,023)	<0,001	0,300 (0,027)	<0,001
ИМТ	—	н.д.	—	н.д.
Триглицериды	—	н.д.	—	н.д.
Холестерин ЛВП	-0,058 (0,031)	0,028	-0,058(0,032)	0,340
Холестерин ЛНП	—	н.д.	—	н.д.

Таблица 4

Значения полученных коэффициентов детерминации

Показатель	Москва		Париж	
	Женщины	Мужчины	Женщины	Мужчины
R^2	0,260	0,370	0,230	0,120

Новыми факторами риска, играющими роль в формировании предрасположенности к атеросклерозу, могут быть экологические, социально-экономические, а также наследственные, степень влияния которых требует дальнейшего изучения.

В последние годы проводится изучение распространенности метаболического синдрома и его компонентов в многоцентровом исследовании НИКА (Национальное Исследование риска сердечно-сосудистых осложнений при метаболическом синдроме), которое показало высокую распространенность, прежде всего, артериальной гипертензии и абдоминального ожирения с наличием явных региональных различий. Показано, что ТИМ сонных артерий непосредственно ассоциирована с повышением уровня систолического давления, диабетом, статусом курения, индексом массы тела, количеством белых кровяных телец и плазменными уровнями ЛНП, ЛВП, Липопропротеида А и фибриногена [7, 8, 9]. В свою очередь, увеличение ТИМС свидетельствует об ухудшении здоровья сердечно-сосудистой системы [9] и даже является фактором риска снижения обонятельной функции [10].

Исследования, в которых бы рассматривалось опосредованное влияние факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний на ТИМС, освещены не столь широко.

Ранее было установлено существование европейского географического градиента ТИМС и его ассоциации с градиентом сердечно-сосудистой смертности. Совокупность традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний объясняет только 21 % вариабельности ТИМС общих сонных артерий — маркера генерализованного атеросклероза. Предрасположенность к атеросклерозу, оцениваемая по патологическому увеличению ТИМС сонных артерий, обусловлена взаимодействием традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, а также генетических и средовых. При этом последние должны изучаться как самостоятельные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний [12].

Проведенное исследование подтверждает наличие географического градиента, и демонстрирует более высокую прогностическую способность модели на московской популяции по сравнению с парижской популяцией.

Выводы

Сравнение московской и парижской популяций по показателю ТИМС сонных артерий показало, что при наличии одинакового совокупного риска московская популяция в большей степени предрасположена к атеросклерозу.

Основными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, оказывающими непосредственное влияние на увеличение толщины интима-медиального слоя сонных артерий, являются возраст и уровень холестерина липопротеинов низкой плотности в крови людей.

Список литературы

1. Marcovina S.M., Crea F., Davignon J. et al. Biochemical and biomaging markers for risk assessment and diagnosis in major cardiovascular diseases: a road to integration of complementary diagnostic tools // *J. Int. Med.* — 2007. — Vol. 261. — P. 214—234.
2. Stein J.H., Korcarz C.E., Hurst R.T. et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of

Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine // *J. Am. Soc. Echocardiogr.* — 2008. — Vol. 21. — P. 93—111.

3. Amato M., Montrosi P., Ravani A. et al. Carotid intima-media thickness by B-mode ultrasound as surrogate of coronary atherosclerosis: correlation with quantitative coronary angiography and coronary intravascular ultrasound findings // *Eur. Heart J.* — 2007. — Vol. 28. — P. 2094—2101.

4. Chambless L.E., Heiss G., Folsom A.R. et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987—1993 // *Am. J. Epidemiol.* — 1997. — Vol. 146. — P. 483—494.

5. Baldassarre D., Nyyssonen K., Rauramaa R. et al. Cross-sectional analysis of base line data to identify the major determinants of carotid intima-media thickness in a European population: the IMPROVE study // *Eur. Heart J.* — 2009. — Dec 1. — Epub ahead of print.

6. Touboul P.J., Grobbee D.E., den Ruijter H. Assessment of subclinical atherosclerosis by carotid intima media thickness: technical issues // *European Journal of Preventive Cardiology.* — 2012. — August. — Vol. 19. — P. 18—24.

7. Chambless L.E., Folsom A.R., Davis V., Sharrett R., Heiss G., Sorlie P., Szklo M., Howard G., Evans G.W. Risk factors for progression of common carotid atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987—1998 // *Am. J. Epidemiol.* — 2002. — Jan 1. — Vol. 155(1). — P. 38—47.

8. Hodis H.N., Mack W.J., LaBree L., Selzer R.H., Liu C.R., Liu C.H. et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events // *Ann. Intern. Med.* — 1998. — Vol. 128. — P. 262—269.

9. Карагодин В.П., Мухамедова М.Н., Орехов А.Н. Механизмы оттока холестерина из макрофагов — роль белка переноса фосфолипидов // *Патогенез.* — 2015. — Т. 13(2). — С. 12—22.

10. Ambar Kulshreshtha, Abhinav Goyal, Emir Veledar, William McClellan, Suzanne Judd, Silvia C. Eufinger, J. Douglas Bremner, Jack Goldberg, Viola Vaccarino. Association Between Ideal Cardiovascular Health and Carotid Intima-Media Thickness: A Twin Study // *J. Am. Heart Assoc.* — 2014. — 3. — e000282.

11. Schubert C.R., Cruickshanks K.J., Fischer M.E., Huang G.H., Klein R., Tsai M.Y., Pinto A.A. Carotid Intima Media Thickness, Atherosclerosis, and 5-Year Decline in Odor Identification: The Beaver Dam Offspring Study // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* — 2015. — Vol. 70 (7). — P. 879—884.

12. Собенин И.А., Желанкин А.В., Чернова Е.В., Кириченко Т.В., Орехова В.А., Сафарова М.С., Сергиенко И.В., Дорошук А.Д., Трубинов С.С., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Традиционные и новые факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и предрасположенность к развитию атеросклероза // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* — 2015. — Т. 59(1). — С. 4—11.

Поступила 27.10.2015

References

1. Marcovina S.M., Crea F., Davignon J. et al. Biochemical and biomaging markers for risk assessment and diagnosis in major cardiovascular diseases: a road to integration of complementary diagnostic tools. *J. Int. Med.* 2007; 261: 214—34.

2. Stein J.H., Korcarz C.E., Hurst R.T. et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2008; 21: 93—111.

3. Amato M., Montrosi P., Ravani A. et al. Carotid intima-media thickness by B-mode ultrasound as surrogate of coronary atherosclerosis: correlation with quantitative coronary angiography and coronary intravascular ultrasound findings. *Eur. Heart J.* 2007; 28: 2094—101.

4. Chambless L.E., Heiss G., Folsom A.R., et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987—1993. *Am. J. Epidemiol.* 1997; 146: 483—94.

5. Baldassarre D., Nyyssonen K., Rauramaa R. et al. Cross-sectional analysis of base line data to identify the major determinants of ca-

rotid intima-media thickness in a European population: the IMPROVE study. *Eur Heart J*. 2009. Dec 1. — Epub ahead of print.

6. Touboul PJ, Grobbee DE, den Ruijter H. Assessment of subclinical atherosclerosis by carotid intima media thickness: technical issues. *European Journal of Preventive Cardiology*. August. 2012; 19: 18–24.

7. Chambless LE, Folsom AR, Davis V, Sharrett R, Heiss G, Sorlie P, Szklo M, Howard G, Evans GW. Risk factors for progression of common carotid atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987–1998. *Am J Epidemiol*. 2002. Jan 1; 155(1): 38–47.

8. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med*. 1998; 128: 262–269.

9. Karagodin V.P., Mukhamedova M.N., Orekhov A.N. The mechanisms of cholesterol efflux from macrophages — the role of phospholipid transfer protein. *Patogenez*. 2015; 13(2): 12–22. (in Russian).

10. Ambar Kulshreshtha, Abhinav Goyal, Emir Veleđar, William McClellan, Suzanne Judd, Silvia C. Eufinger, J. Douglas Bremner, Jack Goldberg, Viola Vaccarino. Association Between Ideal Cardiovascular Health and Carotid Intima-Media Thickness: A Twin Study. *J. Am Heart Assoc*. 2014; 3: e000282.

11. Schubert CR, Cruickshanks KJ, Fischer ME, Huang GH, Klein R, Tsai MY, Pinto AA. Carotid Intima Media Thickness, Atherosclerosis, and 5-Year Decline in Odor Identification: The Beaver Dam Offspring Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70 (7): 879–884.

12. Sobenin I.A., Zhelankin A.V., Chernova E.V., Kirichenko T.V., Orekhova V.A., Safarova M.S., Sergienko I.V., Doroshchuk A.D., Trubinov S.S., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Conventional and new risk factors for cardiovascular disease, and predisposition to atherosclerosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2015; 59(1): 4–11.

Received 27.10.2015

Lipoproteins in blood plasma and variability of the intima-media thickness of the carotid arteries: comparative analysis of the Moscow and Paris population

Chernova E.V.¹, Kirichenko T.V.², Orekhova V.A.³, Nikitina N.A.³, Karagodin V.P.², Orekhov A.N.², Giral P.⁴, Sobenin I.A.¹

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow 125315, Russia.
E-mail: katrincorde@gmail.com

² — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, Moscow 121609, Russia

³ — Cardiology Research and Production Complex, Moscow, 121500, Russia

⁴ — Dyslipidemia and Atherosclerosis Research Unit, INSERM UMR-S939, and University of Pierre and Marie Curie, Pitie-Salpetriere University Hospital, Paris, France

This population-based international cross-sectional study included 1200 participants without clinical manifestations of atherosclerosis from the Russian and French populations. To assess the susceptibility to the development of atherosclerosis, an ultrasonic evaluation of common carotid arteries was used. It has been analyzed the variability of carotid intima-medial thickness (cIMT) in two samples of participants with an increased risk of atherosclerotic diseases from Paris and Moscow. The role of traditional risk factors such as age, body mass index, lipid profile, in the formation of increase of cIMT has been studied. The most expressed predictive ability in susceptibility to atherosclerosis was the age and the level of low density lipoprotein cholesterol (LDL).

Key words: atherosclerosis; variability; cardiovascular risk factors; carotid intima-media thickness