

Государственное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Казанская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

**МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
17-18 МАЯ 2010 ГОДА**

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

Поддержана грантом РФФИ 10-04-06036-г

Казань 2010

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ
МАРКЕРОВ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ
ПОВРЕЖДЕНИИ ТКАНИ ПЕЧЕНИ**
Анищенко Е.С., Литвинова Л.С., Козенков И.И., Патрушев М.В.,
Гуцол А.А., Селедцова И.А.
Российский государственный университет им. Иммануила
Канта, Калининград, Россия
eanishchenko@innopark.kantiana.ru

Введение.

Хронические диффузные заболевания печени, финальным выражением которых вне зависимости от этиологического фактора, является процесс фиброгенеза, представляют острейшую медико-социальную проблему, относящуюся к приоритетам национальных систем здравоохранения большинства индустриально-развитых стран мира. Фиброгенез представляет собой результат повторяющегося во времени процесса повреждения-восстановления гепатоцитов, которые являются основной мишенью большинства гепатотоксических факторов, включающих вирусы гепатитов, алкоголь, желчные кислоты и т.д. Общеизвестно, что адаптивной реакцией организма, развивающейся в ответ на повреждение органов и тканей является выход в кровь полипотентных и унипотентных стволовых клеток (мобилизация стволовых клеток), обладающих высокой пролиферативной активностью и регенерационным потенциалом и их миграция в поврежденные участки. В связи с этим, актуальным и своевременным является поиск ключевых маркеров, ассоциированных с формированием регенерационного потенциала организма при фиброзе печени.

Целью исследования явилась оценка содержания CD34+ позитивных клеток в периферической крови и исследование экспрессии мРНК TERT у пациентов с фиброзом печени.

Материалы и методы.

Материалом исследования служила венозная кровь, взятая из локтевой вены утром натощак у 44 пациентов с хроническим вирусным гепатитом В (МКБ-10) (из них – 20 женщин и 24 мужчины, в возрасте от 18 до 55 лет). Верификация диагноза у обследованных больных проводилась на основании данных клинико-эпидемиологического, инструментального, серологического (иммуноферментный анализ) и молекулярно-генетического (полимеразная цепная реакция) методов исследования. Все пациенты представляли группу риска по инфицированию парентеральными вирусными гепатитами (в анамнезе были указания о лечении или удалении зубов, оперативных вмешательствах с переливанием крови и ее компонентов, сексуальных и бытовых контактах с больными хроническим вирусным гепатитом, контактах с препаратами крови и больными хроническим вирусным гепатитом у медицинских работников). Контрольную группу составили 20 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³). Для определения поверхностных маркеров гемопоэтических стволовых клеток (CD34⁺) применяли метод проточной лазерной двухцветной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ) к указанным CD-молекулам, меченных флюоресцентными метками (FITC и PE) («Abcam», Cambridge, UK). Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлюориметре «Guava EasyCite Plus» (Guava Technologies (USA) «Millipore») с использованием программы «Guava ExpressPlus» (Guava Technologies (USA), «Millipore»), согласно протоколам фирм-производителей («Abcam», Cambridge, UK). Для количественного определения уровня теломеразной актив-

ности проводилось выделение тотальной клеточной РНК стандартным фенол-хлороформным методом. Далее проводили ОТ – ПЦР. Содержание общего количества копий кДНК определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием установки CFX96 (BioRad, USA) с применением специфичных праймеров к гену TERT, а также GAPDH для нормализации результатов. Количественное выражение обобщенных результатов, проведенных в двух повторах, анализов продуктов ПЦР-РВ, проводилось методом подсчета $2\Delta Ct$.

Результаты. Проведенное нами цитофлюориметрическое исследование содержания CD34⁺-позитивных клеток в популяции мононуклеарных клеток, выделенных у пациентов с ХВГВ, ассоциированных с развитием фиброза, 0-I стадии, показало, что данные параметры оказались сопоставимыми с аналогичными контрольными значениями (норма составляет $2,3 \pm 0,04\%$). В то же время при II и III стадиях фиброзного процесса, содержание CD34⁺-клеток увеличивалось в 2,0 и 3,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с нормой и снижалось в 1,4 раза ($p < 0,05$) у пациентов с IV стадией фибротического процесса. Было показано, что экспрессия мРНК TERT у пациентов с фиброзом печени была повышена на II и III стадиях стадиях фибротического процесса - на 70% по сравнению с уровнем экспрессии TERT у здоровых доноров. Следует отметить, что гемопоэтические CD34⁺-позитивные клетки обладают высокой пролиферативной активностью, которая коррелирует с высокой степенью достоверности с увеличением экспрессии теломеразы.

Заключение. Таким образом, определение содержания в периферической крови CD34⁺-позитивных клеток и исследование экспрессии мРНК TERT может быть использовано как важный прогностический критерий, свидетельствующий о регенеративной активности организма в ответ на повреждение печеночной паренхимы.

THE STUDY OF MOLECULAR AND CELLULAR MARKERS OF REGENERATION IN LIVER TISSUE DAMAGES

**Anishchenko E.S., Litvinova L.S., Kozenkov I.I.,
Patrushev M.V., Guzol A.A., Seledtzova I.A.**

Immanuel Kant State University of Russia, Kaliningrad,
Russia

eanishchenko@innopark.kantiana.ru

Introduction.

The fibrogenesis process is the final result of chronic diffusion diseases of liver. It is the urgent medical-social problem, which is a part of the national health care systems priorities of the world major industrial countries. The fibrogenesis is the result of the repeating hepatocytes damage-restoration process. Hepatocytes are the basic target of the major hepatotoxic factors including hepatitis viruses, alcohol, bilious acids, etc. It is generally known that the adaptive reaction of an organism, developing in reply to the damage of organs and tissues, is the output of polypotent and unipotent stem cells into the blood (stem cells mobilization), which have high proliferation activity and regeneration potential, and their migration to the damaged zones. In connection to this, it is essential to find the key markers, associated with the formation of organism's regeneration potential in conditions of the hepatic fibrosis.

Research purpose is estimate of the CD34+ positive cells in peripheral blood and study expression mRNA TERT of patients with the hepatic fibrosis.

Materials and methods.

The research material was the venous blood, taken from the ulnar vein in the morning on an empty stomach from 44 patients, suffering from the chronic virus hepatitis (MKB-10) (20

women and 24 men, at the age of 18 till 55). Verification of diagnosis in the examined patients was based on clinical and epidemiological data, instrumental, serological (ELISA) and molecular-genetic (polymerase chain reaction) methods. All patients were at risk of infection with parenteral viral hepatitis (a history of guidance on the treatment or removal of teeth, surgical intervention with blood transfusion and its components, sexual and household contacts of patients with chronic viral hepatitis, contact with blood products and patients with chronic viral hepatitis have health workers). The control group was made of practically healthy 20 donors with comparable characteristics of sex and age. Detection of mononuclear leukocytes of the peripheral blood was carried out by the standard method of centrifuging in the density gradient of Ficoll-Paque ("Pharmacia", Sweden) ($\rho=1,077 \text{ g/cm}^3$). In order to define the hemopoietic stem cells surface markers (CD34+), the method of the flowing laser bicoloured cytometry with the usage of mono-channel antibodies (MAB) to the stated CD-molecules, marked by fluorescent labels (FITC and PE) ("Abcam", Cambridge, UK), was used. Results were registered at the cytofluoremetre «Guava EasyCite Plus» (Guava Technologies (USA) "Millipore") by means of «Guava ExpressPlus» (Guava Technologies (USA), "Millipore") program, according to manufacturers ("Abcam", Cambridge, UK) protocols. Total cellular PHK defining was made to detect the telomerization activity level by means of the standard method, involving the use of phenol and chloroform. RT-PCR was made further. Using PCR method in real time, the total amount of cDNA copies was detected at the CFX96 (Biorad, USA) apparatus with the use of specific primers to TERT gene. The GAPDH apparatus was used for results normalization. The generalized results of PCR Real Time products analyses (which were made twice) were done by $2\Delta\text{Ct}$ calculation.

Results.

The cytofluorometric research of CD34+-positive cells amount in the mononuclear cells population detected with the chronic viral hepatitis B patients, associated with the development of 0-I stages fibrosis, revealed that the given parameters are comparable with the similar control values (the norm is $2,3 \pm 0,04$ %). At the same time, at II and III stages of fibrosis process, the amount of CD34+ cells increased in 2,0 and 3,5 times ($p < 0,05$) in comparison with the norm and reduced in 1,4 times ($p < 0,05$) with the patients of IV stage fibrosis. It was also determined, that mRNA TERT expression with the patients at II and III stages of fibrosis process is increased by 70% in comparison with the level of TERT expression with the healthy donors. Hematopoietic CD34 positive cells have high proliferative activity, which is high reliable in telomerase expression increase occurs.

Conclusion.

Thus, defining of CD 34 amount and mRNA TERT expression in peripheral blood can be used as an important prognosis criterion, testifying the regeneration potential of an organism in reply to hepatic tissue damage.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕ- НОВ ЦИТОКИНОВ (TNF- α , IL1b, IL4, IL6), СТЛА4 И RTPN2 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА В ПОПУЛЯЦИИ РЕСПУБЛИКИ ТА- ТАРСТАН

**Биктагирова Э.М.¹, Вавилова Е.В.¹, Кравцова О.А.¹,
Саттарова Л.И.², Вагапова Г.Р.³**

¹-Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, кафедра биохимии, ² - Межрегиональный клинико-диагностический центр, ³- «Казанская государственная медицинская академия росздрава», г. Казань, Россия

elnara-bik@mail.ru

Введение. Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) является одной из актуальных проблем современной эндокринологии, что связано с высокой распространенностью заболевания, отсутствием четких представлений о его патогенезе и лечении. На сегодня выявлены потенциальные гены-кандидаты, ассоциированные с развитием АИТ. К ним относятся гены поверхностного антигена цитотоксических Т- лимфоцитов (CTLA4) и протеинтирозинфосфатазы 22 (RTPN22), кодирующие белок-рецептор CTLA-4 и цитоплазматическую лимфоидспецифичную тирозин фосфатазу соответственно, а также гены провоспалительных (TNF- α , IL1 β , IL6) и противовоспалительных (IL4) цитокинов.

Целью исследования явилось проведение анализа ассоциации полиморфных локусов +49A/G, -318C/T и -1661A/G гена CTLA4, 1858C/T гена RTPN22, -308A/G гена TNF- α , +3953C/T гена IL1 β , -174G/C и +3247A/G гена IL6 и -590C/T гена IL4 с риском развития АИТ в популяции Республики Татарстан (РТ).

Материалы и методы: генотипирование по полиморфным локусам проведено у 137 женщин, больных АИТ с разной степенью увеличения объема щитовидной железы (ЩЖ) и активностью аутоиммунного процесса, который оценивали по уровню антител к тиреопероксидазе и к тиреоглобулину (АТ к ТПО и к ТП). Группу контроля составили 161 женщина без патологии ЩЖ. Образцы ДНК получены из цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Анализ полиморфизмов генов осуществляли методом SSP-ПЦР. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия χ^2 с использованием 95% доверительных интервалов (95%ДИ), оценку ассоциаций полиморфизмов генов с помощью расчета относительного шанса (ОШ).

Результаты: анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров +49A/G, -318C/T и -1661A/G гена CTLA4 и полиморфного локуса 1858C/T гена RTPN22 показал увеличение доли гомозиготного генотипа GG и аллеля G по полиморфному локусу +49A/G в группе больных АИТ, а также гетерозиготного генотипа A/G и аллеля G полиморфизма -1661A/G (ОШ 1,84 ДИ 2,31-1,4 и 1,52 ДИ 2,0-1,1 (соответственно)). Распределение частот сочетаний генотипов по трем полиморфным локусам гена CTLA4 показал, что максимальный риск наблюдается при одновременном присутствии гетерозиготных генотипов по промоторной области и гомозиготного по полиморфному аллелю G экзонной части гена (ОШ 7,87 ДИ 2,03-3,25), а сочетание генотипов по нормальным аллелям гена обладает протективным действием (ОШ 0,25 ДИ 1,21-1,89). Тогда как полиморфный вариант 1858C/T гена RTPN22 не ассоциирован с риском развития АИТ в данной выборке. Анализ полиморфных локусов показал наличие ассоциации генотипа GG по полиморфизму -1661A/G гена CTLA4 с гипотиреозом, и увеличение аллеля T по полиморфизму -318C/T у больных с гипертиреозом; увеличение генотипов GG и AG по полиморфным локусам +49A/G и -1661A/G гена CTLA4 у лиц с повышенным уровнем антител к ТПО и к ТГ.

Аллель G (ОШ 2,03; ДИ 0,065-0,075), генотипы GG (ОШ 3,53; ДИ 0,081-0,066) и AG (ОШ 2,85; ДИ 0,33-0,08) по полиморфному локусу -308A/G гена TNF- α , являются маркерами генетической предрасположенности к АИТ с умеренной активностью аутоиммунного процесса. Частота встречаемости аллеля A значительно увеличена у здоровых лиц (ОШ 0,3; ДИ 0,06-0,07) ($P < 0,05$).

Полиморфный аллель C (ОШ=3,00; ДИ 0,063-0,065) и генотип CC (ОШ 2,08; ДИ 0,031-0,078) локуса +3953C/T гена IL1 β ассоциированы с риском развития АИТ гипертрофической формы 1 степени и с умеренной активностью

аутоиммунного процесса. Носители аллеля Т (ОШ 0,07, ДИ 0,065-0,063) и генотипа ТТ (ОШ 0,04; ДИ 0,075-0,056) достоверно чаще встречаются у здоровых женщин в популяции русских.

Генотипы АГ и АА (ОШ 1,98, 2,03; ДИ 0,11-0,12, 0,12-0,104, соответственно) полиморфизма +3247А/Г гена IL6 ассоциированы с риском развития АИТ с увеличением объема ЩЖ до 1 и 2 степени (соответственно).

Аллель С (ОШ 3,00 ДИ 0,063-0,065) и генотип СС (ОШ 2,08; ДИ 0,031-0,078) полиморфизма -590С/Т гена IL4 являются маркерами предрасположенности к АИТ с умеренной активностью аутоиммунного процесса.

Выводы: полученные данные могут служить основой для определения факторов риска развития АИТ в популяции РТ.

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF CYTOKINE GENES (TNF- α , IL1 β , IL4, IL6), CTLA4 AND PTPN22 WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS IN TATAR POPULATION

Biktagirova E.M.¹, Kravtsova O.A.¹, Sattarova L.I.², Vagapova G.R.³

¹ Department of Biochemistry, Kazan State University, ² Inter-regional clinical diagnostic center, ³ Kazan State Medical Academy of Russian's health, the department of endocrinology, Kazan, Russia

Introduction. Autoimmune thyroiditis (AIT) is one of the urgent problems of modern endocrinology, which is associated with a high prevalence of the disease, lack of clear understanding of its pathogenesis and treatment. Current evidence suggests that susceptibility to AITD is likely to be influenced by the combined effects of several genes and their interactions with enviro-

onmental factors. It's is known a list of potential candidate genes are associated with the development of AITD that includes CTLA4 and PTPN22, also genes of pro- (TNF- α , IL1 β , IL6) and anti-inflammatory (IL4) cytokines.

We analyzed the association of polymorphic loci +49A/G,-318C/T and-1661A/G of CTLA4, 1858C/T of PTPN22,-308A/G of TNF- α , +3953 C/T of IL1 β ,-174G/C and +3247A/G of IL6 and -590C/T of IL4 with the risk of AITD in the female population of the Republic of Tatarstan (RT).

Materials and Methods: We genotyped 137 women with AITD with varying degrees of increase in thyroid gland (TG) and the activity of the autoimmune process, which is assessed by the level of thyroid peroxidase antibodies (Ab to TPO and Tg). The control group included 161 women without thyroid pathology. DNA samples were obtained from whole blood by phenol-chloroform extraction. Analysis of polymorphisms of genes carried by SSP-PCR and PCR-RFLP. Data was analyzed using Chi-square test and 95% confidential interval (CI), an assessment of association of polymorphisms of genes by calculating the relative odds ratio (OR).

Results: The analysis of the distribution of allele and genotype frequencies of polymorphic markers of +49A/G, -318C/T and -1661A/G of CTLA4, polymorphic locus 1858C/T of PTPN22 showed an increasing of homozygous genotype GG and allele G of the polymorphic loci +49A/G in patients with AITD, as well as the genotype A/G and allele G of polymorphism-1661A/G (OR 1.84 CI 2,31-1,4 2,0-1,1 CI and 1.52 (respectively)). The distribution of frequencies of combinations of genotypes for the three polymorphic loci of CTLA4 gene showed that the maximum risk occurs when the presence of heterozygous genotypes of the promoter region and homozygous for the polymorphic allele G of the exons of the gene (OR 7.87 CI 2,03-3,25), and the combination of genotypes including the normal allele has a protective effect (OR 0.25 CI 1,21-1,89). Whereas a

polymorphism 1858C/T of PTPN22 is not associated with AITD in this sample. Analysis of polymorphic loci showed the presence of the association of genotype GG for polymorphism-1661A/G of CTLA4 with hypothyroidism, and increased T allele of polymorphism-318C/T in patients with hyperthyroidism, an increasing of genotypes GG and AG of polymorphic loci +49A/G and-1661A/G CTLA4 gene in individuals with elevated levels of antibodies to TPO and to Tg.

It's shown, allele G (OR 2.03, CI 0,065-0,075), genotypes GG (OR 3.53, CI 0,081-0,066) and AG (OR 2.85, CI 0,33-0,08) for polymorphic locus-308A/G of TNF- α , are markers of genetic predisposition to AITD with moderate activity of autoimmune process. The frequency of allele A is significantly increased in healthy individuals (OR 0.3, CI 0,06-0,07) ($P < 0,05$).

The polymorphic allele C (OR 3.00, CI 0,063-0,065) and the CC genotype (OR 2.08, CI 0,031-0,078) of 3953C/T of IL1 β are associated with AITD hypertrophic forms of first degree and with moderate activity of autoimmune process. Carriers of T allele (OR 0.07, CI 0,065-0,063) and TT genotype (OR 0.04, CI 0,075-0,056) were significantly more common in healthy Russian women

AG and AA genotypes (OR 1.98, 2.03, CI 0,11-0,12, 0,12-0,104, respectively) of polymorphism +3247A/G of IL6 are associated with AITD to the increase in thyroid to first and second degrees (respectively).

C allele (OR 3.00 CI 0,063-0,065) and the CC genotype (OR 2.08, CI 0,031-0,078) of polymorphism -590C/T of IL4 are markers of predisposition to AITD with moderate activity of autoimmune process.

Conclusions: The findings may serve as a basis for determining risk factors for AITD in Tatar women.

МАЛЫЕ G-БЕЛКИ СЕМЕЙСТВ RAS И RHO В РЕГУЛЯЦИИ ОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ

**Габдулхакова А.Г.¹, Филина Ю.В.^{1,2}, Арлеевская М.И.¹,
Сафронова В.Г.³**

1 – Казанская Государственная Медицинская Академия, 2 –
Казанский Государственный университет, Казань, 3 –
Институт Биофизики клетки РАН, Пущино, Московская об-
ласть

Общепринято, что оксидазная активность нейтрофильных гранулоцитов наряду с фагоцитозом и секреторной дегрануляцией обеспечивает противомикробную защиту организма. Часто воспалительные процессы сопровождаются окислительным стрессом вследствие избыточной продукции активных форм кислорода (АФК). В регуляцию активности NADPH оксидазы вовлечена большая сеть поверхностных рецепторов и внутриклеточных посредников. Хемотаксический пептид fMLF (N-formyl-Met-Leu-Phe) является продуктом деградации, как бактериальных белков, так и собственных митохондриальных белков, высвобождающихся из некротических клеток. В зависимости от концентрации, fMLF способен активировать хемотаксис, дегрануляцию и респираторный взрыв нейтрофилов вследствие активации рецепторов, связывающих лиганд с разной аффинностью. Как было показано ранее, праймирование fMLF-вызванного респираторного взрыва нейтрофилов мыши инсулином происходило только при активации клеток высокими дозами формилированного пептида (Сафронова и др., 2006, 2009), т.е. при активации высоко-аффинных рецепторов fMLF предобработка инсулином не вызывала усиления ответа на последующую стимуляцию, для этого была необходима активация низко-аффинных рецепторов формилированного пептида. Использование специфических ингибито-

ров p38MAPK и ERK (SB203580 и PD098059, соответственно) вызывало значительное подавление ответа на 1 микроМ fMLF, тогда как ответ на 50 микроМ fMLF на фоне блокаторов усиливался. Для выяснения роли малых G-белков в сигнализации рецепторов формилированных пептидов высокой и низкой аффинности, мы исследовали влияние активаторов и блокаторов Ras, Rho и Rac/Cdc42 белков на вызванный fMLF респираторный ответ нейтрофилов. Работа была проведена на вызванных перитонеальных нейтрофилах мышей инбредной линии BALB/6. Продукцию АФК оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) по площади под кривой зависимости интенсивности ХЛ от времени. Мы обнаружили, что обработка клеток специфическим активатором Rac/Cdc42-белков (1 ед. акт./мл, CN02, «Cytoskeleton») вызывало значительное усиление ответа на 1 микроМ fMLF (до 60%) и не меняло ответ на 50 микроМ fMLF. Rac1/2-белки являются компонентами NADPH оксидазы и их дополнительная транслокация к плазматической мембране и оксидазе под действием активатора CN02, возможно, привела к усилению ответа при стимуляции высокоаффинных рецепторов fMLF. Отсутствие эффекта при активации низкоаффинных рецепторов fMLF, вероятно, может объясняться тем, что оба агента активируют один пул Rac-белков. Предполагается, что в отличие от Rac-белков, которые положительно регулируют оксидазную активность, активация Rho-белков вызывает реорганизацию клеточного цитоскелета, полимеризацию актина и подавление оксидазной активности клеток. В наших экспериментах специфический активатор Rho-белков (1 ед. акт./мл, CN01, «Cytoskeleton») усиливал ответ на 1 микроМ fMLF и подавлял ответ на 50 микроМ fMLF. Специфический ингибитор Rho-белков (1 микрограмм/мл, CT04, «Cytoskeleton») вызывал значительное подавление респираторного ответа нейтрофилов, вызванного как низкими, так и высокими дозами fMLF.

Блокада активности Rho-белков предотвращает активацию киназы легкой цепи миозина и последующую полимеризацию актина, вследствие чего, видимо, предотвращает перемещение цитозольных компонентов NADPH оксидазы и сборки всего комплекса при активации продукции АФК как через высоко-, так и низко-аффинные рецепторы fMLF. Специфический блокатор Ras-белков (Ras inhibitory peptide, "Sigma") в концентрации 5 микроМ/мл вызывал подавление ответов на fMLF в высокой и низкой концентрациях. Предварительные результаты показали, что выявляемые количества дважды фосфорилированной формы p38MAPK (western blot) появляются при стимуляции клеток 50 микроМ fMLF, добавление ингибитора Ras-белков предотвращает фосфорилирование p38 MAPK при стимуляции fMLF. Полученные данные позволяют нам предположить, что сигнализация через высоко- и низко-аффинные рецепторы fMLF зависит от Rho-активируемых модификаций цитоскелета и Ras-зависимой активации каскада MAPK киназ. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №, 09-04-97053.*

RAS AND RHO FAMILY SMALL G-PROTEINS IN REGULATION

OF THE NEUTROPHIL OXIDASE ACTIVITY

Gabdoulkhakova A.G.¹, Filina Yu.V.^{1,2}, Arleevskaya M.I.¹, Safronova V.G.³

1 – Kazan State Medical Academy, 2 – Kazan State University, Kazan, 3 – Institute of cell biophysics of RAS, Pushchino, Moscow region, Russia.

It generally accepted that neutrophil oxidase activity along with phagocytosis and secretory degranulation provides antibacterial defense of the organism. Inflammatory processes are often accompanied by oxidative stress owing to redundant reactive oxygen species (ROS) production. The complex net of the sur-

face receptors and intracellular mediators are involved in tight control of the NADPH oxidase activity. Chemotactic peptide fMLF (N-formyl-Met-Leu-Phe) could be a product of degradation both bacterial proteins and intrinsic mitochondrial proteins released from necrotic cells. Depending on concentration fMLF is able to induce chemotaxis, degranulation and respiratory burst following to the ligand-receptor binding with distinct affinity. As it has been shown the insulin priming of the fMLF-induced respiratory burst of the mouse neutrophils occurred under activation of the cells with high dosage of formylated peptide only (Safronova et al, 2006, 2009), i.e. there was no insulin potentiating effect on the neutrophil respiratory response under the activation of the high-affinity fMLF receptors while the activation of low-affinity fMLF receptors promotes insulin priming. p38MAPK and ERK specific inhibitors SB203580 and PD098059, correspondingly, induced considerable repression of the cell responses to 1 μ M fMLF whereas the response to 50 μ M fMLF under the inhibitors was increased. To reveal the role of the small G-proteins in signaling from high- and low-affinity receptors of formylated peptides we study the effects of the specific cell permeable activators and inhibitors of Ras, Rho and Rac/Cdc42 proteins on the fMLF-induced neutrophil respiratory burst. The work has been done on the evoked peritoneal neutrophils of BALB/6 inbred strain mice. ROS production was estimated by luminol-dependent chemoluminescence technique as an area under the curve of dependence of the chemiluminescence intensity on the time. We have found that the neutrophil treatment with specific Rac/Cdc42 activator (1 unit/ml, CN02, «Cytoskeleton», USA) resulted in significant increase (up to 60%) of the cell response to the following stimulation with 1 μ M fMLF and did not affect the response to 50 μ M fMLF. Rac1/2 proteins are the subunits of the large NADPH oxidase complex, its additional translocation to the plasma membrane towards the oxidase under the treatment by CN02 probably provides the en-

hancement of ROS generation in response to stimulation of high-affinity fMLF receptors. The lack of CN02 effect under the stimulation of low-affinity fMLF receptors could be explained by concurrent activation of the same pool of the Rac-proteins by both agents. It is assumed that in contrast to Rac-proteins positively regulating oxidase activity the Rho-proteins induce cell cytoskeleton reorganization, actin polymerization and suppression of oxidase activity. In our experiments specific Rho activator (1 unit/ml, CN01, «Cytoskeleton») increased ROS production in response to 1 μ M and suppressed the response onto 50 μ M fMLF. Specific Rho inhibitor (1 μ g/ml, CT04, «Cytoskeleton») resulted to considerable suppression of the neutrophil ROS production triggered by both low and high dosages of fMLF. The suppression of Rho-proteins abolishes the activation of the myosin light chain kinase and following actin polymerization, so it probably prevents the translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to plasma membrane and their association independently from the high- or low affinity fMLF receptors to be activated. Five μ M/ml of specific Ras inhibitor (Ras inhibitory peptide, «Sigma») induced slight suppression of the ROS production in the response to low and high dosages of formylated peptide fMLF. Concerning our raw data we detect double-phosphorylated form of p38MAPK in the neutrophils stimulated with 50 μ M fMLF in western blot analysis using whole cell lysis, pretreatment with Ras inhibitor prevents double phosphorylation of the p38MAPK under fMLF stimulation. Related to obtained results we can speculate that both high and low affinity fMLF receptors signaling depends on the Rho-activated cytoskeleton reorganization and Ras-dependent activation of MAPK kinase cascades. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №, 09-04-97053.*

НЕЙРОНАЛЬНЫЕ АУТОАНТИТЕЛА У ДЕТЕЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА.

Лотош Н.Ю.¹, Селищева А.А.^{1,3}, Савельев С.В.^{2,3}

¹ АНО «Институт биомедицинских проблем»

² НИИ Морфологии человека РАМН

³ Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

almostvelvet@rambler.ru

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) является аутоиммунным заболеванием, при котором под действием активированных Т-лимфоцитов гибнут бета-клетки поджелудочной железы (ПЖ), продуцирующие инсулин.

Принято считать, что такие факторы окружающей среды, как вирусы, токсины, стресс способствуют развитию СД1 у людей с генетической предрасположенностью.

Рассматривается также нейрональный механизм возникновения СД1. Согласно этой точке зрения, в результате нарушения структурной организации и функционирования нервных окончаний поджелудочной железы белки нервной ткани становятся доступными для клеток иммунной системы. По этой теории, аутоиммунная атака направлена также на клетки периферической нервной системы.

Для доказательства «нейрогенной» теории возникновения СД1Т методом ИФА определяли уровни аутоантител к нейрональным (нейро АТ) белкам S100, GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок), NGF (фактор роста нервов) и ВМР (основной белок миелина) в сыворотке крови 76 детей и подростков (3-17 лет) с диагнозом СД1Т, с разными сроками заболевания (с момента диагностирования и до 13 лет), а также у здоровых братьев и сестер заболевших детей (сиблеры). Наряду с этим проводили электромиографическое обследование на наличие/отсутствие признаков ди-

стальной полинейропатии (ДПН), которую принято рассматривать как осложнение СД1.

По сроку заболевания были сформированы группы: I группа – впервые выявленные (10 чел.); II группа – срок болезни менее 1 года (21 чел.); III группа – болеющие более от одного года до 13 лет (43 чел.); IV группа – сиблеры (2 чел.).

Установили, что ДПН встречается с высокой частотой в каждой из групп и ее наличие не коррелирует со сроком заболевания. Так, у детей со сроком заболевания более года частота выявления ДПН была 86%. У каждого из пяти обследованных детей с впервые выявленным диабетом и у одного из двух здоровых детей с семейным СД1 также были выявлены признаки ДПН.

Повышенный уровень нейро АТ наблюдался у 20% обследованных в группе I, у 50% в группе II, у 42% в группе III и у одного из сиблеров. Не выявлено зависимости повышенного уровня нейро АТ от срока заболевания и наличия ДПН.

Итак, наличие признаков ДПН у детей с впервые выявленным диабетом и сиблеров позволяют предположить участие нейрогенных механизмов в развитии СД1Т. В дальнейшем предполагается исследовать свойства нейро АТ при различных сроках заболевания.

NEURONAL AUTOANTIBODIES IN SERUM OF THE CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES

Lotosh N.G.¹, Selishcheva A.A.^{1,3}, Savel'ev S.V.^{1,2}

¹ ANO «Institute of biomedical problems»

² Research Institute of Human Morphology of the Russian Academy of Medical Sciences

³ Lomonosov Moscow State University

almostvelvet@rambler.ru

Type 1 diabetes mellitus (T1D) results from a T cell-mediated autoimmune destruction of the insulin-producing pancreatic beta cells.

It seems a whole number of environmental factors, such as viruses, diet, toxins and stress may be involved in the T1D initiation in subjects with genetic predisposition.

Also neurogenic mechanism of T1D onset is researching. According to this point of view, structural and function disturbances of pancreas nerve endings result in visibility of neuronal proteins for immune system cells. Therefore, the autoimmune attack also directed against peripheral nervous system cells.

The aim of present study is to prove the neurogenic theory of the T1D origin. Study participant were 76 patients of Russian Children's Clinical Hospital – children and adolescents (3-17 age) with a different duration of T1D (from newly diagnosed to 13 years) and their healthy brothers and sisters (siblings). The sera of the children with T1D were tested by ELISA for neuronal autoantibodies (neuro AB) levels against S100, GFAP (glial fibrillar acid protein), NGF (nerve growth factor) and BMP (basic myeline protein). In addition to that children were subjected to electromyography for present or absence of the distal polyneuropathy signs (DPN). Actually the DPN is considered as widespread complications.

Groups of patients have been generated on disease term: I group - newly diagnosed (10), II group - less than a year (21), III - more than a year and IV – siblings (2).

It has been established that DPN meets high frequency in each of groups. Presence of DPN does not correlate with disease term. So in group I frequency of revealing was 86%. Each of the five patients of group I subjected to electromyography and also child in a group IV consisting of two children displayed the DPN signs.

The raised antibodies level was observed at 20% in group I; at 50% in group II; at 42% in group III and one of two siblings. The dependences of the DPN presence on the term of the T1D were not revealed.

Thus, signs of DPN in children with newly diagnosed diabetes and siblings allow to assume participation of neurogenic mechanism in T1D onset. Further it is supposed to investigate neuro AB properties with different terms of disease.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ГЕСТОЗУ У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН

Мальцева Л.И.¹, Павлова Т.В.¹

¹– Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия
olivka1703@rambler.ru

Введение: Гестоз остается наиболее тяжелым осложнением беременности с неизученными до конца этиологией и патогенезом, отсутствием радикальных методов лечения. Хорошо известна большая группа риска по развитию гестоза (гипертензивные состояния, болезни почек, ожирение). Среди них наибольший удельный вес занимают больные с патологией почек. На сегодняшний день огромное значение придается генетическим факторам.

К генетическим факторам, с которыми может ассоциироваться гестоз, относят гены МТНFR, его вариант МТНFR-С677Т, АGТ-М235Т, АСЕ I/D, ген протромбина, NO-синтазы, мутация V фактора Лейдена, дефицит протеина С, S и др.

Описано две разновидности гена метилентетрагидрофолатредуктазы МТНFR– обозначаемые как мутация С677Т. У лиц, гомозиготных по данной мутации, отмечается термолабильность МТНFR и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения. Такая мутация сопровождается повышением уровня гомоцистеина крови, что является риском развития нефропатии у беременных. Другой важный аспект мутации МТНFR-С677Т– фолат-дефицитная анемия, которая дополнительно усугубляет гипоксию, течение диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови и, тем самым, способствует прогрессированию микроциркуляторных расстройств и утяжелению гестоза.

Большое значение в развитии гестоза имеют генотипы ангиотензиногена – АGТ-М235Т. Мутация меняет взаимодействие ангиотензиногена с ренином и ангиотензинпревращающим ферментом, что может вызвать развитие гестоза у беременных – носителей мутации.

В последние годы открыто существование вариантов генотипа ангиотензинпревращающего фермента – АСЕ I/D. У пациентов, гомозиготных по аллели D, уровень ангиотензинпревращающего фермента в 2 раза превышает уровень фермента у гомозиготных по аллели I. Полиморфизм гена АСЕ I/D и АGТ-М235Т слабо связан с частотой и течением хронической артериальной гипертензии вне беременности, но может быть фактором риска развития гипертензии у беременных.

Очевидно, что гестоз имеет целый ряд генов предрасположенности, поэтому выявление генов – кандидатов,

предрасполагающих к развитию гестоза, может помочь в определении группы риска и проведении эффективной профилактики этой тяжелой патологии. Особенно непредсказуем гестоз у первородящих женщин и его связь с генетическими факторами чрезвычайно интересна. В связи с этим, целью исследования явилось изучение роли некоторых генетических факторов в развитии гестоза у первородящих женщин.

Материалы и методы: обследованы 100 первородящих женщин на сроках 27-38 нед.: из них, 39 беременных с разной степенью тяжести гестоза (26 - легкой, 9 - средней, 4 - тяжелой); 41 женщина без клиники гестоза, но из группы высокого риска: с ожирением – 3, гипертоническим синдромом – 4, пиелонефритом – 34; 20 – практически здоровых первородящих женщин.

У всех пациенток, кроме общеклинического обследования с оценкой гемостазиограммы (агрегация тромбоцитов: спонтанная и индуцированная; уровень фибриногена, АЧТВ, МНО, 12а зависимого фибринолиза, АТ III, РКМФ, ПДФ, пламиноген, определение протеина С и S), исследовали кровь методом ПЦР в реальном времени по детекции полиморфизма генов AGT-M235T (ангиотензиногена), ACE I/D (ангиотензинпревращающего фермента), MTHFR-C677T (метилентетрагидрофолатредуктазы). Исследуемые гены оценивали со всеми вариантами их мутаций (AGT-T235T, ACE D/D, MTHFR-T677T). Методом иммунохемилюминисцентного анализа (ИХА) определяли уровень фолиевой кислоты (ФК), ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) и ренин – ангиотензина (РА).

Результаты: В контрольной группе первородящих женщин молекулярно-генетическое исследование выявило наличие нормальных вариантов исследуемых генов и РА, АПФ. Уровень ФК был снижен на 15% от нормы у 8 из 20 беременных.

В группе риска – у беременных с ожирением установлен мутантный вариант МТНFR-T677T с незначительным снижением ФК и повышением АПФ. У одной из них был обнаружен малый порок развития плода (незаращение неба – «волчья пасть»). Мутантный вариант МТНFR-T677T также выявлен у всех женщин с гипертоническим синдромом, у одной из них – в сочетании с мутантным вариантом полиморфизма гена ACE D/D и незначительное повышение уровня РА. У 14 женщин с пиелонефритом обнаружен мутантный вариант полиморфизма гена ACE D/D, двухкратное повышение уровня РА, незначительное снижение ФК, при этом в гемостазиограмме отмечено незначительное повышение плазминогена и фибриногена.

У беременных с гестозом мутация изучаемых генов всегда сочеталась с резким снижением уровня ФК и значительным повышением РА.

В основной группе у 8 беременных с легким гестозом обнаружены мутантные гены: у 3–МТНFR-T677T, у 4– ACE D/D, у одной женщины – сочетание этих двух мутантных вариантов. У всех беременных наблюдались изменения в коагулограмме в виде повышения содержания плазминогена и фибриногена.

Среди женщин с гестозом средней степени тяжести: у 5 установлен мутантный ген ACE D/D, у 4– МТНFR-T677T. При исследовании гемостаза выявлено незначительное повышение Д-димера, плазминогена и фибриногена.

Все беременные с тяжелым гестозом имели сочетание двух мутантных вариантов генов ACE D/D и МТНFR-T677T, двухкратное повышение АПФ. При этом отмечено трехкратное увеличение Д-димера, гиперфибриногенемия, значительная гиперагрегация тромбоцитов, гиперкоагуляция, снижение АТ-III, что подтверждало активно текущий ДВС-синдром.

У пациенток, имеющих мутации в гене MTHFR, помимо гестоза, клинически наблюдали ЗВУР плода, у двух из них была частичная отслойка нормально расположенной плаценты на сроках 27 и 37 нед. беременности.

Экспрессия мутантных генов со снижением ФК и повышением РА всегда сопровождалась нарушением в системе гемостаза и гипертензивным синдромом разной степени тяжести. Начальные признаки ДВС-синдрома были отмечены при легком и среднетяжелом течении гестоза, выраженный хронический ДВС-синдром – при тяжелом течении гестоза.

Выводы: Развитие гестоза у первородящих женщин, вероятнее всего, генетически детерминировано; фолатдефицитные состояния являются дополнительными, потенцирующими патологию, факторами.

Выявленные особенности определяют особые подходы к профилактике и лечению гестоза у первородящих женщин.

THE GENETIC ASPECTS OF THE PREDISPOSITION TO THE GESTOSIS IN PRIMIPARA WOMEN

Maltseva L.I.¹, Pavlova T.V.¹

¹– Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Olivka1703@rambler.ru

Introduction: Gestosis remains one of the most common complications of pregnancy with undefined etiology and pathogenesis and with the absence of radical methods of treatment. There is well determined a huge group of conditions such as hypertensive diseases, kidney diseases, obesity which are associated with the high risk of the development of gestosis. Among them the major part consists of the patients with kidney diseases. Nowadays a big deal refers to genetic factors.

The genetic factors which seem to be associated with gestosis development are genes MTHFR, its variation MTHFR-C677T, AGT-M235T, ACE I/D, prothrombin gene, NO-synthase gene, mutation of the Leiden's V factor, deficit of C and S proteins etc.

There are reported 2 types of the gene of methylenetetrahydrofolatreductase (MTHFR) defined ad a mutation of C677T. In homozygotic people with this mutation a thermolability of MTHFR and decrease of the enzyme activity till 35% of mean value is reported. Such mutation is accompanied by increase of the level of blood homocysteinwhich carries a risk of the nephropaty development in pregnants. Another important aspect of the mutation of MTHFR-C677T is folat deficiency anemia which, in its turn, aggravates hypoxia, the course of DIC syndrome and, so, promotes to the progression of the microcirculatory disturbances and more severe course of gestosis.

In the development of gestosis the genotypes of angiotensinogen AGT-M235T play a big role. The mutation changes the interaction between rennin and angiotensin converting enzyme which can bring to the development of gestosis in the pregnant carriers of the mutations. Recently the new versions of the genotype of the angiotensin converting enzyme (ACE I/D) have been discovered. In patients who are homozygotic by the D allele the level of ACE is twice higher than that in homozygotes by the I allele. The polymorphism of the gene ACE I/D and AGT-M235T is hardly related to the incidence and course of the arterial hypertension out of pregnancy but can be a risk factor for the development of hypertension during pregnancy.

It is obvious, that gestosis has series of genes of predisposition, that is why the determination of genes-candidates, predisposing to the gestosis development can be helpful in the determination of groups with higher risk and in the maintenance of effective prophylaxis of this severe pathology. The gestosis is es-

pecially unpredictable in primipara women. Its relation to genetic factors is extremely interesting. In the connection with this, the aim of this study was to investigate the association of functionally important polymorphic versions of the endothelial NO-synthase gene with the development of gestosis in primipara

Materials and methods: 100 primipara women with gestational age 27-38 weeks were studied. 39 of them were pregnant women with the gestosis with different levels of severity (26 - mild, 9 - moderate, 4 - severe). 41 women were without clinical evidence of gestosis, but from the group with the high risk (obesity – 3, hypertensive syndrome – 4, pyelonephritis– 34). 20 other women were completely healthy primipara.

In all women, besides general clinical investigations with the evaluation of hemostasiogramm (platelet aggregation: spontaneous and induced, fibrinogen level, APTT, INR, 12a dependent fibrinolysis, AT III, FMSC, FDP, plasminogen, determination of C and S proteins) the blood was investigated by real-time PCR for detection of polymorphism of genes AGT-M235T (angiotensinogen), ACE I/D, MTHFR-C677T. We compared investigated genes with all versions of their mutations (AGT-T235T, ACE D/D, MTHFR-T677T). By the immunochemoluminescent analysis (ICA) we determined the level of folic acid (FA), ACE and rennin-angiotensin (RA).

Results: In the control group of primipara women the molecular-genetic investigation revealed the presence of normal versions of studied genes and RA, ACE. The level of FA was decreased by 15% from the normal level in 8 from 20 pregnant women.

In the risk group, the pregnant women with obesity the mutational version of MTHFR-T677T with the slight decrease of FA and increase of ACE was revealed. One of them had a fetus with malformation (cleft palate). The mutational version MTHFR-T677T also was determined in all women with hypertensive syndrome. One of them had this gene with mutational

version of polymorphism of gene ACE D/D and slight increase of the level RA. 14 women with pyelonephritis had mutational version of the polymorphism of gene ACE D/D, twice increase of RA, slight decrease of FA, and according to hemostasiogram a slight increase of plasminogen and fibrinogen was noticed.

The mutation of investigated genes in pregnant women always was accompanied by sharp decrease of the FA level and significant increase of RA.

In the main group 8 pregnant women with mild gestosis had mutational genes: 3 of them MTHFR-T677T, 4 of them had ACE D/D, and 1 of them had combination of these 2 mutational versions. All pregnant women had changes in coagulograms as an increase of the level of plasminogen and fibrinogen.

Among women with moderate gestosis 5 had mutational gene ACE D/D, 4 of them had MTHFR-T677T. When studying hemostasis there was revealed slight increase of D-dimer, plasminogen and fibrinogen.

All pregnant women with severe gestosis had combination of 2 mutational versions of genes ACE D/D and MTHFR-T677T, twice increase of ACE. The thrice increase of D-dimer, hyperfibrinogenemia, significant hyperaggregation of platelets, hypercoagulation, decrease of AT-III, which proved the active course of DIC syndrome.

The patients who have mutations in the gene MTHFR, besides gestosis, the clinical evidence of IGDR of the fetus was revealed. 2 of them had partial detachment of normal placenta on the gestational age 27-37 weeks.

The expression of mutational genes with the decrease of FA and increase of RA was always accompanied by disturbance in the hemostasis system and by hypertensive system of various severity. Initial signs of DIC-syndrome were reported in the case of mild and moderate gestosis, and chronic DIC syndrome was noticed in severe forms of gestosis.

Conclusions: The development of gestosis in primipara women appears to be genetically determined. Folic-deficiency conditions are additional factors aggravating the pathology.

Revealed characteristics define special approaches to the prophylaxis and treatment of gestosis in primipara women.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ БЕРЕ- МЕННОСТИ У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕ- НОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

**Л.И.Мальцева¹, И.М.Игнатъев², Е.Ю. Юпатов¹, Е.Е.
Фомина³**

¹ – Казанская Государственная Медицинская Акаде-
мия, ² – Казанский Государственный Университет, ³- Меж-
региональный клинико-диагностический центр, Казань,
Россия

evguenii@yahoo.com

Хроническая венозная недостаточность – это обще-
медицинская проблема, с которой ежедневно сталкиваются
врачи всех специальностей, от знания и квалификации кото-
рых зависит результат борьбы с этой "болезнью цивилиза-
ции". Известно, что у беременных с ХВН с различной часто-
той встречаются такие осложнения как – патология пупови-
ны (24-26%), несвоевременное излитие околоплодных вод
(22-24%), кровотечение в третьем периоде родов и раннем
послеродовом периоде (18%), слабость родовой деятельно-
сти (15%), ранний токсикоз (10%), гестоз (10%), хрониче-
ская внутриутробная гипоксия плода (10%), тромбоэмболи-
ческие осложнения (10%), послеродовой эндометрит (7%),
преждевременная отслойка нормально расположенной пла-
центы (2%).

Мы обследовали 80 беременных на сроке 12-40 недель
гестации, проводили ультразвуковое дуплексное ангиоска-

нирование вен нижних конечностей и малого таза, волнометрия (измерение окружности нижней конечности), исследование системы гемостаза (D-димера, фибриногена, АТ-III, XIIa-зависимого фобринолиза, протеина С и S), ЭЛИ-ангиотест (15 беременных с привычным невынашиванием и ХВН), доплерометрия фето-плацентарного кровотока и маточно-плацентарного кровотока, КТГ плода.

По нашим данным, осложнения беременности у женщин с ХВН распределились следующим образом: пиелонефрит 40 (50%), ранний токсикоз 30 (37,5%), угроза прерывания беременности 20 (25%), отслойка хориона в I триместре 6 (7,5%), маловодие 2 (2,5%). У 10 (12,5%) женщин наблюдали снижение фетоплацентарного кровотока по данным доплерометрии и внутриутробное страдание плода по данным КТГ у 6 (7,5%) пациенток.

Ультразвуковое дуплексное ангиосканирование, которое на сегодняшний день является золотым стандартом в диагностике состояния венозной системы, позволило выявить варикозное расширение вен малого таза – 100%, варикозное расширение большой подкожной вены – 30 (37,5%), недостаточность клапанов большой подкожной вены - 28 (35%), недостаточность вен-перфорантов - 12 (15%), недостаточность клапанов малой подкожной вены - 6 (7,5%), недостаточность клапанов глубоких вен - 4 (5%) пациенток.

Исследование системы гемостаза показало признаки хронического ДВС синдрома у 62,5% беременных с ХВН, снижение активности протеина С и S (5% в общем), в одном случае – выявлена резистентность к V фактору Лейдена. Необходимо отметить, что нами не было выявлено других причин тромбофилических состояний, т.е. можно предположить, что ХВН исходно сопровождается ХДВС.

Помимо гемостазиограммы мы исследовали аутоиммунные нарушения у беременных с ХВН. Обращает на себя внимание повышенная продукция А-АТ к коллагену, инсу-

лину, что является признаком воспалительных изменений в стенке вен, антител к эндотелию сосудов ANCA, и к мембране тромбоцитов TRM03, а так же к паренхиме почек КiM-05. В качестве терапии применялась ежедневная компрессионная терапия. Начальная дозировка Флебодиа 600 – 2 т. в сутки в течение 4 недель, поддерживающая доза – 1 т. в сутки до 34 недель беременности

При наличии признаков хронического ДВС синдрома – в сочетании с низкомолекулярными гепаринами по 0,3 подкожно ежедневно под контролем гемостазиограммы в результате которой достоверно изменялись маллеолярный объем, диаметр вен н/к и м/т, а также снижалось содержание d-димера. Путем операции кесарево сечение по показаниям со стороны плода были родоразрешены 5% пациенток, остальные через естественные родовые пути. Средняя масса новорожденных составила $3,250 \pm 240,3$ гр. Все дети, родившиеся от этих женщин имели оценку по Апгар 6-9 баллов. Средняя кровопотеря в родах $260 \pm 53,3$ мл.

Выводы:

- У беременных с ХВН наиболее часто развивается патология почек, ранний токсикоз, угроза прерывания беременности
- У 62,5 % беременных с ХВН имеются признаки хронического ДВС, поэтому необходимо обследовать таких пациентов на расширенную гемостазиограмму
- Высокие титры А-АТ к TrM-03, ANCA, Кл могут служить основанием для прогнозирования развития ХВН

В лечение беременных с ХВН помимо компрессионной терапии целесообразно включать венотоники и низкомолекулярные гепарины

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ МЕТИЛЕН- ТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ И ДЕФИЦИТ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ КАК ФАК- ТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ГЕСТОЗА У ПЕРВОРОДЯ- ЩИХ ЖЕНЩИН

Мальцева Л.И.¹, Павлова Т.В.¹

¹– Казанская Государственная Медицинская Акаде-
мия,

Казань, Россия

Olivka1703@rambler.ru

Введение: Одной из актуальных проблем современно-го акушерства является проблема гестоза, причины возникновения которой четко не обозначены. Существуют данные, свидетельствующие о наличии генетической предрасположенности к развитию гестоза. Особенно непредсказуем гестоз у первородящих женщин.

За последние годы изучена группа генов, принимающих участие в метаболизме фолиевой кислоты. Высокие концентрации активной формы фолиевой кислоты необходимы для превращения избытка гомоцистеина в метионин. В фолатном цикле задействованы разные ферменты. Основной из них, обеспечивающий превращение фолиевой кислоты на этапах цикла, является метилентетрагидрофолатредуктаза. Снижение активности этого фермента – одна из причин накопления гомоцистеина в организме, который повреждающе действует на эндотелий сосудов и стимулирует тромбообразование. Это приводит к нарушению плацентации и расстройствам фетоплацентарного кровообращения, на поздних сроках беременности – плацентарной недостаточности, задержке внутриутробного развития и хронической гипоксии плода. Одним из важных факторов, способствующих увеличению уровня гомоцистеина в крови, может быть наследственная предрасположенность.

Полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы наиболее изучен. Описано две разновидности гена метилентетрагидрофолатредуктазы МТНFR – обозначаемые как мутация С677Т. У лиц, гомозиготных по данной мутации, отмечается термоллабильность МТНFR и снижение активности фермента примерно до 35% от среднего значения. Такая мутация сопровождается повышением уровня гомоцистеина крови, что является риском развития нефропатии у беременных. Повышение частоты аллеля 677Т было отмечено не только при гестозе, но и при других осложнениях беременности (отслойке плаценты, задержке роста плода, антенатальной смерти плода, дефекты развития нервной трубки плода, «заячья губа», «волчья пасть»). Другой важный аспект мутации МТНFR-С677Т – фолат-дефицитная анемия, которая дополнительно усугубляет гипоксию, течение диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови и, тем самым, способствует прогрессированию микроциркуляторных расстройств и утяжелению гестоза.

В связи с этим, целью исследования явилось изучить роль генетического полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНFR-С677Т) и дефицита фолиевой кислоты (ФК) в развитии гестоза и других акушерских осложнений (плацентарная недостаточность, ЗВУР и ВПР плода, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты) у первородящих женщин.

Материалы и методы: обследованы 92 первородящие женщины на сроках 27-38 нед.: из них, 37 беременных с разной степенью тяжести гестоза (17 - легкой, 12 - средней, 8 - тяжелой); 35 женщин без клиники гестоза, но из группы высокого риска: с ожирением – 5, гипертоническим синдромом – 9, пиелонефритом – 21; 20 – практически здоровых первородящих женщин.

У всех пациенток, кроме общеклинического обследования с оценкой гемостазиограммы (агрегация тромбоци-

тов: спонтанная и индуцированная; уровень фибриногена, АЧТВ, МНО, 12a зависимого фибринолиза, АТ III, РКМФ, ПДФ, плазминоген, определение протеина С и S), исследовали кровь методом ПЦР в реальном времени по детекции полиморфизма гена MTHFR-C677T (метилентетрагидрофолатредуктазы), со всеми вариантами мутаций (гомозиготный вариант MTHFR-T677T, гетерозиготный вариант MTHFR-C677T). Методом иммунохемилюминисцентного анализа (ИХА) определяли уровень фолиевой кислоты (ФК).

Результаты: В контрольной группе первородящих женщин выявлен нормальный вариант гена MTHFR-C677C, показатели гемостазиограммы в пределах нормы. Уровень ФК был снижен у 8 из 20 беременных.

У 15 женщин группы риска обнаружен нормальный вариант гена MTHFR-C677C, у 18- гетерозиготный вариант MTHFR-C677T, где аллель T, в сочетании с дополнительными, потенцирующими патологию факторами, увеличивает риск развития осложнений беременности. Все эти женщины имели незначительное снижение уровня ФК в крови. У двух беременных группы риска определили мутантный вариант MTHFR-T677T в сочетании с начальными признаками ДВС-синдрома и снижением уровня ФК в 2 раза. У одной из них выявлен малый порок развития плода (незаращение неба – «волчья пасть») и незначительное повышение в гемостазиограмме плазминогена и фибриногена.

У беременных с гестозом мутация гена MTHFR-C677T всегда сочеталась с резким снижением уровня ФК.

Из 17 женщин с гестозом легкой степени у 3 выявлен нормальный вариант гена, 9 беременных имели гетерозиготный вариант MTHFR-C677T, что клинически реализовалось в плацентарную недостаточность, ЗВУР плода I-II ст., у 5 женщин с мутантным вариантом MTHFR-T677T также наблюдали ЗВУР плода II ст., хр. внутриутробную гипоксию,

маловодие. В гемостазиограмме всех женщин с легким гестозом было выявлено незначительное повышение D-димера, фибриногена, пламиногена, снижение АТ-III, т.е. начальные признаки ДВС-синдрома.

Среди беременных с гестозом средней степени: у 7 обнаружен мутантный вариант МТНFR-Т677Т, у 5- гетерозиготный вариант МТНFR-С677Т, у 3 первородящих женщин с тяжелым гестозом выявлен гетерозиготный вариант МТНFR-С677Т и у 5-мутантный вариант МТНFR-Т677Т. У всех этих женщин диагностировали хронический ДВС-синдром, прогрессирование которого у 2 беременных с мутантным вариантом МТНFR-Т677Т привело к преждевременной отслойке нормально расположенной плаценты.

Таким образом, сочетание мутации гена МТНFR-Т677Т с дефицитом ФК у беременных всегда сопровождается хроническим ДВС-синдромом различной степени тяжести и гипертензией. Снижение уровня ФК при нормальном варианте гена МТНFR-С677С во время беременности не приводит к развитию гипертензивного синдрома, но реализуется большей частотой плацентарной недостаточности и ЗВУР плода.

Можно полагать, что определение содержания уровня ФК, а также маркеров внутрисосудистого свертывания и маркеров врожденных дефектов системы гемостаза (полиморфизм С677Т в гене МТНFR) является прогностически значимым в диагностике развития гестоза, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, плацентарной недостаточности, ЗВУР и ВПР плода.

THE GENETIC POLYMORPHISM OF METHYLENTETRAHYDROFOLATREDUCTASE ANB FOLIC ACID DEFICIENCY AS RISK FACTORS OF THE DEVELOPMENT OF GESTOSIS IN PRIMIPARA WOMEN

Maltseva L.I.№, Pvlova T.V. №

№– Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Olivka1703@rambler.ru

Introduction: One of the most prominent problems of modern obstetrics is the problem of the gestosis the causes of which are ill defined. There are some data witnessing about the presence of the genetic predisposition to the development of gestosis. Gestosis is especially unpredictable in primipara women.

A group of genes participating in the folic acid metabolism have been studied recently. High concentrations of the active type of folic acid are necessary for converting the excess of homocysteine to the methionin. Different enzymes participate in the foliate cycle. The main one which maintains the conversion of folic acid on the several levels of the cycle is methylenetetrahydrofolatreductase. The decrease of this enzyme activity is one of the reasons of homocysteine accumulation in the body which harms the vessel endothelium and stimulates thrombogenesis. This brings to the disturbance of placentation and to the insufficiency of fetoplacental blood circulation. On the later gestational ages it brings to the placental insufficiency, retardation of intrauterine development and chronic hypoxo of the fetus. One of the most important factors promoting to the increase of the homocysteine level in the blood can be hereditary predisposition.

The polymorphism of the methylenetetrahydrofolatreductase gene is the most studied one. There are described two variations of the methylenetetrahydrofolatreductase (MTHFR) gene known as mutation C677T. Patients who are homozygotic

for this mutation have thermolability of MTHFR and decrease of the activity of enzyme till about 35% of the mean value. This mutation is accompanied by the increase of the homocysteine level in the blood which is a risk factor for the development of the nephropathy of pregnant. The increase of the frequency of the allele 677T was noticed not only during gestosis but also in other complications of the pregnancy (detachment of the placenta, retardation of the growth of the fetus, antenatal death of the fetus, neural tube malformations, hare lip, cleft palate). Another important aspect of the mutation MTHFR-C677T is folate deficiency anemia which additionally aggravates hypoxia, the course of the disseminated intravascular coagulation and thus, promotes to the progression of microcirculatory disturbances and more severe course of gestosis.

In connection with this the aim of this study was to investigate the role of the genetic polymorphism of the methyltetrahydrofolatreductase gene (MTHFR-C677T) and the folic acid deficiency in the development of gestosis and other obstetric pathologies (placental insufficiency, IGDR, premature detachment of the normally located placenta) in the primipara. Materials and methods: 92 primipara were studied on the gestational ages 27-38 weeks. 37 of them were pregnant women with the different levels of the gestosis (17 - mild, 12 - moderate, 8 – severe). 35 women didn't have any clinical evidence of gestosis but they had high risk factors such as obesity in 5 women, hypertensive syndrome - 9 women, pyelonephritis-21 and 20 women were completely healthy primipara.

In all women, besides general clinical investigations with the evaluation of hemostasiogramm (platelet aggregation: spontaneous and induced, fibrinogen level, APTT, INR, 12a dependent fibrinolysis, AT III, FMSC, FDP, plasminogen, determination of C and S proteins) the blood was investigated by real-time PCR for detection of polymorphism of genes MTHFR-C677T. We compared investigated genes with all versions of their muta-

tions (AGT-T235T, ACE D/D, MTHFR-T677T). By the immunochemoluminescent analysis (ICA) we determined the level of folic acid (FA), ACE and rennin-angiotensin (RA).

Results: In the control group of primipara the normal version of the MTHFR-C677C gene was detected, the findings of hemostysiogramm were within normal limits. Folic acid level was decreased in 8 women from 20.

15 women from the risk group had normal version of the gene MTHFR-C677C, 18 of them had heterozygotic version of MTHFR-C677T, where the T allele with combination of additional pathology potentiating factors increases the risk of the development of the complications of the gestosis. All these women had slight decrease of the blood level of FA. In two women from the risk group a mutational version of the MTHFR-T677T was detected in combination with signs of the DIC-syndrome and the blood level of FA was decreased twice in these women. One of them had fetus malformation (cleft palate) and slight increase of plasminogen and fibrinogen according to the hemostysiogramm.

In pregnant women with gestosis the mutation of the gene MTHFR-C677T always was accompanied by the sharp decrease of the FA level.

3 of the 17 women with mild gestosis had the normal version of the gene, 9 women had heterozygotic version of MTHFR-C677T which was clinically realized as placental insufficiency, fetus IGDR I-II level, in 5 women with the mutational version of MTHFR-T677T also the IGDR of fetus was noticed, as well as chronic hypoxia of fetus, oligoamnion. The hemostysiogramm of all women with mild gestosis showed slightly increase of D-dimer, fibrinogrn, plasminogen, decrease of AT -III, e.g. initial signs of DIC-syndrome.

Among the women with moderate gestosis 7 had mutational version of MTHFR-T677T, 5 had heterozygotic version of MTHFR-C677T. 3 primipara with severe gestosis had heterozygotic version of MTHFR-C677T and 5 of them had MTHFR-

T677T. All these women were diagnosed to have chronic DIC-syndrome which progression in 2 pregnant women with the mutational version MTHFR-T677T brought to the premature detachment of normally located placenta.

Finally, the combination of the mutation of the MTHFR-T677T gene with the FA deficiency in pregnant is always accompanied by chronic DIC-syndrome of various severity and hypertension. The decrease of FA level during pregnancy in the case of normal version of MTHFR-C677C gene doesn't bring to the development of hypertensive syndrome but frequently is realized as placental insufficiency and fetus IGDR.

It seems that the detection of the FA level as well as the factors of intravascular coagulation and markers of inborn defects of the hemostasis system (polymorphism of C677T in the MTHFR gene) is a prognostically significant factor in the diagnosis of gestosis, partial detachment of normal placenta, placental insufficiency, IGDR and congenital malformations of the fetus.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРРОВИРА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВПЧ-ИНФЕКЦИИ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ ЭКЗО- И ЭНДОЦЕРВИЦИТОМ

Мальцева Л.И., Фаррахова Л.Н.

Кафедра акушерства и гинекологии №1

Казанская Государственная Медицинская Академия, Ка-
зань, Россия

lifara@mail.ru

Целью исследования явилось изучение влияния Ферровира на эффективность терапии и частоту возникновения рецидивов ВПЧ-инфекции у женщин с хроническим экзо- и эндоцервицитом.

Материалы и методы: обследовано 25 женщин с признаками хронического цервицита и ВПЧ-инфекцией. Проведено общеклиническое, культуральное исследование, ПЦР-диагностика специфических инфекций, цитологическое исследование мазков из шейки матки, расширенная кольпоскопия, морфологическое исследование прицельно взятого биоптата. По виду терапии все пациентки были разделены на 2 группы. В первую вошли 14 женщин, которые наряду с антисептиками (гексикон, бетадин и т.п.), антибактериальными и восстанавливающими биоциноз влагалища препаратами получали индуктор интерферона Лавомакс. Во второй группе 11 пациенток - в сочетании с препаратом Ферровир (по 5,0 мл 1,5% раствора, внутримышечно 1 раз в сутки, с интервалом в 72 часа, курс - 10 инъекций). Ферровир - противовирусное средство с иммуномодулирующими свойствами, который эффективен в отношении различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Активным действующим веществом его является натриевая соль нативной высокоочищенной деполимеризованной двуспиральной дезоксирибонуклеиновой кислоты природного происхождения, модифицированная ионами железа. Эффективность терапии оценивалась дважды: через 6 и 12 месяцев после окончания лечения с применением расширенной кольпоскопии, цитологии и ПЦР-типирования.

Результаты. Положительный клинический эффект был получен у всех больных. Через 6 месяцев после окончания лечения ВПЧ-инфекция выявлялась у 4 пациенток первой группы, а через 12 месяцев папилломавирус был обнаружен уже у 7 женщин. У пациенток второй группы - 100% элиминации вируса.

Таким образом, применение ферровира позволяет добиться лучших результатов лечения и отсутствия рецидивов ВПЧ-инфекции, что позволяет применять его в качестве им-

муномодулирующего и противовирусного средства без использования препаратов интерферона.

EXPERIENCE WITH FERROVIR THE TREATMENT OF HPV INFECTION IN WOMEN WITH CHRONIC CERVICITIS

Maltseva L.I., Farrahova L.N.

Department of Obstetrics and Gynaecology № 1
Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

lifara@mail.ru

The aim of the research was to study the effect Ferrovir on the effectiveness of therapy and the incidence of recurrence of HPV- infection in women with chronic exo-and endocervicitis.

Materials and methods: we investigated 25 women with symptoms of chronic cervicitis and HPV infection. By type of therapy the patients were divided into 2 groups. The first group included 14 women who received interferon inductor Lavomax. In the second group had 11 patients who were treated with the Ferrovir. Ferrovir - an antiviral agent with immunomodulatory properties, which is effective against various DNA and RNA-containing viruses. Treatment efficacy was assessed after 6 and 12 months after treatment with the use of colposcopy, cytology and PCR studies.

Results. Positive clinical effect was obtained in all patients. 6 months after the treatment of HPV infection detected in 4 patients of the first group, and after 12 months of papillomavirus has been detected already in 7 women. Patients of the second group was 100% elimination of the virus.

Thus, the use of Ferrovir can achieve better results of treatment of HPV infection, which allows its use as an immunomodulatory and antiviral agent without the drugs interferon.

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ АУТОАНТИТЕЛ В ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА

Мальцева Л.И., Осадчая Д.И.

Казанская государственная медицинская академия
nigraf81@mail.ru

Воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) у женщин представляют собой сложную и недостаточно изученную проблему, обуславливающую серьезные медицинские, социальные и экономические потери во всем мире. В научной литературе имеются указания на то, что частота «репродуктивных неудач» приблизительно в 6-10% случаев бывает обусловлена генными или хромосомными дефектами, тогда как не менее 90% подобных ситуаций обуславливается нарушениями иммунорегуляторных механизмов (Полетаев А.Б., Морозов С.Г., Ковалев И.Е., 2002). Малочисленны и неоднозначны данные о роли системного иммунитета у женщин с привычным невынашиванием беременности и хроническим эндометритом (Сидельникова В.М. и соавт., 2003; Соловьева А.Е. и соавт., 2005; Сухих Т.Г. и соавт., 2005; Beer A.E. et al., 1998).

В этой связи целью работы явилась оценка прогностической значимости некоторых регуляторных аутоантител в генезе возникновения различных форм хронического эндометрита

Обследовано 57 женщин с различными проявлениями нарушений репродуктивной функции (бесплодие, привычное невынашивание беременности). Помимо общеклинического обследования определяли сывороточное содержание аутоантител (метод ИФА) класса IgG связывающихся с хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ); двуспиральной ДНК; β 2-гликопротеином I; аутоантителами к β 2-глико-

протеину I; Fc фрагментами иммуноглобулинов (ревматоидный фактор); коллагеном Кл; белком S100; белком MP-65; маркерами патологии почек, тромбоцитопатий, васкулитов — TrM 05-12, ANCA, Kim — 05-40; специфическим белком филаментов аксонов — NF-200; мембранным антигеном сперматозоидов SPR-06. В эндометрии иммуногистохимически определяли лимфоциты, экспрессирующие маркеры естественных киллерных клеток CD56+, CD16+ и маркеры активации HLA-DR(II)+.

У всех обследуемых женщин выявлялся хронический эндометрит, что подтверждалось гистероскопической картиной и морфологическим исследованием.

Анализ иммуногистохимических изменений эндометрия позволил нам разделить контингент пациенток на две группы: первая - хронический аутоиммунный эндометрит (при количестве клеток, экспрессирующих CD56+ выше 10, и при количестве клеток, экспрессирующих CD16+ и HLA-DR(II)+ от 0 до 10 в поле зрения), и вторая группа - без аутоиммунного компонента (бактериальный) (при количестве клеток, экспрессирующих CD16+ выше 10, и при количестве клеток, экспрессирующих CD56+ и HLA-DR(II)+ от 0 до 10 в поле зрения диагностируют хронический эндометрит).

Изменения в сывороточном содержании аутоантител у 40 женщины 1-ой группы с привычным невынашиванием и бесплодием в анамнезе, выявили тенденцию к превышению физиологической нормы по антителам к Кл (45 у. е.), мембранному антигену сперматозоидов SPR-06 (32 у.е), в меньшей степени наблюдалось повышение антител к ДНК (22 у.е). При этом средние показатели содержания других исследованных аутоантител оставались в пределах нормальных значений. Особенностью гистероскопической картины хронического эндометрита явилась очаговая гиперплазия эндометрия.

Анализ контрольных биоптатов эндометрия показал отсутствие

микробного и/или вирусного агента у пациенток первой группы.

При сравнительном анализе содержания а-АТ у 25 женщин второй группы наблюдалось патологическое превышение уровней аутоантител к Fc-фрагменту иммуноглобулина (33 у.е.), в а также к антигену эндотелия сосудов (ANCA). В ткани эндометрия всегда выявлялась персистенция микроорганизмов. С большей частотой в эндометрии обнаруживалась аэробная микрофлора, а также микоплазмы.

Изменение содержания регуляторных аутоантител очевидно свидетельствует об участии иммунологических механизмов в патогенезе хронического эндометрита.

THE ROLE OF REGULATORY AUTOANTIBODIES IN THE DIAGNOSIS OF CHRONIC ENDOMETRITIS

Maltseva L.I., Osadchaya D.I.

Kazan State Medical Academy

nigraf81@mail.ru

Inflammatory diseases of pelvic organs (PID) in women are complex and insufficiently studied problem, which is linked to serious medical, social and economic losses worldwide. In the literature there are indications that the frequency of "reproductive failures" in approximately 6-10% of cases is caused by gene or chromosomal defects, while at least 90% of such situations is caused by disorders of immunoregulatory mechanisms (Poletayev AB, Morozov SG G., Kovalev I.E, 2002). Scarce and ambiguous data on the role of immunity in women with habitual miscarriage and chronic endometritis (Sidelnikova VM, et al.

2003; Solov'eva AE, et al., 2005; Dry TG, et al., 2005 ; Beer AE et al., 1998).

In this regard, to work was to evaluate the prognostic significance of certain regulatory autoantibodies in the pathogenesis of various forms of chronic endometritis

The study involved 57 women with various manifestations of reproductive disorders (infertility, habitual miscarriage). In addition to physical examination determined the content of serum autoantibodies (ELISA) IgG class binding to human chorionic gonadotropin (hCG), double-stranded DNA; β 2-glycoprotein I; autoantibodies to β 2-glycoprotein I; Fc fragments of immunoglobulins (rheumatoid factor), collagen Kd; protein S100 ; protein MP-65, markers of renal pathology, BPD, vasculitis-TrM 05-12, ANSA, Kim - 05-40; specific protein filaments of axons - NF-200; sperm membrane antigen SPR-06. In the endometrium immunogistotsitohimicheski determined lymphocytes expressing markers of natural killer cells CD56 +, CD16 + and activation markers HLA-DR (II) +.

All of the surveyed women was revealed chronic endometritis, which was confirmed by hysteroscopic picture and morphological study.

Analysis of immunohistochemical changes of the endometrium has allowed us to divide the contingent of patients into two groups: the first - a chronic autoimmune endometriosis (when the number of cells expressing CD56 + is above 10, and the number of cells expressing CD16 + and HLA-DR (II) + 0 to 10 in the field of view), and the second group - without autoimmune component (bacterial) (if the number of cells expressing CD16 + is above 10, and the number of cells expressing CD56 + and HLA-DR (II) + 0 to 10 in the field of view is diagnosed chronic endometritis).

Changes in Serum autoantibodies in 40 women first group with habitual miscarriage and infertility in anamne \neg se, showed a tendency to exceed the physiological norm for antibodies to

the CI (45 ue), sperm membrane antigen SPR-06 (32 ue), to a lesser extent, there was an increase of antibodies to DNA (22 ue). With an average content of other autoantibodies studied remained within normal values. The peculiarity of hysteroscopic picture of chronic endometritis was a focal hyperplasia of the endometrium.

Analysis of the control biopsies of the endometrium showed no microbial and / or viral agent in patients of the first group.

A comparative analysis of the content of a-AT in 25 women of the second group observed a pathological excess levels of autoantibodies to the Fc-fragment antibody (33 ue), as well as in vascular endothelial antigen (ANCA). In endometrial tissue always reveal persistence of microorganisms. With greater frequency in the endometrium revealed aerobic microflora, as well as mycoplasma.

Changes of regulatory autoantibodies oche see evidence of involvement of immunological fur nisms in the pathogenesis of chronic endometritis.

АНТИТЕЛА К ДНК В НОРМЕ И ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Невзорова Т.А., Сабирзянова А.З., Иванова В.В., Мурадинова Р.Э.

Кафедра биохимии, Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина

TNevzorova@mail.ru

Антитела к ДНК являются естественным компонентом иммунной системы, но иногда их патологические возможности увеличиваются, что приводит к развитию аутоиммунных заболеваний.

Характерным признаком системной красной волчанки (СКВ) является высокий уровень содержания в крови больных ДНК-связывающих и ДНК-гидролизующих антител класса IgG, которые, предположительно, являются одной из причин поражения тканей и органов. В последнее время *in vitro* и *in vivo* было показано, что некоторые антитела класса IgG к нативной ДНК (нДНК) больных СКВ способны проникать в различные клетки и ядра и индуцировать их морфологические и функциональные изменения.

На сегодняшний день в литературе существуют противоречивые данные о происхождении, механизмах действия, биологической роли как ДНК-связывающих, так и ДНК-гидролизующих антител.

Обнаружено, что в сыворотках крови больных СКВ и ревматоидным артритом повышено содержание антител к ДНК класса IgG, которые обладают ферментативной активностью и гидролизуют плазмидную ДНК pBR-322.

Так как патологические антитела к ДНК класса IgG могут отличаться по физико- и иммунохимическим свойствам, в процессе работы из сывороток крови здоровых людей, больных СКВ и ревматоидным артритом получены субфракции антител класса IgG к нативной ДНК, различающиеся по заряду и сродству к нДНК. Антитела к ДНК больных СКВ и ревматоидным артритом гидролизуют ДНК.

Было обнаружено, что антитела к ДНК больных аутоиммунными заболеваниями и здоровых доноров по-разному влияют на жизнеспособность и метаболизм клеток крови человека *in vitro*.

Вероятно, антитела к ДНК могут вмешиваться в процессы репликации, репарации и рекомбинации ДНК, что приводит к изменению пролиферации и апоптоза клеток.

В докладе обсуждается возможная биологическая роль антител к ДНК.

ANTIBODIES TO DNA WITH HEALTH AND AUTOIMMUNE DISEASES

**Nevezorova T.A., Sabirzyanova A.Z., Ivanova V.V.,
Muradimova R.E.**

Department of Biochemistry, Kazan State University
TNevezorova@mail.ru

Antibodies to DNA are a natural component of the immune system, but sometimes their pathological opportunities are increasing, which leads to the development of autoimmune diseases.

The feature of systemic lupus erythematosus (SLE) is a high level in the blood of IgG with DNA-binding and DNA-hydrolyzing activities, which presumably is one of the reasons to destroy of tissues and organs. Recently, *in vitro* and *in vivo* studies have shown that some of the IgG to native DNA (dsDNA) of SLE patients are able to penetrate into various cells and induce morphological and functional changes.

However in the literature there are conflicting data about origin, mechanisms of action, biological role both DNA-binding and DNA-hydrolyzing antibodies.

We found that in the blood serum of patients with SLE and rheumatoid arthritis elevated content of antibodies to DNA class IgG, which possess DNA-hydrolyzing activity to pBR-322.

IgG to DNA may differ in physicochemical and immunochemical properties. From the blood serum of healthy people, patients with SLE and rheumatoid arthritis we are derived sub-fractions of antibodies to native DNA, differing in charge, and affinity to dsDNA. Antibodies to DNA of patients with SLE and rheumatoid arthritis are hydrolyzed DNA.

It was found that antibodies to DNA of patients with autoimmune diseases and healthy donors have different effects on the viability and metabolism of human blood cells *in vitro*.

Probably, antibodies to DNA can interfere with the processes of replication, repair and recombination of DNA, which leads to a change in cell proliferation and apoptosis.

In the report a possible biological role of IgG antibodies to DNA are discussed.

ДЛИНА ТЕЛОМЕР КЛЕТОК ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФРАКЦИИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЧЕСТВА ОБРАЗЦА

Новикова П.Ю.^{1,2}, Смирнова Н.В.^{1,2}, Смолянинов А.Б.¹

¹ - ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия, ² - Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

polina_novik@mail.ru

Теломеры – это концевые участки хромосом, состоящие из повторяющейся последовательности ДНК и комплекса белков, которые формируют и стабилизируют защитную петлевую структуру, позволяющую системе репарации отличать концы хромосом от двойных разрывов ДНК. В связи с проблемой недорепликации концов хромосом, теломерные области ДНК укорачиваются при каждом делении клетки. Данный молекулярный механизм является ограничителем пролиферативного клеточного потенциала. В клетках, способных делиться практически неограниченно – эмбриональные стволовые клетки, клетки герментативной линии, а так же большинство раковых клеток - активно экспрессируется теломераза, которая способна достраивать теломеры или/и активируется альтернативный путь удлинения теломер. В процессе дифференцировки стволовых кле-

ток активность теломеразы утрачивается, поэтому зрелые производные стволовых клеток делятся ограниченное число раз.

Целью данного исследования являлся анализ уровня гетерогенности образцов пуповинной крови по критерию средней длин теломер клеток лейкоцитарной фракции.

Измерение теломер проводилось методом flow-FISH, в котором используются специальные зонды - пептидо-нуклеиновые кислоты, комплементарные повторяющейся теломерной последовательности, связанные с флуоресцентным красителем FITC. Одновременная окраска на ДНК позволяет выбрать для анализа только клетки на стадии G0/G1. В качестве внешнего контроля использовали стандартную клеточную линию Т-лимфобластоидной лейкемии 1301, характеризующуюся стабильной длиной теломер вне зависимости от пассажа.

В данной работе были проанализированы 8 образцов ПК. Средняя длина теломер клеток лейкоцитарной фракции ПК составила $18,19 \pm 3,9$ % от контрольной линии, что полностью соответствует литературным данным.

Стандартные методы характеристики качества образца пуповинной крови (ПК) для трансплантации, включают количество и жизнеспособность гематопоетических стволовых клеток, их активность КОЕ, соответствие требуемой дозе, рассчитанной на килограмм веса пациента, отсутствие контаминации. Из литературных данных известно, что эффективность приживления напрямую коррелирует с длиной теломер в клетках трансплантата. Поэтому дополнительная характеристика пролиферативной активности стволовых клеток, оцениваемая по длине теломер, может стать информативным показателем качества трансплантата.

TELOMERE LENGTH OF CORD BLOOD LEUKOCYTE FRACTION CELLS AS ADDITIONAL CHARACTERISTIC OF SAMPLE QUALITY

Novikova P.Y.^{1,2}, Smirnova N.V.^{1,2}, Smolyaninov A.B.¹

¹ – Stem Cell Bank Pokrovski, Saint-Petersburg, Russia, ² -
Institute of Cytology of RAS, Saint-Petersburg, Russia

polina_novik@mail.ru

Telomeres are regions of repetitive DNA at the end of a **chromosome** with protein complex, which form and stabilize protective loop structure. This process lets reparation system to distinguish chromosomes ends from DNA double-breaks. Telomeres shorten with each cell division because of the “end replication problem”. This molecular mechanism limits proliferative potential of cells. Embryonic stem cells, germ-line cells, and most of cancer cells can go throw nearly unlimited number of divisions, due to telomerase height level expression or alternative lengthening of telomeres. Activity of telomerase loses, when stem cells became differentiated.

The main goal of this work was to analyze the heterogeneity level of cord blood (CB) sample by average telomere length criteria.

Telomere length was measured by flow-FISH method. We used special complementary telomere sequence peptide nucleic acid probes with FITC. Simultaneous DNA staining allows choosing G₀/G₁ cells for analysis. Cell line 1301 (T cell lymphoblastic leukemia) was used as external control, because this cells have stable telomere length.

There were analyzed 8 cord blood samples in this work. Average telomere length of CB mononuclear cells was 18,19 ± 3,9 % respectively control cells. This result completely corresponds to literature data.

Standard methods of CB sample quality characterization for transplantation include quantity and viability of hematopoietic stem cells, CFC activity, matching necessary dose per kilogram patient weight, contamination absence. It was known that engraftment efficiency positively correlates with telomere length of graft cells. That is why additional characteristic of stem cell proliferation activity by telomere length can be an informative indicator of transplant quality.

РЕГУЛЯЦИЯ ОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННЫМИ МЕХАНИЗМАМИ У БЕРЕМЕННЫХ И ИХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ
Сафронова В.Г.¹, Матвеева Н.К.², Ломова Н.А.², Ванько Л.В.²

¹ – ГУ Институт биофизики клетки РАН (ИБК РАН), Пущино, Россия; ² – ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздравсоцразвития, Москва, Россия
safronova@icb.psn.ru

Генерация активных форм кислорода (АФК) при фагоцитозе частиц или активации растворимыми бактериальными продуктами представляет одну из основных цитотоксических функций гранулоцитов. Формирование механизмов, вовлеченных в регуляцию активности NADPH оксидазы, ответственной за генерацию АФК в фагоцитах, происходит вне- и внутриутробно. Ранее мы показали, что гранулоциты детей от матерей с осложненным течением беременности имеют особенности регуляции, выражающиеся в повышенной реактивности и высокой экспрессии рецепторов с низкой аффинностью к бактериальному пептиду N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF). В данной работе исследованы рецеп-

тор-опосредованные реакции гранулоцитов периферической крови беременных женщин и пуповинной крови детей, относящихся к группе высокого инфекционного риска, с целью выявления возможных прогностических признаков, основанных на оценке интенсивности генерации АФК клетками крови беременной женщины. Работа выполнена на нефракционированной крови и изолированных гранулоцитах с применением хемилюминесцентной техники, ингибиторного и активаторного анализа и люминесцентной микроскопии.

Получены следующие основные результаты: 1) реакция на опсонизированный зимозан, характеризующая кислород-зависимый специфический фагоцитоз, была более интенсивной в нефракционированной крови женщин, имеющих высокий инфекционный риск, по сравнению с контрольной группой. В пуповинной крови детей всех групп наблюдалась пониженная продукция АФК, что имело положительную корреляцию с базовым уровнем продукции АФК. Наиболее низкое значение отмечено в группе детей с проявлением инфекции в раннем неонатальном периоде; 2) изолированные гранулоциты матерей и детей групп риска проявляли большую активность в ответ на воздействие бактериальным пептидом fMLF, на что указывает понижение пороговой концентрации более чем на порядок по сравнению с клетками пациентов контрольных групп. Продукция АФК и амплитуда ответа гранулоцитов, выделенных из пуповинной крови детей групп риска, на fMLF в высоких концентрациях (0,1-10 мкМ) в 2 раза превышали параметры клеток детей контрольной группы, у беременных таких различий не отмечено; 3) в группе детей с проявлением инфекции наблюдается устойчивая тенденция к усилению продукции АФК, активированной 0,01 мкМ fMLF, в клетках, праймированных ФНО- α , ЛПС из *E.coli* и инсулином, тогда как гранулоциты детей контрольной группы не реагировали

на праймирование оксидазной активности через рецепторы перечисленных веществ и рецептор формилпептида. Таким образом, повышенный уровень продукции АФК при фагоцитозе опсонизированных частиц и повышенная чувствительность к праймированию ЛПС и ФНО- α могут служить прогностическими признаками проявления инфекции у новорожденного.

REGULATION OF OXIDASE ACTIVITY IN GRANULOCYTES FROM BLOOD OF PREAGNANT WOMEN AND UMBILICAL CORD BY RECEPTOR-MEDIATED MECHANISMS

Safronova V.G.¹, Matveeva N.K.², Lomova N.A.², Vanko L.V.²

¹ – Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (ICB RAS), Pushchino, Russia; ² – V.I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Moscow, Russia

safronova@icb.psn.ru

Generation of reactive oxygen species (ROS) during the processes of particles engulfing or cell activation by soluble bacterial products represents one of the basic cytotoxic functions of granulocytes. Mechanisms involved in regulation of NADPH oxidase, ROS producing enzyme in phagocytes, develop extra- and intrauterine. We have shown earlier, that granulocytes from cord blood of babies from women with the complicated pregnancy are characterized with such features as increased reactivity and a high expression of the low affinity receptors to a bacterial peptide N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF). In the present work we studied the receptor-mediated reactions of granulocytes from peripheral blood of pregnant women and cord blood of their babies with high infectious risk to reveal possible prognost-

ic signs basing on an assessment of ROS generation intensity in the blood cells of pregnant women. Whole blood and isolated granulocytes were tested by chemiluminescence technique. Inhibitory and activator analysis and luminescent microscopy were applied.

It was found that reaction on opsonized zymosan, characterizing oxygen-dependent specific phagocytosis, was more intensive in the whole blood of women with high infectious risk in comparison with control. Decreased ROS production was revealed in the umbilical cord blood of children that correlated positive with base level of ROS production. The lowest value is noted in the group of children with infection manifestation in the early neonatal period. Isolated granulocytes from pregnant women and their babies from the infectious risk groups showed the higher activity initiated with bacterial peptide fMLF: threshold concentrations were nearly one order lower in these cells in comparison with the cells of the patients of control groups.

Amplitude and intensity of ROS production initiated with 0,1-10 mkM fMLF in granulocytes from cord blood of risk group children exceeded in 2 times parameters of the cells in control group children. It was not obtained such distinctions in the groups of pregnant women. In the group of children with infection manifestation it was found a steady tendency to increase the granulocyte ROS production induced with 0,01 mkM fMLF in the cells primed with TNF- α , LPS from *E.coli* and insulin. Whereas granulocytes of children from control group did not react on priming of oxidase activity mediated with receptors for these substances and formylpeptide. Thus, increased level of ROS production accompanied phagocytosis of opsonized particles and high receptivity of granulocytes to priming with TNF- α and LPS could be prognostic indications of infectious manifestation at a newborn infant.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОДУКЦИИ РАДИКАЛОВ КИСЛОРОДА И ИНТЕНСИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ИХ КРОВНЫХ РОДСТВЕННИКОВ

Семенова О.М., Хорошева А.Е., Габдулхакова А.Г., Арлеевская М.И.

Государственная Медицинская Академия, РКБ №3
МЗ РТ, Казань

Предпосылками к исследованию были следующие положения.

- Для хронического воспалительного процесса характерен высокий уровень продукции АФК.
- Высокий уровень продукции АФК и окисление ими липопротеидов – фактор риска развития атеросклероза.
- Ревматоидный артрит – хронический воспалительный процесс, одним из осложнений которого является раннее развитие атеросклероза.
- Родственники больных РА предрасположены к развитию этого заболевания.
- Родственники больных РА подвержены частым длительным банальным инфекциям [Арлеевская и соавторы, 2005].

Цель исследования – изучение взаимосвязей уровней окисленных липидов и продукции АФК в группах

- больных РА (n =22)
- здоровых кровных родственниц I степени родства (n =13)
- здоровых женщин с не отягощенной аутоиммунными заболеваниями наследственностью (n =23)

Методы

- Исследование продукции АФК в цельной крови - люминол-зависимая хемилюминесценция (объект фагоцитоза - опсонизированный зимозан).
- Исследование продукции АФК во взвесах лейкоцитов - люминол-зависимая хемилюминесценция. Объект фагоцитоза – опсонизированный зимозан (ОЗ).
- Исследование концентрации окисленных сывороточных липидов по содержанию ТБК – активных продуктов (ТБК-АП), ТБК – АГАТ.
- Статистическая обработка – непараметрические критерии Уилкоксона, корреляционный анализ.

Результаты.

При РА, как и ожидалось, уровень ТБК – АП ($2,9 \pm 1,17$ мкмоль/л) в 1,7 раза превышал показатель контрольной группы ($1,7 \pm 0,57$ мкмоль/л), однако при большом разбросе данных, обусловленном, вероятно, существенной гетерогенностью заболевания, разница была недостоверной.

В группе РОД выявлено достоверное выраженное повышение концентрации ТБК – АП ($7,9 \pm 4,3$ мкмоль/л). Следует подчеркнуть, что, несмотря на частые длительные очаговые инфекции, на момент исследования у лиц этой группы отсутствовали клинические и лабораторные признаки воспалительного процесса.

При близких спонтанных уровнях продукции АФК лейкоцитами в группах (контроль – $21,4 \pm 16,9$ уе, РА – $23,8 \pm 22,3$ уе, РОД $21,3 \pm 13,6$ уе), концентрация радикалов кислорода в цельной крови больных РА ($9,5 \pm 8,7$ уе) была достоверно более высокой по сравнению с контролем ($4,1 \pm 3,1$ уе), что, вероятно, свидетельствует о недостаточности «ловушек» радикалов.

В группе РОД показатель спонтанной продукции АФК в цельной крови ($6,0 \pm 4,6$ уе) в 1,5 раза превышал показатель контроля, однако, разница была недостоверной.

Стимуляция лейкоцитов опсонизированным зимозаном приводила к повышению выработки АФК во всех группах, однако, и у больных ($180,72 \pm 163,7$ уе), и у РОД ($194,36 \pm 161,3$) пиковые показатели стимулированной хемилюминесценции превышали таковой в контроле ($88,1 \pm 72,3$ уе).

У больных при наличии хронического воспалительного процесса и наличии множества провоспалительных факторов в крови это повышение представляется закономерным. У условно здоровых РОД выявленное повышение ответа лейкоцитов на опсонизированный зимозан в отсутствие острого и, тем более, хронического воспаления представляется неожиданным и, возможно, связано с праймингом лейкоцитов в процессе частых длительных инфекций.

При исследовании стимулированной хемилюминесценции в цельной крови выявлено выраженное повышение пиковой концентрации АФК у больных РА ($166,9 \pm 106,1$ уе) по сравнению с контролем ($48,3 \pm 16,1$ уе). В группе родственников ($77,0 \pm 37,4$ уе) этот показатель был также достоверно повышен.

Взаимосвязь изучавшихся параметров

У Д уровень сывороточных ТБК – АП находится в прямой корреляции со спонтанной продукцией АФК в цельной крови ($r = 0,46$, $p < 0,013$).

При РА уровень сывороточных ТБК – АП находится в обратной (!) корреляции со спонтанной продукцией АФК в цельной крови ($r = - 0,39$, $p < 0,047$).

При РА обратная корреляция уровней ТБК – АП со спонтанной продукцией АФК во взвесах лейкоцитов – еще более тесная ($r = - 0,67$, $p < 0,00001$).

У родственников сывороточные ТБК – АП находятся в прямой корреляции со спонтанной продукцией АФК во взвесах лейкоцитов ($r = 0,71$, $p < 0,00001$) и обратной корреляции

ляции с выраженностью ОЗ – стимулированного ответа в цельной крови ($r = 0,63$, $p < 0,00001$)

Взаимосвязь показателей с клиническими параметрами.

В группе больных РА концентрации окисленных липидов в сыворотке зависели от активности заболевания. При минимальной активности воспалительного процесса их уровень ($1,97 \pm 1,23$ мкмоль/л) был близок к контрольному ($1,7 \pm 0,57$ мкмоль/л), при умеренной активности ($3,69 \pm 2,94$ мкмоль/л), был достоверно повышен. Кроме того, у больных РА длительно и часто болеющих очаговыми инфекциями, этот показатель ($3,21 \pm 2,03$ мкмоль/л) достоверно превышал показатель больных без инфекционного синдрома ($1,94 \pm 1,05$ мкмоль/л).

Не выявлено достоверных различий в спонтанной продукции АФК во взвесах лейкоцитов и цельной крови при РА I и II степеней активности, а также отличий этих показателей от контрольных. Пиковая продукция АФК во взвесах лейкоцитов и в цельной крови после стимуляции опсонизированным зимозаном как при I-ой, так и при II-ой степенях активности РА достоверно превышали соответствующие показатель контрольной группы. При этом, при II степени активности РА все указанные показатели несколько (недостоверно) превышали таковые при I степени активности воспаления. Обращает на себя внимание большой разброс результатов в подгруппах, возможно, обусловленный тем, что продукция АФК лейкоцитами и уровень радикалов кислорода в цельной крови связаны не только с активностью РА, на эти показатели, вероятно, влияют другие параметры болезни, и, возможно, особенности терапии.

При разделении больных на подгруппы в зависимости от наличия или отсутствия суставного синдрома также отсутствовали достоверные различия показателей всех вари-

антов хемилюминесценции в подгруппах и при сравнении с контролем.

В группе родственников концентрации ТБК-АП также зависели от наличия инфекционного синдрома – у длительно и часто болеющих простудными заболеваниями лиц показатель составил $3,3 \pm 1,8$ уе, у лиц, не подверженных инфекциям – $10,7 \pm 2,9$ уе, хотя в обеих подгруппах уровни сывороточных окисленных липидов достоверно превышали контрольные.

У родственниц, подверженных частым и длительным инфекциям, спонтанная продукция АФК лейкоцитами ($12,09 \pm 9,6$ уе) и уровень радикалов кислорода в цельной крови ($3,4 \pm 3,1$ уе) при спонтанной хемилюминесценции достоверно не отличались от показателей не болеющих инфекциями родственниц (соответственно $20,7$ уе и $6,2 \pm 3,2$ уе) и от контрольных показателей (соответственно $21,4 \pm 16,9$ уе и $4,1 \pm 3,4$ уе). Тем не менее, обращает на себя внимание тот факт, что как в цельной крови, так и во взвесах лейкоцитов уровни спонтанной хемилюминесценции у лиц с инфекционным синдромом были заметно снижены, а в отсутствие такового, показатель спонтанной хемилюминесценции в цельной крови несколько повышен по сравнению с контролем. Таким образом, выявленная нами обратная корреляция показателей спонтанной хемилюминесценции с уровнями окисленных сывороточных липидов подтверждается. Пиковые уровни стимулированной опсонизированном зимозаном продукции радикалов кислорода как во взвесах лейкоцитов ($443 \pm 112,3$ уе), так и в цельной крови ($80,9 \pm 14,1$ уе) у предрасположенных к инфекциям родственниц превышали соответствующие показатели контрольной группы ($88,1 \pm 72,3$ уе и $48,3 \pm 16,1$ уе) и подгруппы не болеющих инфекциями родственниц ($111,5 \pm 34,9$ уе и $55,6 \pm 14,7$ уе). Таким образом, подтверждается и обратная зависимость уров-

ней окисленных липидов с показателями пиковой продукции радикалов кислорода.

Выявленные нами взаимосвязи изучавшихся показателей оказались неожиданно парадоксальными. Парадокс № 1. При РА на фоне хронического системного воспаления при достоверно высоких уровнях АФК в цельной крови обнаружены относительно низкие уровни окисленных сывороточных липидов, при этом зависимость между уровнями спонтанной продукции АФК и ТБК – АП оказалась обратной. Парадокс № 2. У родственников в отсутствие клинических и лабораторных признаков воспалительного процесса при сравнимых с контрольными уровнями спонтанной продукции АФК выраженное повышение концентрации сывороточных ТБК - АП. При этом зависимость между уровнями окисленных липидов и выраженностью стимулированной продукции АФК в цельной крови оказалась обратной.

Возможно, эти парадоксы являются отражением следующих известных закономерностей.

- Уровень окисленных сывороточных липидов зависит от концентрации АФК в крови (продукция лейкоцитами, эндотелиальными клетками и инактивация «ловушками» - антиоксидантными системами, протеинами, **липидами**) и от выведения из организма, в частности, мононуклеарными фагоцитами
- «Ловушки» конкурируют за АФК, в частности, интенсивность окисления липидов зависит от их состава. Возможно, в изучавшихся группах имеются различия в составе сывороточных липидов.
- У родственников выявлен дефект функционирования мононуклеарных фагоцитов, частично компенсирующийся при развитии РА [Арлеевская и соавторы, 2004]. Возможно, высокий уровень сывороточных окисленных липидов обусловлен дефектом их выведения.

- Окисленные липиды (в зависимости от их состава и степени окисления) модулируют (в ряде ситуаций подавляют) функции лейкоцитов, в том числе продукцию АФК.

Выводы.

Можно предположить, что высокая концентрация радикалов кислорода в крови больных обусловлена нарушением функции антиоксидантных систем.

Избыточное окисление липидов в группе родственников может быть обусловлено частыми повторяющимися инфекциями при дефекте выведения окисленных продуктов мононуклеарными фагоцитами. Также различиями в липидном составе сыворотки и мембран клеток крови у родственников больных РА.

Таким образом, у больных ревматоидным артритом и их родственников выявлена активация перекисного окисления липидов, что может приводить к повреждению тканей и запуску иммунных реакций.

НИР поддержана грантами РФФИ №№ 00-04-48224, 09-04-97053, а также грантами Фонда НИОКР АН РТ

CORRELATION OF OXYGEN RADICAL PRODUCTION WITH LIPID PEROXIDATION INTENSITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS AND THEIR GENETICAL RELATIVES

Semenova O.M., Khorosheva A.E., Gabdoulkhakova A.G., Arleevskaya M.I.

Kazan State Medical Academy, clinics N 3 under the Ministry of healthcare of Tatarstan Republic, Kazan, Russia

Background of the investigations were the following:

- High level of ROS production are typical for the chronic inflammatory process.

- High level of ROS production and lipoproteins oxidation are the risk factors for the atherosclerosis.
- Rheumatoid arthritis (RA) – chronic inflammatory process and one of its aftereffects is precocious atherosclerosis development.
- Genetical relatives of RA patients are predisposed to the development of this disease.
- Genetical relatives of RA patients are subjected to (amenable to) frequent and lasting (lingering) common infections [Арлеевская и соавторы, 2005].

The aim of the investigations – to study the correlation between the levels of oxidized lipids and ROS production in the following groups

- RA patients (n =22)
- Healthy genetical relatives first line of alliance (affinity) (n =13)
- Healthy women without inherited predisposition to autoimmune diseases (n =23)

Methods

- The investigation of the ROS production in the whole blood samples by luminol-dependent chemiluminescence technique (phagocytosis object – opsonized zymosan).
- The investigation of the ROS production in the leukocyte suspension by luminol-dependent chemiluminescence technique (phagocytosis object – opsonized zymosan).
- The study of the concentration of oxidized serum lipids by measurement of the TBA – active products (TBA-AP).
- Statistic analysis – non-parametric criterion of Wilcoxon, correlation analysis.

Results.

As expected the level of TBA-AP under RA ($2,9 \pm 1,17$ uM/L) was in 1,7 times higher than the value of the control group ($1,7 \pm 0,57$ uM/L, even though the difference was not reli-

able due to the large data scatter related to considerable disease heterogeneity.

It was revealed reliable substantial enhancement of the TBA-AP concentration ($7,9 \pm 4,3$ uM/L) in the relatives group. It should be noted that despite the frequent lingering site infections in the relatives group, at the moment of the investigation there was no any clinical symptoms of the inflammatory processes.

With the close spontaneous levels of ROS production by leukocytes in the groups (healthy donors – $21,4 \pm 16,9$ a.u., RA – $23,8 \pm 22,3$ a.u., relatives - $21,3 \pm 13,6$ a.u.), the concentration of ROS in whole blood samples of the RA patients were reliably higher ($9,5 \pm 8,7$ a.u.) than in control group ($4,1 \pm 3,1$ a.u.), possibly pointing out the lack of the radical scavengers.

The level of spontaneous ROS production in whole blood sample in the relatives group ($6,0 \pm 4,6$ a.u.) was in 1.5 times higher than control, whereas the difference was unreliable.

Oposonized zymosan stimulation of the leukocytes resulted into the increasing of ROS production in all groups, but peak values of the chemiluminescence intensity both of the patient ($180,72 \pm 163,7$ a.u.), and relative ($194,36 \pm 161,3$ a.u.) groups were higher compared to control value ($88,1 \pm 72,3$ a.u.).

This increase seems to be logical for the patients with the chronic inflammatory process and the presence of many proinflammatory factors in the blood. Revealed increase of the leukocyte response to oposonized zymosan in the relatives seems to be unexpected in the absence of the acute and so the more chronic inflammation; possibly it is related to leukocyte priming within frequent lasting infections.

When studying stimulated ROS production in whole blood samples it was revealed considerable enhancement of peak values of ROS concentrations in RA patient samples ($166,9 \pm 106,1$ a.u.) compared with control ones ($48,3 \pm 16,1$ ye). This value was also reliably increased in the relative group ($77,0 \pm 37,4$ a.u.).

Parameter correlation

There is a forward correlation between the level of serum TBA-AP and spontaneous level of the ROS production in the whole blood samples in the healthy donors group ($r = 0,46$, $p < 0,013$).

In RA the level of serum TBA-AP is in invert correlation with spontaneous level of ROS production in the whole blood samples ($r = - 0,39$, $p < 0,047$).

The invert correlation between the level of TBA-AP and spontaneous level of ROS production of the leukocyte suspension under RA is even more tight ($r = - 0,67$, $p < 0,00001$).

In relative groups the level of serum TBA-AP is in the forward correlation with spontaneous ROS production level in the leukocyte ($r = 0.71$, $p < 0,00001$) and in invert correlation with level of the OZ-induced response in whole blood samples ($r = 0,63$, $p < 0,00001$)

Correlation with clinical parameters

In the group of RA patients the concentration of serum oxidized lipids depended on disease activity. Their level ($1,97 \pm 1,23$ uM/L) was close to control level ($1,7 \pm 0,57$ uM/L) under the minimal activity of the inflammatory process, and it was reliably higher under moderate activity ($3,69 \pm 2,94$ uM/L). Moreover, this parameter was reliably higher in RA patient suffering from lasting and frequent site infections ($3,21 \pm 2,03$ uM/L) than in patients without infectious syndrome ($1,94 \pm 1,05$ uM/L).

It was revealed no reliable differences in spontaneous level of ROS production in the leukocyte suspension and whole blood samples under I and II degree of RA activity and the distinction of the parameters from the control ones. Peak production of ROS in the leukocyte suspension and whole blood samples onto the stimulation with opsonized zymosan both under the I and II degree of RA activity was reliably higher than corresponding value of the control group. While under the II degree of RA activity all mentioned parameters were unreliably higher than

the same under the I degree of inflammation activity. It should be outlined the large scatter of data in the groups related to the fact that the leukocyte ROS production and the level of the oxygen radicals in whole blood samples associated not only with RA activity, but these parameters influenced by other disease factors and probably by therapy features.

Dividing the patients into subgroups depending on the presence or lacking the joint syndrome also did not give any reliable differences in the parameters of the chemiluminescence responses in the subgroups compared with control.

In the group of the relatives the concentrations of the TBA-AP were also dependent on the presence of the infectious syndrome – in the group of continuously and frequently suffering from catarrhal diseases this parameter $3,3\pm 1,8$ a.u., in the group of the person without infection syndrome – $10,7\pm 2,9$ a.u., although the levels of serum oxidized lipids were reliably higher in both groups than control values.

In the group of relatives prone to frequent and lasting infectious the spontaneous level of ROS production by leukocyte suspension ($12,09\pm 9,6$ a.u.) and the level of oxygen radicals ($3,4\pm 3,1$ a.u.) in whole blood samples did not differ from the response parameters of the non-suffering ($20,7$ a.u. and $6,2\pm 3,2$ a.u., correspondingly) and from control values ($21,4\pm 16,9$ a.u. and $4,1\pm 3,4$ a.u., correspondingly). Nevertheless, both in the whole blood samples and leukocyte suspensions the levels of spontaneous chemiluminescence were considerably lower in the individuals with infectious syndrome, in the absence of the infectious syndrome the level of the spontaneous ROS production in whole blood sample was slightly increased compared with control. Thus, revealed invert correlation of the parameters of spontaneous chemiluminescence with the levels of oxidized lipids is confirmed. Peak values of OZ stimulated ROS production both in leukocyte suspension ($443\pm 112,3$ a.u.) and whole blood samples ($80,9\pm 14,1$ a.u.) in predisposed to infections relatives

exceeded corresponding values of control group ($88,1 \pm 72,3$ a.u. and $48,3 \pm 16,1$ a.u.) and the group of relatives not suffering from infections ($111,5 \pm 34,9$ a.u. and $55,6 \pm 14,7$ a.u.). So, it also confirmed the invert correlation of the levels of the oxidized lipids with parameters of the peak value of ROS production.

Paradox 1 – under RA on the chronic systemic inflammation background and reliably high levels of ROS in whole blood samples it was found relatively low levels of serum oxidized lipids, meanwhile the dependence between the levels of spontaneous ROS production and TBA-AP was invert. Paradox 2 – in relatives under the lack of the clinical symptoms of inflammatory process and comparable with control values of the spontaneous ROS production levels it was revealed considerable increase of the serum TBA-AP concentration. At the same time the dependence between the levels of the oxidized lipids and the level of the stimulated ROS production in whole blood was invert.

Possibly these paradoxes reflect the next known mechanisms:

- The level of oxidized serum lipids depend on the ROS concentration in the blood (generation by leukocyte, endothelial cells and inactivation by scavengers – anti-oxidant systems, proteins, lipids) and elimination from an organism in particular by monocytes
- Scavengers compete for ROS, in particular the intensity of the lipid oxidation depends on the their set. Probably there are differences in the content of the serum lipids in the investigated groups.
- In relatives group it was revealed the defect of functioning of the mononuclear phagocytes partially compensate under the RA development. [Arleevskaya et al, 2004]. Probably the high level of the serum oxidized lipids determined by the defects in their elimination

- Oxidized lipids (depending on their composition and the degree of their oxidation) modulate (in some cases suppress) the leukocyte functions including ROS generation.

Resume

We can suppose, that high concentration of ROS in blood of RA patients determined by abnormalities of functioning of anti-oxidant systems. Redundant lipid oxidation in relatives group can be determined by frequent infections together with defect of oxidized products elimination by mononuclear phagocytes and differences in lipid content of serum and membranes of blood cells in RA relatives. Than, it was shown that RA patients and their relatives has activation of lipid peroxidation, that could lead to the tissue damage and trigger of autoimmune reactions.

This scientific research work was supported by RFBR grants № № 00-04-48224, 09-04-97053,

ДИСБАЛАНС МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

**Сердюк И.Л., Нго Тхи Бинь Минь, Габдулхакова А.Г.,
Арлеевская М.И.**

Государственная Медицинская Академия, РКБ №3 МЗ РТ,
Казань

Системная склеродермия - заболевание, вызывающее фиброз кожи и внутренних органов, в патогенезе которого, в частности, играет роль хронический воспалительный процесс минимальной активности. Хроническое воспаление – фактор риска развития атеросклероза. Мононуклеарные фагоциты – важнейшие участники всех патологических процессов, представленных в патогенезе заболевания – в развитии хронического воспаления, патологических иммунных реакций (вместе с лимфоцитами), патологического фиброзо-

образования. Не менее важное значение эти клетки имеют в метаболизме липидов и развитии атеросклероза.

Цель работы – выявление проатерогенных сдвигов в структуре липидов сыворотки и мононуклеарных лейкоцитов при системной склеродермии и взаимосвязей этих сдвигов с параметрами заболевания.

Объекты исследования – (1) сыворотка крови, (2) моноциты, (3) лимфоциты сосудистого русла 53 пациенток с системной склеродермией и 20 здоровых женщин (контроль).

Методы.

1. Исследование содержания липидов (общего холестерина, холестерина в составе липопротеидов высокой и низкой плотности, триглицеридов) в сыворотке, лимфоцитах и моноцитах – энзиматический метод

2. Исследование содержания окисленных сывороточных липидов – по уровню ТБК – активных продуктов – спектрофотометрический метод

3. Статистическая обработка – непараметрический критерий Манн – Уитни. Анализ результатов проводился в сравнимых по возрасту группах.

Результаты.

У больных системной склеродермией выявлено достоверное повышение концентрации общего холестерина ($6,2 \pm 1,0$ ммоль/л) в сыворотке по сравнению с показателями доноров ($4,3 \pm 0,6$ ммоль/л) той же возрастной группы. Уровень холестерина в составе сывороточных липопротеидов высокой плотности ($1,9 \pm 0,2$ ммоль/л) оказался сниженным, а в составе липопротеидов низкой плотности ($4,0 \pm 1,0$ ммоль/л) – повышенным по сравнению с соответствующими показателями доноров (соответственно – $1,0 \pm 0,2$ ммоль/л и $2,1 \pm 0,6$ ммоль/л). Индекс атерогенности у больных системной склеродермией ($4,9 \pm 1,5$) достоверно превышал показатель здоровых людей сравнимого возраста ($1,9 \pm 0,6$) – в

2,6 раза! Концентрация сывороточных триглицеридов у больных ($1,34 \pm 0,6$ ммоль/л) была повышена в 1,8 раза по сравнению с контролем ($0,7 \pm 0,5$ ммоль/л), однако, при значительном разбросе данных достоверных различий показателей не обнаружено.

Уровень окисленных сывороточных липидов при системной склеродермии ($2,2 \pm 0,9$ ммоль/л) также оказался достоверно более высоким по сравнению с донорами ($1,5 \pm 0,4$ ммоль/л).

При исследовании содержания общего холестерина и холестерина в составе липопротеидов низкой плотности в клетках крови оказалось, что весь выявлявшийся данными методами холестерин, видимо, находится в составе липопротеидов низкой плотности.

В мононуклеарных фагоцитах больных было достоверно повышено содержание холестерина липопротеидов низкой плотности ($1,0 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток) по сравнению с контролем ($0,5 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток) при сравнимых концентрациях триглицеридов ($0,1 \pm 0,0$ ммоль/млн клеток у больных, $0,1 \pm 0,0$ ммоль/млн клеток в контроле).

В лимфоцитах больных содержание холестерина липопротеидов низкой плотности ($0,8 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток) было близким к таковому в контроле ($0,6 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток), уровень общего холестерина ($0,9 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток) достоверно превышал контрольный показатель ($0,5 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток) – в 1,8 раза. В отличие от мононуклеарных фагоцитов в лимфоцитах больных уровень триглицеридов ($0,1 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток) был значительно понижен – в 4,7 (!) раза – по сравнению с контролем ($1,4 \pm 0,4$). Возможно, снижение запасов энергоемких триглицеридов – свидетельство интенсивного метаболизма в активированных при склеродермии лимфоцитах.

Таким образом, все выявленные изменения в структуре сывороточных липидов и накопление холестерина в клет-

ках при склеродермии являются проатерогенными и могут способствовать характерному для всех аутоиммунных заболеваний раннему развитию атеросклероза.

Можно предположить, что выраженность проатерогенных сдвигов в структуре липидов при склеродермии зависит от степени выраженности аутоиммунного воспаления, интегральным клинико - лабораторным показателем которого служит активность заболевания. Мы сравнили изучавшиеся показатели в подгруппах больных с I –ой (минимальной) и II – ой (умеренной) степенями активности склеродермии. Характерные для склеродермии минимальные отклонения показателей аутоиммунного воспаления, тем не менее, достоверно различались в указанных подгруппах (СОЭ – $15,5 \pm 2,0$ мм/час при I степени активности, $20,7 \pm 3,5$ мм/час – при II; ЦИК – соответственно $0,028 \pm 0,0$ ед. оп. пл. и $0,044 \pm 0,0$ ед. оп. пл.; комплемент – $59,1 \pm 0,9$ ед. СН50 и $36,4 \pm 0,0$ ед. СН50).

При I степени активности склеродермии выявлено заметное снижение уровня сывороточного холестерина в составе липопротеидов высокой (1,0±0,07 ммоль/л, доноры – 1,9±0,6 ммоль/л, $p < 0,05$) при практически неизменной концентрации холестерина в составе липопротеидов низкой плотности (2,4±0,3 ммоль/л, доноры – 2,1±0,6 ммоль/л). Таким образом, индекс атерогенности (3,1±0,2) оказался в 1,6 раза выше, чем аналогичный показатель в несколько более старшей по возрасту группе доноров (1,9±0,6).

При II степени активности при некотором снижении содержания холестерина липопротеидов высокой плотности (1,2±0,1 ммоль/л) выявлено выраженное накопление холестерина в составе липопротеидов низкой плотности (4,4±0,5 ммоль/л) в сыворотке – в 2,1 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и в 1,8 раза по сравнению с аналогичным показателем при I степени активности заболевания ($p < 0,05$). Таким образом, индекс атерогенности в данной подгруппе

($4,9 \pm 0,4$) достоверно превысил показатели при минимальной активности воспаления и в контроле.

Содержание окисленных сывороточных липидов также зависело от активности аутоиммунного воспаления – при I степени активности этот показатель ($2,0 \pm 0,2$ ммоль/л) был несколько (недостоверно) выше контрольного ($1,5 \pm 0,4$ ммоль/л), при II степени ($3,4 \pm 1,5$ ммоль/л) он в 2,3 раза превышал показатель здоровых доноров ($p < 0,05$).

Те же тенденции выявлены и при исследовании накопления холестерина в мононуклеарных фагоцитов. При минимальной активности содержание общего холестерина ($1,1 \pm 0,2$ ммоль/млн клеток) превышало контрольное значение ($0,6 \pm 0,2$ ммоль/млн клеток, $p < 0,052$), однако, было достоверно более низким, чем аналогичный показатель при умеренно выраженной активности процесса ($1,6 \pm 0,3$ ммоль/млн клеток). Уровень холестерина липопротеидов низкой плотности при I степени активности склеродермии ($1,2 \pm 0,2$ ммоль/млн клеток) достоверно отличался как от показателя контроля ($0,5 \pm 0,3$), так и от показателя при II степени активности ($1,6 \pm 0,3$ ммоль/млн клеток).

Содержание триглицеридов в моноцитах было достоверно более высоким при I степени активности склеродермии ($0,2 \pm 0,0$ ммоль/млн клеток) и снижалось до нормы при II степени активности ($0,08 \pm 0,0$ ммоль/млн клеток)

В лимфоцитах зависимость уровней холестерина от выраженности аутоиммунного воспаления носила иной характер. При I степени активности процесса уровни общего холестерина в клетках ($0,8 \pm 0,2$ ммоль/млн клеток) и холестерина липопротеидов низкой плотности ($0,7 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток) несколько превышали контрольный показатели (соответственно – $0,5 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток и $0,6 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток), при II степени активности эти показатели (соответственно $0,3 \pm 0,1$ ммоль/млн клеток и

0,3±0,0 ммоль/млн клеток) были ниже контрольных. Таким образом, хотя при сравнении показателей каждой подгруппы с контролем достоверности различий не выявлено, но при минимальной активности процесса накопление холестерина в лимфоцитах было достоверно более высоким, чем при более выраженном аутоиммунном воспалении.

Содержание триглицеридов в лимфоцитах при I (0,2±0,1 ммоль/млн клеток) и II (0,1±0,0 ммоль/млн клеток) степенях активности воспаления было достоверно более низким, чем в контроле (1,4±0,4 ммоль/млн клеток).

Таким образом, при системной склеродермии выявлены проатерогенные сдвиги в структуре сывороточных липидов. Их выраженность связана с активностью склеродермии. Мононуклеарные фагоциты, одна из функций которых состоит в утилизации холестерина липопротеидов низкой плотности, накапливают холестерин по мере нарастания его уровня в крови. Иной характер зависимости уровня холестерина в лимфоцитах от выраженности аутоиммунного воспаления, очевидно, отражает разную степень вовлеченности в процесс этих пролиферирующих при активации клеток. Уровень энергоемких триглицеридов также снижается как в моноцитах, так и в лимфоцитах по мере нарастания активности воспаления, что, очевидно, отражает активацию энергозависимых процессов в указанных клетках.

IMBALANCE OF THE LIPID METABOLISM IN SYSTEMIC SCLERODERMA

Serdyuk I.L., Ngo Thi Binh Minh, Gabdoulkhakova A.G., Arleevskaya M.I.

Kazan State Medical Academy, Clinics N 3 under the ministry of healthcare of Tatarstan, Kazan, Russia

Rational: systemic sclerosis is a disease leading to cutaneous and internal fibrosis, the diseases pathogenesis involves in particular subclinical chronic inflammation; chronic inflammation is a risk factor of atherosclerosis development; mononuclear phagocytes play major role in all the processes in systemic sclerosis pathogenesis – chronic inflammation, pathologic immune reaction (together with lymphocytes), fibrosis development. They also play major role in lipid metabolism and atherosclerosis development.

Aim – to reveal pro-atherogenic shifts in serum and mononuclear phagocyte lipid structure and to analyze the interconnections of these shifts with clinical symptoms in systemic sclerosis.

Objects – blood serum, circulating monocytes and lymphocytes of 53 systemic sclerosis patients and 20 healthy individuals.

Methods.

To investigate serum, lymphocyte and monocyte lipid levels (total cholesterol, cholesterol of low and high density lipoproteins, triglycerides) – enzymatic methods.

To investigate the content of oxidized serum lipids as the levels of TBA-active products – spectrophotometric method

Statistical analysis – non-parametric criterion of Mann-Witney. The analysis was performed in equal age groups.

Results

In SS patients group was identified reliable increase of total cholesterol concentration in serum ($6,2\pm 1,0$ mM) in comparison with donors ($4,3\pm 0,6$ mM). The level of cholesterol was decreased ($1,9\pm 0,2$ mM) in high density lipoproteins and in serum low density lipoproteins was increased ($4,0\pm 1,0$ mM) in comparison with corresponding indices of donors ($1,0\pm 0,2$ mM and $2,1\pm 0,6$ mM). Atherogenic index in SS patients group is reliably increased ($4,9\pm 1,5$) than index of healthy individuals of respective age ($1,9\pm 0,6$ mM). Concentration of serum triglycerides in SS patients ($1,34\pm 0,6$ mM) was increased in 1,8 times as compared with control group ($0,7\pm 0,5$ mM), but together with considerable data dispersion reliable differences weren't identified.

The level of oxidized serum lipids in SS patients ($2,2\pm 0,9$ mM) also was reliably higher as compared with donors ($1,5\pm 0,4$ mM).

As was shown in studying of content of total cholesterol and low density lipoproteins cholesterol in blood cells, all cholesterol detected by this method is contained in low density lipoproteins.

Low density lipoproteins cholesterol in mononuclear phagocytes was reliably increased ($1,0\pm 0,1$ mM per million cells) together with comparable concentrations of triglycerides ($0,1\pm 0,0$ mM per million cells in SS patients and $0,1\pm 0,0$ mM per million cells in control).

In SS patients lymphocytes content of low density lipoproteins cholesterol ($0,8\pm 0,1$ mM per million cells) was close to control ($0,6\pm 0,1$ mM per million cells), total cholesterol level ($0,9\pm 0,1$ mM per million cells) was reliably higher than control indices ($0,5\pm 0,1$ mM per million cells) – in 1,8 times. In contrast to mononuclear phagocytes in patients lymphocytes the level of triglycerides ($0,1\pm 0,1$ mM per million cells) was considerably decreased – in 4,7 times in comparison with control ($1,4\pm 0,4$).

It's possible, that decreasing of power-hungry triglycerides is evidence of intensive metabolism in activated lymphocytes of SS patients.

Thus, all obtained changes in serum lipids structure and accumulation of cell cholesterol in SD patients are proatherogenic and can promote forwardness of atherosclerosis being typical for autoimmune diseases.

Thus the serum lipids structure and cholesterol storage in the cells revealed in the systemic sclerosis patients are accepted as being pro-atherogenic and can promote earlier atherosclerosis development observed in various autoimmune diseases.

The intensity of pro-atherogenic shifts in SS patients may be due to the intensity of autoimmune inflammation, the activity degree being the integral clinic and laboratory index of this process. We compared the parameters under investigations in the subgroups of patients with I and II degree of SS activity. The was reliable difference in the autoimmune inflammation indexes within the subgroups (ESR – $15,5 \pm 2,0$ mm/h under I degree of activity, $20,7 \pm 3,5$ mm/h – under II; CIC – $0,028 \pm 0,0$ O.U., $0,044 \pm 0,0$ O.U.; complement – $59,1 \pm 0,9$ units of CH50 и $36,4 \pm 0,0$ units of CH50, correspondingly).

The remarkable decrease of serum cholesterol of high density lipoproteids HDLP was found in subgroup with the I degree of activity ($1,0 \pm 0,07$ mM/L, donors – $1,9 \pm 0,6$ mM/L, $p < 0,05$) the cholesterol of low density lipoprotein levels being normal ($2,4 \pm 0,3$ mM/L, donors – $2,1 \pm 0,6$ mM/L). So, atherogenic index was in 1,6 times higher ($3,1 \pm 0,2$) than the same parameter in the older group ($1,9 \pm 0,6$).

The same decrease of the cholesterol of high density lipoproteins under the II degree of the activity ($1,2 \pm 0,1$ mM/L) and considerable accumulation of the cholesterol in serum LDLP ($4,4 \pm 0,5$ mM/L) – in 2.1 times compared with control ($p < 0,05$) and in 1,8 times under the I degree of activity ($p < 0,05$). Thus the atherogenic index reliably overgrew the parameter in this group

($4,9\pm 0,4$) under the minimal inflammation activity and in control.

The content of the oxidized serum lipids also depended on the activity of autoimmune inflammation – under the I degree of activity this parameter ($2,0\pm 0,2$ mM/L) was slightly higher than control ($1,5\pm 0,4$ mM/L), under II degree ($3,4\pm 1,5$ mM/L) it was in 2,3 times higher than the parameter of healthy donors ($p < 0,05$).

The same tendencies were identified in studying of cholesterol accumulation in mononuclear phagocytes. Together with minimal activity the content of total cholesterol ($1,1\pm 0,2$ mM per million cells) was higher than control level ($0,6\pm 0,2$ mM per million cells, $p < 0,052$), but was reliably lower than corresponding indices in moderate expression of process activity ($1,6\pm 0,3$ mM per million cells). Low density lipoproteins cholesterol level in I degree of SS activity ($1,2\pm 0,2$ mM per million cells) reliably distinguished from control indices ($0,5\pm 0,3$) and II degree of SS activity ($1,6\pm 0,3$ mM per million cells).

Triglyceride content in monocytes was reliably higher in I degree of SS activity ($0,2\pm 0,0$ mM per million cells) and decreased to normal in II degree of activity ($0,08\pm 0,0$ mM per million cells).

In lymphocytes cholesterol level dependence from intensity of autoimmune inflammation was different. In I degree of process activity level of total cholesterol in cells ($0,8\pm 0,2$ mM per million cells) and cholesterol of low density lipoproteins ($0,7\pm 0,1$ mM per million cells) were higher than control ($0,1$ mM per million cells and $0,6\pm 0,1$ mM per million cells), in II degree of activity this indices ($0,3\pm 0,1$ mM per million cells and $0,3\pm 0,0$ mM per million cells) were lower than control.

The triglyceride content in the lymphocytes under I ($0,2\pm 0,1$ mM per $10(6)$ cells) and II ($0,1\pm 0,0$ mM per $10(6)$

cells) degrees of inflammation activity was reliably lower than in control ($1,4 \pm 0,4$ mM per 10(6) cells).

So, under the systemic it was revealed pro-atherogenic shifts in the structure of serum lipids. Their expression related to the sclerosis activity. Mononuclear phagocytes utilizing LDLP accumulate the cholesterols while the increasing its level inside the cell.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ (eNOS) NO-СИНТАЗЫ ПРИ РАЗВИТИИ ГЕСТОЗА У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН

Павлова Т.В.¹

¹– Казанская Государственная Медицинская Академия,
Казань, Россия
Olivka1703@rambler.ru

Введение: Гестоз – одно из наиболее распространенных осложнений беременности, причины которого до сих пор четко не обозначены. Частота гестоза в России достигает 20%. Существуют данные, свидетельствующие о наличии генетической предрасположенности к развитию этого осложнения беременности.

К генетическим факторам, с которыми может ассоциироваться гестоз, относят гены MTHFR, его вариант MTHFR-C677T, AGT-M235T, ACE I/D, ген протромбина, NO-синтазы, мутация V фактора Лейдена, дефицит протеина C, S и др.

Оксид азота является основным эндотелиальным фактором релаксации, участвующим в поддержании тонуса сосудистой стенки, тромбогенезе. Функция NO состоит в снижении активности сократительного аппарата гладкомышечных элементов сосудов, торможении адгезии циркулирую-

щих тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелию, регуляции пристеночного гемостаза. В синтезе NO в эндотелии и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления участвует конституциональная эндотелиальная NO-синтаза 3-го типа (NOS3, синоним eNOS).

Эндотелиальный гипотензивный фактор – оксид азота (NO) является продуктом эндотелиальной NO-синтазы, которая кодируется геном NOS3 (eNOS). Аллельные варианты этого гена приводят к снижению уровня экспрессии NO-синтазы и, как следствие, снижению устойчивости организма к гипертензивным влияниям со стороны внешней и внутренней среды.

Полиморфизм генов NO-синтазы связан с различными акушерскими патологиями, в основе которых лежат изменения сосудистого тонуса (гестоз, плацентарная недостаточность, ЗВУР плода).

Особенно непредсказуем гестоз у первородящих женщин и его связь с генетическими факторами чрезвычайно интересна. В связи с этим, целью исследования явилось изучение ассоциации функционально значимых полиморфных вариантов гена эндотелиальной NO-синтазы с развитием гестоза у первородящих женщин.

Материалы и методы: обследованы 68 первородящих женщин на сроках 27-37 нед.: из них 29 беременных с гестозом разной степени тяжести (20 - легкой, 6 - средней, 3 - тяжелой); 31 - из группы высокого риска развития гестоза: с ожирением – 2, нейроциркуляторной дистонией по гипертоническому типу (НЦД) – 7, пиелонефритом – 20 и 10 практически здоровых первородящих женщин.

У всех пациенток, кроме общеклинического обследования, исследовали кровь для детекции полиморфизма E298D с помощью рестрикционного анализа и полиморфизма 4a/4b в гене NOS3. Ген NOS3-E298D, 4a/4b ответственный за синтез фермента – эндотелиальной NO-синтазы

(eNOS), которая участвует в синтезе оксида азота эндотелием и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и АД.

Результаты исследования показали, что в контрольной группе были обнаружены нормальные варианты гена eNOS3-E298E, 4b/4b у всех беременных.

У женщин из группы риска выявлен полиморфизм гена NOS3-E298D, 4a/4b, где аллели D и 4a увеличивают риск развития акушерской патологии, таких как гестоз, плацентарная недостаточность, ЗВУР, но только при наличии потенцирующих факторов.

В отличие от женщин группы риска у беременных с гестозом были обнаружены мутантные полиморфные варианты гена eNOS3.

У 10 больных с легким гестозом обнаружен мутантный вариант гена по аллеле D – NOS3-D298D, 4b/4b, клинически все они имели ЗВУР плода, маловодие.

Женщины с гестозом средней и тяжелой степени имели мутантный вариант гена по аллеле 4a – NOS3-4a/4a, что сопровождалось более ранним появлением отеков, протеинурии и активным течением ДВС-синдрома. Из них одна беременная с гестозом средней степени и две с тяжелым гестозом имели еще и гомозиготную форму D298D полиморфизма гена NOS3. При гестозе средней и тяжелой степени клинически определялся ЗВУР плода II – III степени, раннее и тяжелое течение гестоза.

Исследования показали, что генотипу 4b/4b соответствует максимально высокий уровень базального NO, тогда как у женщин с генотипом 4a/4a уровень NO в 2 раза ниже. Гетерозиготные формы мутации занимают промежуточное положение по уровню NO.

Выводы: Полиморфизм в интроне 4 гена NOS3-E298D, 4a/4b, связан с повышенным риском развития гестоза. Среди женщин с гестозом, у носителей хотя бы одного аллеля

4а, отмечалось более высокое АД, а у пациенток с генотипом 4а/4а – обнаружена связь с более ранним и более тяжелым гестозом, гипоксией и ЗВУР плода. Полиморфные варианты гена эндотелиальной NO-синтазы ассоциированы с развитием акушерской патологии, такой как гестоз, плацентарная недостаточность, ЗВУР.

Выявление данного полиморфизма имеет наиболее важное значение на ранних сроках беременности. Возможность ранней досимптоматической диагностики любой акушерской патологии позволяет провести профилактическое лечение и не даст гестозу реализоваться.

THE ANALYSIS OF THE POLYMORPHISM OF THE ENDOTHELIUM NO-SYNTASE GENE IN THE CASE OF THE GESTOSIS DEVELOPMENT IN THE PRIMIPARA WOMEN

Pavlova T.V.¹

¹– Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia
Olivka1703@rambler.ru

Introduction: Gestosis is one of the most prevalent complications of pregnancy, the reasons of it are not clearly denoted. The frequency of gestosis in Russia is up to 20%. There are data which evidence for genetic predisposition of this condition.

The genetic factors which seem to be associated with gestosis development are genes MTHFR, its variation MTHFR-C677T, AGT-M235T, ACE I/D, prothrombin gene, NO-synthase gene, mutation of the Leiden's V factor, deficit of C and S proteins etc.

Nitrogen oxide is the basic endothelial factor of relaxation taking part in the support of the tone of the vessel wall and in thrombogenesis. Function of NO is to lower the activity of the contractile system of smooth muscle cells in the vessels and to

suppress the adhesion of circulating platelets and leucocytes to the vessel endothelium, as well as to regulate the parietal hemostasis. Constitutional endothelial NO-synthase type 3 (NOS3, eNOS) takes part in the synthesis NO, so in the regulation of vessel tone, blood flow and arterial blood pressure. The product of endothelial NO-synthase encoded by the gene NOS3(eNOS) is endothelial hypotensive factor, e.g. nitrogen oxide (NO). Allelic variants of this gene bring to the decrease of the level of expression of NO-synthase, and as a result to the decrease of the body resistance to the hypertensive influence of external and internal media.

The polymorphism of genes of NO-synthase is associated with different obstetric pathologies in the basis of which changes of the vessel tone (gestosis, placental insufficiency, fetus IGDR) are.

The gestosis is especially unpredictable in primipara women. Its relation to genetic factors is extremely interesting. In the connection with this, the aim of this study was to investigate the association of functionally important polymorphic versions of the endothelial NO-synthase gene with the development of gestosis in primipara.

Materials and methods: 68 primipara women with gestational age 27-37 weeks were included: 29 of which had gestosis with various severity (20 – easy, 6 - moderate, 3 - severe); 31 of them had high risk of gestosis development (obesity – 2, hypertensive type of the neurocirculatory dystonia - 7, pyelonephritis – 20) and 10 completely healthy primipara.

Besides common clinical investigations there were studied blood samples for the detection of the polymorphism of E298D with the aid of restriction analysis and polymorphism of the 4a/4b gene of NOS3 in all patients. The gene NOS3-E298D, 4a/4b is responsible for the synthesis of the enzyme NO-synthase (eNOS), which participates in the synthesis of nitrogen ox-

ide by the endothelium, and so in the regulation of vessel tone, blood flow and blood pressure.

Results: There were detected normal versions of the gene eNOS3-E298E, 4b/4b in all pregnant women of the control group.

In the risk group, there was detected the polymorphism of the gene NOS3-E298D, 4a/4b, where B and 4a alleles increase the risk of the development of the obstetric pathologies, such as gestosis, placental insufficiency, fetus IGDR, but only in the presence of potentiating factors. As distinct from the women of the risk group in the women with gestosis there were detected mutational polymorphic versions of the gene eNOS3.

There was revealed the mutational version of gene in allele NOS3-D298D, 4b/4b in the 10 women with mild gestosis. All of them had fetus IGDR and hypamnion.

Women with moderate to severe forms of gestosis had mutational version of the gene in the 4a allele – NOS3-4a/4a, which was accompanied by earlier occurrence of edemas, proteinuria and active demonstration of DIC-syndrome. From these, one pregnant woman with moderate gestosis and two with severe gestosis also had homozygotic type of D298D polymorphism of the gene NOS3. In the case of moderate to severe gestosis fetus IGDR of II – III stage was revealed clinically, as well as early and severe flow of gestosis.

The studies have shown that the genotype 4b/4b corresponds to maximum high level of basal NO, whereas in women with genotype 4a/4a the level of NO is twice lower. Heterozygotic types of mutations are in intermediate positions according to the level of NO.

Conclusions: The polymorphism of the gene NOS3-E298D, 4a/4b in the intron 4 is associated with the high risk of the development of gestosis. Among the women with gestosis who care at least 1 allele 4a higher level of blood pressure was detected, and in patients with the genotype 4a/4a earlier and

heavier gestosis, IGDR and hypoxia of the fetus were revealed. Polymorphic versions of the gene of endothelial NO-synthase are associated with the development of obstetric pathologies, such as gestosis, placental insufficiency and IGDR.

Diagnosis of this polymorphism has the most important meaning in the early gestational ages. The possibility of early pre-symptomatic diagnosis of any obstetric pathology allows to carry on a prophylactic treatment and to suppress the realization of gestosis.

**АНТИОКСИДАНТ ПОДАВЛЯЕТ АУТОИММУННОЕ
ВОСПАЛЕНИЕ,
ВЫЗВАННОЕ ВВЕДЕНИЕМ АДЬЮВАНТА ФРЕЙНДА**
Сабирова А.Я., Залялютдинова Л.Н., Насыбуллина Д.А.

Казанский государственный медицинский университет,

Казань, Россия

sabirovy@yahoo.com

Введение. Альфа-липоевая кислота (ЛК) является уникальным антиоксидантом, растворимым как в водной, так и в липидной среде, что позволяет ей как циркулировать в плазме крови, так и проникать через клеточные мембраны. ЛК является объектом изучения исследователей по всему миру. Целью нашего исследования явилось изучение противовоспалительных свойств различных доз ЛК при пероральном применении в сравнении с диклофенаком натрия (ДФ) на модели адьювантного артрита (АА).

Выбор данной модели обусловлен тем, что субплантарное введение крысам полного адьюванта Фрейнда вызывает в контралатеральной лапе артрит, схожий с ревматоидным артритом (РА) человека по основным параметрам: характеру синовита, синовиальной гиперплазии, неангиогенеза, инфильтрации синовиальной оболочки воспалитель-

ными клетками, образованию паннуса и эрозий суставного хряща и кости. Более того, АА крыс соответствует РА человека по профилю заинтересованных в процессе цитокинов и биологических факторов, присутствующих в синовиальной оболочке и хряще.

Материалы и методы. В эксперименте использовали 65 белых нелинейных крыс обоего пола массой 220 ± 20 г. АА моделировали субплантарным введением в правую лапу контрольных и опытных крыс 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда. Исследуемые препараты (ЛК в дозах, соответствующих 1/10, 1/100 и 1/200 DL50, и ДФ в средней эффективной дозе) вводили внутривенно с помощью зонда с 12-го дня в течение 14 дней. Результаты исследований оценивали онкометрически на 3, 6, 10, 14, 20 и 25 день экспериментов, каждый замер повторяли двукратно. Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Критерием достоверности различий явилось значение $p < 0,05$.

Результаты. Первичная воспалительная реакция формировалась на третий день (средний прирост объема правой лапы составил $66 \pm 5\%$). К 25 дню средний прирост объема правой лапы в контрольной группе и группе, получающей основу, составил $76 \pm 5\%$. Применение ЛК в дозе, соответствующей 1/10 и 1/200 DL50, практически устраняло первичную воспалительную реакцию, вызванную введением адьюванта. Применение дозы, соответствующей 1/100 DL50, было менее эффективно, но тем не менее достоверно превосходило эффективность ДФ в средней эффективной дозе.

Вторичная иммунологическая реакция начала формироваться на 6 день (средний прирост объема левой лапы составил $17 \pm 2\%$). К 25 дню средний прирост объема левой лапы достиг $42 \pm 5\%$ у контрольной группы и группы крыс, получавших основу. Применение ЛК в дозе, соответствующей

щей 1/10 и 1/200 DL50, практически устраняло вторичную иммунологическую реакцию, вызванную введением адьюванта. Применение дозы, соответствующей 1/100 DL50 было менее эффективно, но, тем не менее, достоверно превосходило эффективность ДФ в средней эффективной дозе.

Вывод. Таким образом, нами было впервые показано, что пероральное применение ЛК на модели АА при пероральном применении эффективно уменьшает выраженность как первичной воспалительной, так и вторичной иммунологической реакции и по эффективности превосходит препарат сравнения.

Обсуждение. Потенциальная эффективность ЛК в лечении АА может быть обусловлена целым рядом факторов.

Известно, что в основе патогенеза любого воспаления лежит свободно-радикальное окисление. ЛК, являясь антиоксидантом, является «ловушкой» свободных кислородных и азотных радикалов и блокирует этот механизм.

В настоящее время большое внимание уделяется роли цитокинов в патогенезе РА. Наиболее значимым провоспалительным цитокином является фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), который индуцирует образование провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-17) в гиперплазированных синовиальных фибробластах, лимфоцитах и макрофагах. Он также стимулирует экспрессию рецепторов для ангиопоэтина-1, увеличивает количество остеокластов. В настоящее время на ряде моделей *in vitro* показано, что ЛК блокирует продукцию ФНО- α . Аналогичной способностью блокировать провоспалительные цитокины обладает группа наиболее динамично развивающихся препаратов для лечения ревматоидного артрита – биологические агенты.

Разрушение суставных тканей происходит под действием матричных металлопротеиназ (ММП), выработка которых стимулируется лигандом рецепторного

активатора ядерного фактора κB (RANKL). Он синтезируется синовиальными фибробластами, Т-лимфоцитами, макрофагами и остеобластами под влиянием ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-17 и ФНО- α . Известно, что АЛК напрямую ингибирует RANKL и выработку ММП.

Также в патогенезе РА играет роль активация системы комплемента, которая отвечает за воспаление и тканевую деструкцию. ЛК блокирует активацию комплемента, будь то NO-, липополисахарид-индуцированная активация или активация, вызванная метаболитами арахидоновой кислоты.

В связи с этим перспективным является изучение механизмов эффективности ЛК в качестве патогенетического средства для лечения РА.

ANTIOXIDANT SUPPRESSES AUTOIMMUNE INFLAMMATION,

INDUCED BY FREUND'S ADJUVANT INJECTION

Sabirova A.Ya., Zalyalyutdinova L.N., Nasybullina D.A.

Kazan state medical university, Kazan, Russia

sabirovy@yahoo.com

Introduction. Alpha-lipoic acid (LA) is a unique antioxidant which is soluble in both aqueous and lipid media. This lets her circulate in blood as well as get into the cells. LA is a popular research target for researchers all around the world. We designated this study to reveal anti-inflammatory activity of LA at oral administration in comparison with sodium diclofenac (DF) on a model of rheumatoid arthritis (RA) - adjuvant arthritis (AA) in rats.

This type of experimental arthritis was chosen, because subplantar injection of complete Freund's adjuvant produces contralateral arthritis, repeating basic human RA peculiarities: synovitis and formation of pannus, synovial hyperplasia, infiltra-

tion of inflammatory cells into the synovial tissue, synovial hyperalgesia and erosion of the articular cartilage and bone. Moreover, adjuvant arthritis modeling represents major cytokines and biological factors in the synovium and cartilage at human RA.

Materials and methods. AA was modeled in 65 white non-linear rats of 220 ± 20 g of both sexes by subplantar injection of 0,1ml of complete Freund's adjuvant into the rats' right posterior paw. Animals were treated with vehicle, mean therapeutic dose of DF and LA dosed 1/10, 1/100 and 1/200 of DL50 respectively. The treatment started on the 12th day after adjuvant injection and lasted for 14 days. Paw edema was evaluated on-cometrically at days 3, 6, 10, 14, 20 and 25. Each evaluation was repeated in duplicate. Student's t-test was used for statistical evaluation. $P<0,05$ was considered statistically significant.

Results. Primary inflammatory reaction was formed on the third day (mean increase in right paw volume was $66\pm 5\%$). By the end of the experiment (at day 25) it reached $76\pm 5\%$ in negative control and vehicle group. LA dosed 1/10 and 1/200 of DL50 almost deleted adjuvant-induced primary inflammation. LA dosed 1/100 of DL50 was not that efficacious, but still significantly exceeded efficacy of mean therapeutic dose of DF.

Secondary immunologic reaction started to form on the sixth day (mean left paw volume increase was $17\pm 2\%$). On the 25th day it reached $42\pm 5\%$ in control and vehicle group. Treatment with LA dosed 1/10 and 1/200 DL50 almost deleted adjuvant-induced secondary immunologic reaction. LA dosed 1/100 DL50 was not that effective, but exceeded DF efficacy again.

Conclusion. Thus, we showed for the first time, that oral administration of LA dramatically diminishes primary inflammatory and secondary immune reaction and exceeds efficacy of DF on the model of adjuvant-induced arthritis.

Discussion. Potential efficacy of LA in treatment of AA may be explained by a number of reasons.

Free-radical inflammation is known to serve as a base of any inflammation. LA as a substance with potent antioxidant features scavenges free oxygen and nitrogen species and inhibits this mechanism.

Currently, much attention is paid to the role of cytokines in RA pathogenesis. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is known to be that of major importance. It triggers production of proinflammatory cytokines, such as TNF- α itself, Il-1, Il-6, Il-7 and others in hyperplastic synovial fibroblasts, lymphocytes and macrophages. It also stimulates expression of angiopoietin-1 receptors, increases number of osteoclasts. It is now demonstrated on a number of in vitro models, that LA inhibits production of TNF- α . This mechanism is also typical of the most rapidly developing group of anti-rheumatoid drugs – biologic agents.

Destruction of joint tissues is realized by matrix metalloproteinases (MMP). Their production is stimulated by receptor activator nuclear factor κ B ligand (RANKL), which is produced by synovial fibroblasts, T-lymphocytes, macrophages and osteoblasts after their stimulation by Il-1, Il-6, Il-17 and TNF-alpha. LA is known to directly inhibit RANKL and MMP production.

Complement activation plays an important role in pathogenesis of RA and maintains inflammation and tissue destruction. LA inhibits complement activation, regardless to the way of activation (whether it is NO-, lipopolysaccharide- or arachidonic acid metabolites-induced activation)

For these reasons further study of mechanisms of effectiveness of LA as a pathogenetic therapy of rheumatoid arthritis is promising.

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭТИОЛОГИИ САХАРНОГО
ДИАБЕТА 1-го ТИПА
У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ**

**Селищева А.А.^{1,3}, Лотош Н.Ю.¹, Прошина А.Е.², Савельев
С.В.^{1,2}**

¹ АНО «Институт биомедицинских проблем»;

² НИИ Морфологии человека РАМН;

³ Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова.

aseelo@yandex.ru

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) развивается вследствие гибели β -клеток под действием Т-лимфоцитов, что влечет за собой понижение уровня инсулина, С-пептида и их предшественника проинсулина. Обнаружение латентного аутоиммунного диабета взрослых (LADA), выявленного сравнительно недавно, поставило вопрос об этиологической и патогенетической гетерогенности СД1. Целью настоящей работы является выявление пациентов в группах взрослых и детей с диагнозом СД1, у которых некоторые биохимические и иммуногистохимические показатели не согласуются с классической картиной СД1.

Материал аутопсий поджелудочной железы 6-и взрослых с диагнозом СД1 (от 27 до 50л) был исследован иммуногистохимическим методом с применением моноклональных антител к инсулину. Только в 2-х случаях из 6-и на срезах поджелудочной железы наблюдали полное отсутствие реакции на инсулин, что характерно для СД1. Еще в одном случае было выявлено явное снижение доли клеток, в которых был обнаружен инсулин. В остальных случаях им-

мунореактивность в β в-клетках островков Лангерганса больных СД1 не отличалась от контроля, т.е. срезов поджелудочной железы взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена.

В сыворотке крови 80 детей с СД1 (возраст от 3 до 14 лет) определяли содержание проинсулина и С-пептида методом иммуноферментного анализа. У большинства детей уровень проинсулина был ниже нормы, что типично для СД1. наряду с этим впервые установлено, что у части детей даже при длительных сроках заболевания содержание проинсулина остается в норме и коррелирует с содержанием С-пептида. Кроме того, у 5% детей с диагнозом СД1 уровень проинсулина даже превышал норму, что позволяет сделать предположение о возможности нарушений синтеза и/или секреции инсулина. Совокупность полученных результатов свидетельствует о гетерогенности патогенеза данного заболевания не только у взрослых, но и у детей. Предполагается, что у некоторой части больных СД1(как взрослых, так и детей) заболевание может иметь неаутоиммунную природу.

DIFFERENCE IN DIABETES TYPE 1 ETHYOLOGY IN ADULTS AND CHILDREN

Selishcheva A.A.^{1,3}, Lotosh N.G.¹, Proshchina A.E.², Savel'ev S.V.^{1,2}

¹ ANO «Institute of biomedical problems»

² Research Institute of Human Morphology of the Russian Academy of Medical Sciences

³ Lomonosov Moscow State University
ase@yandex.ru

It is usually supposed that type 1 diabetes mellitus (T1D) is an autoimmune disease that is caused by destruction of in-

sulin-producing β - cells due to the action of T-lymphocytes, followed by the decrease in the insulin level, C-peptide and their precursor proinsulin. However recent identification of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) testifies to pathogenetic and ethiological heterogeneity of this disease. This report presents the data suggesting that idiopathic diabetes may also occur in childhood.

We employed immunohistochemical methods with the use of insulin monoclonal antibody to study autopsy material of six adults (age from 27 to 50 years) who died from T1D. Only in two from six cases of the pancreas autopsies we observed the typical characteristic for T1D – e. i. the complete absence of reactivity to insulin. In one case we found strong decrease in fraction in the insulin containing cells. In three remaining cases immunoreactivity in islets of Langerhan β –cells turned out to be equal to that in control samples.

With the help of ELISA we determined content of proinsulin and C-peptide in serum from 80 children with T1D (from 3 to 14 years of age). We found that some children even after a long illness had normal the proinsulin content which correlated with C-peptide content. Besides, in about 5 % of children proinsulin level was even higher than in controls. For this group no correlation between C-peptide and proinsulin content was observed. We suppose that in this group have taken place an interruption of synthesis and/ or secretion of insulin.

The results obtained in our study testify to heterogeneity of T1D origin occurring not only in adults but in children. It is therefore possible that in some proportion of T1D patients (children as well as adults) the disease may have not autoimmune nature.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ

Филина Ю.В.^{1,2}, Арлеевская М.И.¹, Габдулхакова А.Г.¹

¹ – Казанская Государственная Медицинская Академия, ² – Казанский Государственный Университет, Казань

Ревматоидный артрит – заболевание, в патогенезе которого важнейшее значение имеет хронический воспалительный процесс, обусловленный избыточным синтезом провоспалительных факторов. Для него характерна длительная повторяющаяся активация фагоцитов периферической крови. Известно, что родственники первой степени родства имеют высокий риск развития РА. Обсуждается наличие врожденных особенностей функционирования мононуклеарных фагоцитов при этом заболевании.

Целью работы было изучение функций мононуклеарных фагоцитов: продукции активных форм кислорода (АФК) и фагоцитоза в группах больных РА (21 человек) и их кровных родственниц (24 человек). Контрольную группу составили 27 здоровых женщин, не имеющих наследственной предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям. Мы исследовали респираторный ответ моноцитов – обогащенных фракций клеток на опсонизированный зимозан (ОЗ) в группах в сравнении со здоровыми донорами, а также вклад внеклеточного Ca^{2+} в реализацию ответа. Продукцию АФК оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции, в качестве параметров ответа сравнивали спонтанные уровни продукции АФК в суспензии клеток и максимальные амплитуды ответов на стимуляцию ОЗ. Фагоцитоз ис-

следовали в динамике в течение 24 часов с помощью радиоизотопного метода, уровень внеклеточной глюконоидазы определяли методом флюоресцентной спектроскопии.

В моноцитах, как правило, процессы фагоцитоза и респираторного взрыва сопряжены, захват бактерии и формирование фагосомы сопровождаются выбросом АФК для усиления деградации бактериальных макромолекул. У больных РА мы выявили достоверное повышение уровня спонтанной продукции АФК в суспензии изолированных мононуклеарных фагоцитов (Д – $13,4 \pm 2,6$ у.е. и РА – $90,5 \pm 34,6$ у.е.), что, видимо, является следствием праймирования клеток провоспалительными факторами *in vivo*, а также усиленную (Д – $38,6 \pm 10,3$ у.е. и РА – $91,7 \pm 10,3$ у.е.), но замедленную выработку кислородных радикалов в ответ на стимуляцию опсонизированным зимозаном (ОЗ).

Поглощение бактерий (*S. aureus*, выращенный на среде с добавлением C^{14} - меченых аминокислот) клетками больных также было замедленным, но достаточно высоким. Значительный вклад в процесс фагоцитоза клетками больных, видимо, вносит «внеклеточное переваривание», о чем свидетельствует повышение экстраклеточного уровня лизосомального фермента глюконоидазы.

В группе родственников наблюдалась тенденция к повышению уровня спонтанной продукции АФК и замедлению оксидазного ответа на ОЗ, а также замедленный и заметно сниженный процесс поглощения и переваривания объектов фагоцитоза, что может быть одной из причин повышения частоты и продолжительности очаговых инфекций у родственников больных РА.

В норме процесс слияния фагосом с лизосомами и формирование фаголизосомы происходит в цитоплазме моноцитов. В фаголизосоме ферменты расщепляют бактериальные компоненты, и продукты распада затем высвобождаются во внеклеточное пространство. В экспериментах с $\beta 2$ -

МУФ – глюкоронидом – меченым аналогом субстрата лизосомального фермента глюкуронидазы – показано, что мононуклеарные фагоциты как больных, так и родственников, вероятно, переваривают объекты фагоцитоза преимущественно экстраклеточно – с помощью выброса во внеклеточную среду лизосомальных ферментов. Это может быть связано с замедленным процессом формирования замкнутых фаголизосом.

В регуляции процесса фагоцитоза и активности NADPH оксидазы лейкоцитов значительную роль играют ионы Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимые сигнальные системы. Показано, что именно ионы Ca^{2+} являются критическим моментом в процессе слияния фагосомы с лизосомой. Однако, роль ионов Ca^{2+} в регуляции респираторного взрыва, вызванного фагоцитозом, во многом не ясна, тем более нет таких данных при аутоиммунных заболеваниях. В наших экспериментах удаление внеклеточного Ca^{2+} в среде инкубации приводит к снижению ответа на ОЗ у здоровых доноров на $56 \pm 13\%$ в моноцитарной фракции клеток. Т.о., для полноценного респираторного ответа моноцитов необходим приток внеклеточного Ca^{2+} в клетку, и их ответ зависит от Ca^{2+} . У больных РА ответ моноцитов в бескальциевой среде снижался на $75 \pm 8\%$ ($n=10$) по сравнению с ответом в кальциевой среде. Это снижение может быть следствием истощения внутриклеточных Ca^{2+} -запасующих депо из-за активации моноцитов *in vivo*, что подтверждается почти 7-кратным повышением спонтанного уровня продукции АФК моноцитами у больных РА. У родственников больных РА также наблюдается снижение спонтанного и стимулированного уровней продукции АФК, но оно сопоставимо с уровнем в контрольной группе. Обобщая полученные результаты, мы можем сказать, что у больных РА есть значительные изменения в функционировании моноцитов периферической крови (видимо, вследствие длительной активации и, как

один из механизмов, истощения Са-запасающих депо), тогда как у родственников больных РА эти изменения пока только намечаются.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № № 00-04-48224, 09-04-97053.

FUNCTIONAL FEATURES OF THE PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES OF THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND THEIR GENETICAL RELATIVES

Filina Yu.V.,^{1,2}, Arleevskaya M.I.¹, Gabdoulkhakova A.G.¹

¹ – Kazan State Medical Academy, ² – Kazan State University, Kazan, Russia

In pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) significant role belongs to chronic inflammatory process mediated by overproduction of the proinflammatory factors. Disease is characterized by prolonged and repeated activation of peripheral blood phagocytes. It is known that the genetical relatives have high risk of the RA development. The presence of inherited features of mononuclear phagocyte functioning under this disease is discussed.

We aimed to study the functions of mononuclear phagocytes: production of the reactive oxygen species (ROS) and phagocytosis in the groups of the RA patients (21 individuals) and their immediate relatives (24 individuals). Twenty seven healthy women without inherited predisposition to autoimmune diseases composed the control group. We have investigated the respiratory response of the monocyte-enriched fraction cells onto opsonized zymosan (OZ) within the groups compared with healthy individuals, and also contribution of the extracellular calcium into the realization of cell response. ROS production was estimated by luminal-dependent chemiluminescence, as a

cell response parameter we compared spontaneous levels of ROS production in the cell suspension and maximal peaks of the cell response onto the OZ. Phagocytosis was studied in dynamics for 24 hours using radioisotope technique, the level of the extracellular glucuronidase was determined by fluorescent spectroscopy technique.

As a rule, the processes of phagocytosis and respiratory burst in monocytes are coupled: bacterial up-take and phagosome formation are accompanied by release of ROS to increase bacterial degradation. We have revealed increase of spontaneous level of ROS production by isolated peripheral blood monocytes (D – $13,4 \pm 2,6$ a.u. and RA – $90,5 \pm 34,6$ a.u.), that possibly could be a result of in vivo cell priming with proinflammatory factors; and also increased (D - $38,6 \pm 10,3$ a.u. and RA – $91,7 \pm 10,3$ a.u.) but delayed production of ROS in response to stimulation with OZ.

The engulfment of the bacteria (*S. aureus*, grown in the medium with added C^{14} – labeled amino acids) by the patient's cells was delayed but sufficiently high. Considerable contribution into phagocytosis by patient cells possibly brings the “extracellular digestion”, evidenced by increase of the extracellular level of the lysosomal enzyme glucuronidase.

We observed the tendency to increasing of the spontaneous level of ROS production and delaying of respiratory response to OZ, and also delayed and considerably decreased processes of engulfment and digestion of the phagocytosis objects that could result to increased frequency and duration of focal infections in RA relatives group.

In the norm the process of phagosome and lysosome fusion occurs in the cytoplasm of the monocytes. Enzymes cleave bacterial components inside the phagolysosome; and the degraded products are released into the extracellular matrix. In the experiments with β 2- MUF – glucuronide – a labeled substrate analog of the lysosomal enzyme glucuronidase - it was shown that

mononuclear phagocytes both of the RA patients and their relatives probably digest the phagocytosis objects mostly extracellularly due to the release of the lysosomal enzymes into extracellular area. It could be related to delayed process of formation of closed phagolysosomes.

Calcium ions and Ca^{2+} -dependent signaling pathways play significant role in the regulation of the phagocytosis and NADPH oxidase activity of the leukocytes. It has been shown that Ca^{2+} ions are crucial in the process of phagosome and lysosome fusion. Besides the role of Ca^{2+} in the respiratory burst regulation triggered by phagocytosis remain unclear, there is no such data for autoimmune diseases too. In our experiments the response of the monocytes to OZ was decreased down to $56\pm 13\%$ in the Ca^{2+} -free incubation medium in the group of healthy donors. Thus the OZ-induced respiratory burst dependent on Ca^{2+} and it is required the influx of the extracellular Ca^{2+} in to the cell is for the full-scale respiratory burst of the monocytes.. In RA group the monocyte response to OZ decreased to $75\pm 8\%$ ($n=10$) in Ca^{2+} -free medium compared with the response in the Hanks solution with 1 mM CaCl_2 . This decrease could be a consequence of the depletion intracellular Ca^{2+} -store due to in vivo monocyte activation, that confirmed by 7-fold increase of spontaneous level of ROS production by monocytes of RA patients. It was observed the same decrease of the levels of spontaneous and stimulated ROS production in Ca^{2+} -free medium in relatives group as in control group. Summarizing data we can conclude that RA patients have significant disorder in monocyte functioning (possible as a consequence of chronic activation) while the changes in the monocytes in the group of relatives just at the beginning.

The project was supported by grant of RFBR №№ 00-04-48224, 09-04-97053.

ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ОСОБЕННОСТИ ДНК В НОРМЕ И ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

**Хабибуллина А.А.¹, Шамсиева Р.Р.¹, Арлеевская М.И.²,
Невзорова Т.А.¹**

¹ – Казанский (Приволжский) Государственный Университет, ² – Казанская Государственная Медицинская Академия, Казань, Россия

TNevzorova@mail.ru

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое воспалительное заболевание соединительной ткани суставов, с вовлечением в патологический процесс других тканей и органов.

В развитии РА могут участвовать активные формы кислорода (АФК). Изменение уровня АФК и развитие окислительного стресса может являться одним из показателей, свидетельствующим об инициации патологических процессов у родственников больных, которые, возможно, имеют генетическую предрасположенность к РА.

У родственников и больных РА в сыворотке крови повышено ($\alpha=0,05$) содержание гидроперекисей липидов и составляет 0,032 о.е./мл и 0,034 о.е./мл соответственно; содержание оксида азота повышено и составляет 0,032 о.е. нитрит-иона (0,024;0,042) и 0,035 о.е. (0,025; 0,04) соответственно.

Достоверных различий в содержании церулоплазмينا, витаминов А и Е в сыворотке крови между группами не обнаружено. У родственников больных РА повышено содержание каротиноидов в сыворотке крови и составляет 4,7 мг/мл (2,67; 6,17).

Удельная активность супероксиддисмутазы эритроцитов в группах не отличается. У близких родственников

больных РА повышена активность каталазы (0,064 мкмоль/мин: 0,029; 0,075).

Одним из характерных признаков РА и, возможно, одной из причин развития является повышенное содержание в крови больных аутоантител (ААТ) к ДНК, которые, взаимодействуя с клетками организма, вызывают их функциональные нарушения. Вероятно, изменения в строении ДНК могут инициировать образование патологических ААТ к ДНК.

Флуоресценция комплексов этидий бромид (ЭБ)-ДНК и ДАФИ-ДНК мононуклеаров крови родственников больных РА достоверно повышена. ДНК мононуклеаров родственников отличается по электрофоретической подвижности от ДНК здоровых доноров и больных РА. Спектры поглощения ЭБ при взаимодействии с ДНК родственника больного РА и здорового донора подобны и отличаются от спектра поглощения ЭБ с ДНК больного РА.

В докладе обсуждаются возможные причины развития РА.

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS AND FEATURES of DNA IN HEALTH AND RHEUMATOID ARTHRITIS

Khabibullina A.A.¹, Shamsieva R.R.¹, Arleevskaya M.I.², Nevzorova T.A.¹

¹ - Kazan (Volga) Federal University, ² – Kazan State Medical Academy

TNevzorova@mail.ru

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease of the connective tissue of joints with involvement of other tissues and organs to the pathological process.

Reactive oxygen species (ROS) may be involved in the development of RA. Change the level of ROS and oxidative

stress may be to serve as a criterion for testing the initiation of pathological processes in relatives of patients who may have genetic predisposition to RA.

The content of lipid hydroperoxides is increased ($\alpha = 0,05$) in serum - 0,032 OE/ml and 0,034 OE/ml in relatives and patients with RA respectively; the content of nitric oxide is 0,032 OE of nitrite ion (0,024; 0,042) and 0,035 OE (0,025; 0,04) respectively.

No significant differences in the content of ceruloplasmin, vitamins A and E in the blood serum between the groups were found. The content of carotenoids in the blood serum of relatives is increased – 4,7 mg/ml (2,67; 6,17).

The specific activity of erythrocyte superoxide dismutase in the groups is not differ. The activity of catalase of relatives is increased (0,064 micromol/min: 0,029; 0,075).

The one of characteristic features and, possibly, the one of the reasons of RA development is the high level of autoantibodies (AAb) to DNA in the blood of patients. This AAb may interact with cells of an organism, causing their functional disorders. Probably, the changes in the structure of DNA can initiate the formation of pathological AAb to DNA.

Fluorescence of complexes of ethidium bromide (EB)-DNA and DAPI-DNA of blood mononuclear cells in relatives of patients with RA is significantly increased. The cell DNA of relatives differ in electrophoretic mobility from DNA of healthy donors and RA patients. The absorption spectrum of EB-DNA interaction of relatives and healthy donors are similar and differ from spectrum of EB-DNA interaction of RA patients.

The possible reasons of the development of RA in this report are discussed.

ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К ДНК НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ПОЧЕК ЭМБРИОНА СВИНЬИ (СПЭВ) В ПРИСУТСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ *IN VITRO*

Храмова А.Ю., Иванова В.В., Сабирзянова А.З., Невзорова Т.А.

Кафедра биохимии, – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет», Казань, Россия
alinakhranova@mail.ru, fairybloom@rambler.ru, tnevorova@mail.ru

Антитела (АТ) к нДНК присутствуют в небольших количествах в крови клинически здоровых доноров, но при аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка (СКВ) и ревматоидный артрит (РА) происходит значительное увеличение содержания АТ к нДНК. АТ к нДНК могут взаимодействовать с клетками организма и ядрами, вызывая различные морфологические и функциональные изменения, приводящие к патологии.

Вероятно, АТ к ДНК, обладая перекрестной реактивностью, могут по-разному взаимодействовать с нДНК и модифицированной ДНК. Ультрафиолетовое облучение (УФ), в зависимости от спектра, вносит одно- и двуниевые разрывы в молекулу ДНК.

Для исследования влияния АТ к нДНК в присутствии УФ облучения *in vitro* на клетки СПЭВ проводили анализ общего количества и количества жизнеспособных клеток, потребление клетками глюкозы из среды, ДНК-комет тест и флуоресценцию комплексов ДАФИ-ДНК и ЭБ-ДНК клеток после культивирования.

Выявлено, что АТ к ДНК при СКВ и РА приводят к повышению общего количества и доли жизнеспособных

клеток линии СПЭВ *in vitro*. АТ к ДНК здорового донора приводят к снижению доли жизнеспособных клеток. АТ к ДНК повышают потребление глюкозы из среды клетками линии СПЭВ при культивировании в течении двух суток *in vitro*.

АТ к ДНК изменяют жизнеспособность и потребление глюкозы из питательной среды клетками линии СПЭВ при воздействии УФ облучения, способствуют делению клеток и сохранению их жизнеспособности при 30 минутном УФ облучении.

Анализ ДНК-комет показал, что фрагментации ДНК не происходит. Культивирование клеток линии СПЭВ в присутствии АТ к ДНК при воздействии УФ облучения приводит к тушению флуоресценции комплексов ЭБ-ДНК и ДАФИ-ДНК.

В докладе обсуждаются возможные механизмы действия АТ.

INFLUENCE OF ANTIBODIES TO DNA ON INCUBATION OF PIG KIDNEY EMBRYONIC CELLS LINE PE (SPEV) WITH ULTRAVIOLET RADIATION IN VITRO

**Khramova A.Yu., Ivanova V.V., Sabirzyanova A.Z.,
Nevzorova T.A.**

department of biochemistry – Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Russia

*alinakhramova@mail.ru, fairybloom@rambler.ru,
tnevzorova@mail.ru*

Small amounts of antibodies (Abs) to dsDNA are present in blood of health, but at autoimmune diseases, such as systemic lupus erithematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) occurs substantial level is increased of anti-dsDNA Abs. Anti-dsDNA

Abs can interact with the cells and their nuclei, causing the various morphological and functional changes which are leading to pathology.

Possibly, anti-dsDNA Abs can cross react and differently interact with dsDNA and modified DNA. The ultraviolet irradiation (UV) depending on a spectrum bring single- and double-strained nicks in DNA.

For research of influence of anti-dsDNA Abs with UV irradiation on SPEV *in vitro* a total quantity and viability of the cells, uptake of glucose from the medium by the cells, comet assay and fluorescence of DAPI-DNA and EtBr-DNA complexes after incubation were analyzed.

Anti-dsDNA Abs with SLE and RA are revealed to increase of total quality and viability of cells *in vitro*. Anti-dsDNA Abs of the healthy donors decrease viability of cells. Anti-dsDNA Abs increase of glucose uptake from the medium by the cells during two days of incubation *in vitro*.

Anti-dsDNA change viability and uptake of glucose from a nutrient medium by SPEV at UV irradiation, promote the cell division and their viability at 30 minutes UV with following incubation.

Cell DNA fragmentation does not occur by comet assay. Incubation of SPEV cells in the presence of anti-dsDNA Abs with UV irradiation leads to quenching of fluorescence of EtBr-DNA and DAPI-DNA.

In this report a possible mechanisms of anti-dsDNA Abs action are discussed.

ИЗБРАННЫЕ ДОКЛАДЫ

СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ КАК ОСНОВА ДОНОЗОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ.

Зинкевич О.Д., Сафина Н.А.

ГОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

В настоящее время стало очевидным, что клиническая диагностика заболеваний не обеспечивает основной задачи медицины - организации первичной профилактики. Для решения этой важной задачи необходимо уметь определять не наличие заболевания, а преморбидные состояния. То есть такие состояния, когда в организме произошли неманифестированные изменения в различных органах и системах, на фоне которых может возникнуть патологический процесс (1). На большом статистическом материале доказано, что у лиц, работающих, или проживающих в зонах с развитой химической промышленностью наблюдается повышенная заболеваемость. Причём, это относится как к инфекционным сезонным (ОКИ и ОРВИ), так и к хроническим соматическим заболеваниям (2). Наиболее часто при этом поражаются дыхательная и пищеварительная системы (3,4). По мнению наших ведущих учёных основой методологии донозологической диагностики (Р.В. Петров, Хайтов, и т.д.) является состояние гуморального иммунитета к основным структурным компонентам условно патогенной микрофлоры, находящейся в симбиотических взаимоотношениях с организмом человека и которая является определяющей в возникновении многих патологических процессов. Помимо того, что эта микрофлора определяет эндоэкологию человека, она является объектом воздействия экологических фак-

торов внешней среды. В свою очередь, иммунная система организма отслеживает изменения в состоянии микробиоценоза и реагирует выработкой антител различных классов к молекулярным структурам всех участников этого процесса. То есть не только к антигенам микрофлоры слизистых и кожи человека, но и собственным тканям организма при их повреждении. Вместе с тем до сих пор не разработаны количественные характеристики состояния гуморального специфического иммунитета применительно к шкале - полное здоровье - относительное или практическое здоровье - предболезнь до границы болезни. Не определён так же минимально-необходимый перечень основных антигенов участников микробиоценоза, позволяющий с достаточной степенью вероятности проводить донозологическую диагностику и выявлять среди населения группы риска с последующей профилактикой заболеваний. С учётом последних исследований, посвящённых изучению состояния гуморального иммунитета при различных патологических состояниях (5), мы поставили целью изучить характер и степень изменений в гуморальном антиэндотоксиновом и антибактериальном иммунитете у лиц, работающих и (или) проживающих в зонах с развитой химической промышленностью, и выявить наличие корреляционных связей этих изменений с возникновением различных патологических состояний.

Обследовано 620 взрослых жителей проживающих в городе с развитой нефтехимической промышленностью. Из них 230 работающих на нефтехимическом предприятии, которые были обследованы кардиологом, гастроэнтерологом, аллергологом-иммунологом, эндокринологом, урологом, инфекционистом с применением инструментальных (УЗИ, ЭКГ) и лабораторных методов (гормоны щитовидной железы, простат специфический антиген).

У всех лиц, методом иммуноферментного анализа, была определена концентрация антител к эндотоксину гра-

мотричательной микрофлоры (гликолипид S. Minnesota RE 595), к липополисахариду E.coli, и к соматическим антигенам Pr.mirabilis, Ps.aeruginosa, St. aureus, Streptococcus pneumonia, Klebsiella pneumonia, Candida albicans.

Результаты и обсуждение. Результаты обследования сплошной, слепой выборки лиц, проживающих в регионе с развитой нефтехимической промышленностью, приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Концентрация антиэндотоксиновых и антибактериальных антител населения с развитой нефтехимической промышленностью (N = 620).

Наименование антигенов	Среднее (M±m)	-95% достоверности	+95% достоверности	Min. значение	Max. значение
S.Minnesota RE 595	9,88±0,386	9,07	10,69	1,20	100,45
E.coli	22,29±1,008	20,31	24,27	1,20	201,07
Ps.aeruginosa	16,68±0,611	15,48	17,88	1,20	161,24
Proteus spp.	16,71±0,716	15,30	18,11	1,20	173,73
St.aureus	9,81±0,370	9,08	10,54	0,00	51,04
Streptococcus spp.	20,99±1,126	18,77	23,22	1,00	260,06
Klebsiella spp.	38,37±1,573	35,28	41,46	1,40	214,28
Candida albicans	25,94±0,812	24,35	27,54	1,70	198,23

Анализ полученных результатов позволил выявить три группы обследуемых по состоянию антиэндотоксинового иммунитета. 132 обследуемых имели уровень антител к эндотоксину ниже среднестатистической нормы (N-2σ, N=8,368±0,392 мкг/мл). Из них у 26 концентрация антител

была крайне низкой и колебалась от 2 до 0,1 мкг/мл.

Высокие концентрации антител к эндотоксину имели ($N+2\sigma$) наблюдались у 99 обследуемых. У 12 из них содержание АТ превышало 30 мкг/мл, а у 7 человек составило 120 мкг/мл. К антигенам *E.Coli* 88 человек имели уровень антител $<N, 142 >N$ и у 390 обследуемых уровень антител находился в пределах нормы. К *Ps. Aerug.* 158 обследуемых имели уровень антител ниже нормы, 92 больше нормы и у 370 находился в пределах нормы. К антигенам *Proteus* 117 обследуемых имели уровень антител ниже нормы, 133 выше нормы, 370 в пределах нормы. К антигенам золотистого стафилококка только 74 обследуемых имели уровень антител ниже нормы, 106 выше нормы и 440 в пределах нормы. К антигенам пиогенного стрептококка у 127 человек уровень АТ ниже нормы, у 127 выше и 366 в пределах нормы. К антигенам *Klebsiella pn.* 130 имели уровень АТ $<N, 140 >N$ и 350 человек имели уровень антител в пределах нормы. К антигенам *Candida albicans* у 140 человек уровень АТ $<N, у 412$ в пределах нормы и только у 68 превышал нормальные значения. Из всех обследуемых сделана выборка рабочих и инженерно-технических работников, имеющих постоянный контакт на производстве с вредными выбросами органической природы, (спирты, альдегиды, олефины, фенолы, бензол и его производные и т.д.). Анализ выявил существенное отличие обследуемых по уровню антиэндотоксиновых и антибактериальных антител. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Концентрация антиэндотоксиновых и антибактериальных антител у рабочих и ИТР на нефтехимическом производстве ($N = 217$).

Наименование антигенов	Среднее (M±m)	-95% достоверности	+95% достоверности	Min. значение	Max. значение
S.Minnesota RE 595	12,28±0,803	10,69	13,86	2,03	100,45
E.coli	33,84±2,461	28,99	38,69	2,87	201,07
Ps.aeruginosa	20,36±1,233	17,93	22,79	3,95	161,24
Proteus spp.	25,48±1,555	22,42	28,55	4,65	173,73
St.aureus	15,43±0,745	13,96	16,90	2,62	51,04
Streptococcus spp.	34,07±2,843	28,46	39,67	3,71	260,06
Klebsiella spp.	62,46±3,678	55,21	69,71	7,90	214,28
Candida albicans	27,18±1,828	23,58	30,78	5,05	198,23

В первую очередь характерным является более высокий уровень антител к антигенам условно патогенной микрофлоры по сравнению с населением региона не имеющего постоянного профессионального контакта с выбросами нефтехимического производства. Наиболее существенно иммунитет повышен у этой когорты обследуемых к антигенам *Streptococcus pneumoniae* и *Klebsiella pneumoniae* (на 62,3% и 62,8% соответственно). Чуть меньше, но тоже существенно повышены, средние концентрации АТ к липополисахариду *E.coli*, к соматическим антигенам *Pr.mirabilis*, *St.aureus* (на 51,8%, 52,5%, 57,3% соответственно) и в меньшей степени к антигенам гликолипида *S.Minnesota RE 595* и соматическим антигенам *Ps.aeruginosa* (24,3% и 20,6% соответственно). Концентрация антител к антигенам *Candida albicans*, у рабочих и ИТР нефтехимического предприятия существенно не отличалась от средних концентраций населения данного региона.

Характер распределения работников нефтехимического предприятия по уровню антиэндотоксиновых и антибактериальных АТ, также существенно отличался от среднего распределения у населения данного региона.

Наиболее существенным является увеличение числа лиц с уровнем АТ $>N$ к соматическим антигенам протей, стрептококка, стафилококка, клебсиелл и к липополисахариду кишечной палочки. В то же время увеличена доля обследуемых лиц со сниженным иммунитетом к соматическим антигенам *S.albicans*. По всей видимости, это свидетельствует о естественной иммунизации работающих вследствие частых простудных, гнойно-воспалительных и желудочно-кишечных заболеваний при одновременном снижении напряжённости клеточного иммунитета, о чём свидетельствует низкий уровень антикандидозных антител.

В связи с такими существенными отличиями в состоянии гуморального иммунитета у работников нефтехимического предприятия, мы сделали выборку лиц не имеющих постоянного производственного контакта с производственными выбросами. В основном это были работники общепита, бухгалтеры, экономисты, водители, служащие центрального управления. Выборка составила 403 человека. Результаты приведены в таблице 3.

Средние показатели концентраций антибактериальных и антиэндотоксиновых антител находились в пределах нормального распределения (определённого на выборке из 1200 здоровых доноров крови г.Казани). Концентрации антител располагались в довольно узкой зоне, о чём свидетельствует небольшая стандартная девиация и отсутствие высоких максимальных показателей.

Таблица 3

Концентрация антиэндотоксиновых и антибактериальных антител у лиц, проживающих в регионе с развитой нефтехимической

промышленностью, но не имеющих производственного контакта с химическими выбросами (N=403)

Наименование антигенов	Среднее (M±m)	-95% достоверности	+95% достоверности	Min. значение	Max. значение
S.Minnesota RE 595	8,37±0,392	7,60	9,14	1,20	60,00
E.coli	15,67±0,549	14,59	16,75	1,20	60,00
Ps.aeruginosa	14,48±0,612	13,28	15,69	1,20	60,00
Proteus spp.	11,77±0,559	10,67	12,87	1,20	78,40
St.aureus	6,56±0,215	6,14	6,98	0,00	34,50
Streptococcus spp.	13,76±0,554	12,67	14,85	1,00	60,00
Klebsiella spp.	25,25±0,859	23,56	26,94	1,40	62,30
Candida albicans	25,09±0,750	23,62	26,56	1,70	61,00

Хотя распределение по уровню АТ в этой группе было более однородным относительно антигенов разных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, наблюдается высокий процент населения с иммунитетом ниже нормальных показателей по сравнению с населением г. Казани (регион с меньшим уровнем техногенного загрязнения нефтехимических производств). Такая высокая прослойка лиц с низким иммунитетом является фактором, предрасполагающим к более частому возникновению или обострению гнойно-воспалительных и простудных заболеваний.

Анализ заболеваемости работников, имеющих постоянный, профессиональный контакт с производственными выбросами, показал, что напряжённость гуморального иммунитета к эндотоксину грамотрицательной микрофлоры и к соматическим антигенам синегнойной палочки не отража-

ются на частоте заболеваний органов желудочно-кишечного тракта, мочевыводящей системы, сердечно-сосудистой системы, простаты, щитовидной железы и органов дыхания. В то же время, при изучении этих показателей у больных с острыми воспалительными, аллергическими и хирургическими заболеваниями мы наблюдали значительную вариабельность в зависимости от стадии или тяжести патологического процесса.

Наибольшая частота выявления и встречаемости патологических изменений в различных органах и системах наблюдается при высоком уровне антител к липополисахариду кишечной палочки, соматическим антигенам протей, стафилококка, стрептококка, клебсиелл и низком уровне иммунитета к соматическим антигенам *S.albicans*.

При выборке сочетания высоких концентраций антител к перечисленным микробным антигенам и низким к *S.albicans* (всего 172 человека), частота выявления патологических нарушений в изученных органах и системах достигает 99,32 % (147 человек). Из всех выявленных лиц, только 1 обследуемый, с гастритом желудка, не вошел в эту выборку. Остальных обследуемых лиц (25 человек) можно с большой степенью вероятности отнести в группу риска по возможности возникновения различных заболеваний или они находятся в стадии “предболезни”.

Для проведения массовых обследований населения, проживающего в экологически неблагоприятных регионах, а так же работников химических предприятий, с целью выявления предболезни и групп риска, нуждающихся в проведении профилактических мероприятий, рекомендуется на первом этапе обследования определение концентрации антител к липополисахариду кишечной палочки, соматическим антигенам протей, стафилококка, стрептококка, клебсиелл и кандиды. Данный подход является экономически и социально целесообразным, поскольку при малых затратах

он позволяет определить группу лиц, нуждающихся в обследовании узкими специалистами или проведении профилактических мероприятий.

Выводы:

1. У лиц, проживающих в зонах с развитой нефтехимической промышленностью наблюдается повышенный уровень антител к липополисахариду *E.coli*, и к соматическим антигенам *Pr.mirabilis*, *St. aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Klebsiella pneumonia*, *Candida albicans*.

2. Изучение напряжённости гуморального иммунитета к ЛПС кишечной палочки, и соматическим антигенам протей, стафилококка, стрептококка, клебсиелл и дрожжам рода кандиды можно использовать в качестве скрининга для выявления групп риска по возникновению соматических заболеваний различной топографии.

Литература:

1. Кошелев Н.Ф. и др. Гигиена и санитария 1992, 11-12, С.14-17
2. Карамова Л.М., Сулейманов Р.А., Галиев М.А. // Гиг. и сан. – 1996. - №1. – С. 37-39.
3. Ещанов А. Т., Кулаков А.В., Кулаков В.В. и др.//Вестн. Каракалпак.отд-ния АН Узбекистана. – 1992. - №3. – С.34-36.
4. Любченко П. Н., Горенков Р.В., Ковальков А.И. и др.//Тер.арх. - 1994. - №12. - С. 70-74.
5. Кулаков А.В., Климова С.В., Серков И.Л. др.//Иммунология. – 1999. - №6. – С.56-58.
6. Зинкевич О.Д. и соавт. //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1999. - №2. - С.65-68.
7. Амиров Н.Х., Ситдикова И.Д. Канцерогенные и мутагенные эффекты воздействия факторов производственной среды. // Казан. Мед. Журн. – 1999. – Т. 80, № 1. – С.13-16.

РОЛЬ БАНАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Арлеевская М.И., Габдулхакова А.Г., Цибулькин А.П.
Казанская Государственная Медицинская Академия,

Предпосылки к исследованию

■ Ревматоидный артрит (РА) – результат равноправного взаимодействия случайного сочетания точечных мутаций ряда генов с факторами окружающей среды (инфекции).

■ Родственники I степени родства предрасположены к развитию РА.

■ РА – модель для изучения механизмов развития аутоиммунных заболеваний.

Проблема взаимосвязи РА и инфекций включает 2 аспекта:

■ Неадекватность противoinфекционной защиты, провоцирующая развитие аутоиммунного процесса у предрасположенных индивидуумов?

■ Факторы, способствующие развитию инфекций при продвинутом РА (иммунодепрессивные препараты, малая подвижность больных, ...)?

■ Взаимодействие организма с инфекционными агентами – процесс, меняющийся во времени под влиянием факторов, которые могут различаться на разных стадиях развития заболевания.

Цель – исследование чувствительности к инфекциям лиц, предрасположенных к развитию РА и эволюции инфекционного синдрома после развития артрита.

Объекты исследования:

■ 195 пациенток (Б) с достоверным РА.

102 Б взяты под наблюдение в первые 3 –24 недели артрита или перешли из группы Р.

■ 185 их условно здоровых родственников I степени родства (Р).

■ 180 условно здоровых женщин с не отягощенной аутоиммунными болезнями наследственностью (ЗК).

Дизайн клинических исследований

■ **Критерии исключения** для всех групп – наличие известных факторов риска развития инфекций, сопутствующих хронических заболеваний.

■ **Дополнительный критерий исключения у Б** – лейкопения.

■ **Все Б постоянно получали базисные препараты:** метотрексат (75%), сульфосалазин (15%), арава (5%), 16 пациенток – инфликсимаб, инъекции кортикостероидов в суставы во время обострений РА ~ 40% Б, 20% Б – кортикостероиды per os (10 мг/с преднизолона).

■ **При явной связи инфекционного синдрома с приемом цитостатика** больные исключались из исследования.

■ **Все обследованные Р и ЗК** с их точки зрения и с точки зрения окружающих, в том числе врачей при нерегулярных обращениях за медицинской помощью, не были хронически больными людьми.

■ **Все исследования проводились** в отсутствие острых и обострения хронических инфекций.

■ **Длительное (>10 лет) наблюдение** (осмотр 1 раз в 3 - 6 месяцев) с фиксацией количества и длительности инфекционных эпизодов. При наличии документальных подтверждений учитывали данные катамнеза.

■ **Инфекционный синдром оценивали** по протоколу диагностики первичного иммунодефицита [Петров Р.В. и соавт., 2000].

■ **Регулярное стандартное лабораторное обследование** с целью выявления общевоспалительного синдрома (ОАК, СРБ, фибриноген), аутоиммунного синдрома

(РФ, антиМСV, антитела к ДНК, ЦИК, комплемент, иммуноглобулины), а также периодически – рентгенография и МРТ суставов, микробиологическое исследование.

■ **Статистическая обработка** данных – t-критерий Стьюдента, критерий знаков, критерий Манна - Уитни.

Результаты клинических наблюдений. ЗК страдали инфекциями в среднем 2,63 раз в году с общей продолжительностью инфекционных эпизодов 21,32 дня. Частота и продолжительность инфекций в группе Б в целом были близки к таковым у ЗК (2.46 раз в год и 24.52 дней). Однако анализ взаимосвязей показателей с продолжительностью РА выявил интересные закономерности. Частота и продолжительность инфекционных эпизодов в дебюте РА достоверно превышали показатели ЗК и постепенно снижались в течение 3 лет от начала артрита. У Р частота и продолжительность инфекционных эпизодов были близкими к таковым при раннем РА и достоверно более высокими по сравнению со ЗК и Б со стажем.

У родственников обнаружены снижение активности лизоцима (по 50% гемолизу эритроцитов), активности системы комплемента (СН50), активности нейтрофилов и моноцитов крови. При РА все эти показатели были избыточными по сравнению с контролем и показателями родственников.

Уровни сывороточных антител к возбудителям банальных инфекций у родственников превышали показатели контроля и были еще более высокими у больных РА.

У 100% родственников в крови был повышен уровень провоспалительных цитокинов (ФНО альфа, ИЛ -1бета, ИЛ-6). При этом уровни этих цитокинов у больных были также достоверно более высокими по сравнению с контролем, но не достигали значений группы родственников.

При всей многовариантности механизмов, приводящих к развитию РА, представленные нами данные позволяют предположить следующую цепь событий. У предраспо-

ложенных к РА индивидуумов неспецифические факторы противоинфекционной резистентности не справляются с повторяющейся банальной инфекцией, что приводит к развитию частых и длительных инфекционных эпизодов и в конце концов – к подключению системного провоспалительного и адаптивного иммунного ответов. Это событие, несомненно, выгодное для избавления от инфекций одновременно провоцирует дебют РА. Дальнейшее взаимодействие РА и инфекций – это нестабильный процесс, чувствительный ко многим внешним и внутренним факторам.

Исследование поддержано грантами РФФИ 00-04-48224, 09-04-97053

THE ROLE OF COMMON INFECTIONS IN THE ONSET OF RHEUMATOID ARTHRITIS

**Arleevskaya M.I., Gabdulhakova A.G., Tsyboolkin A.P.
Kazan State Medical Academy,**

Rational

■ Rheumatoid arthritis develops as the result of interaction of random combination of some gene single nucleotide polymorphism and environmental factors (particularly infections).

■ First degree relatives are predisposed to the rheumatoid arthritis development.

■ Rheumatoid arthritis is the accepted model for study of the pathogenesis of autoimmune diseases.

We believe that the problem of interconnection of RA and infection includes two aspects: (1) is there an inadequacy of anti infectious defense, leading to the provocation of autoimmune process in predisposed to RA individuals; (2) are there factors, predisposing to the infections in patients with advanced RA? At any case the interrelation of microorganisms and a host is not an

entity, but a process, sensitive to various factors, the later may differ on various stages of the RA evolution.

The aim was to study the sensitivity to common infections and its evolution after the onset of arthritis in prone to RA individuals.

Objects:

This study included a total of 560 women: 195 patients (P) with RA proved according to ARA RA criteria (about 20% of P were under our observation since first 2-6 months of joint complaints – "very early" and "early" RA), 185 assumed to be healthy first degree maternal female relatives (R) of these patients (126 daughters, 47 sisters, 7 mothers and 5 woman, who happened to be both a sister and a daughter of RA P), as well as 180 assumed to be healthy women, not hereditary tainted with autoimmune diseases - donors (D).

The exclusion criterion in all groups was presence of known risk factors of infections – smoking, habitual alcoholism, diabetes mellitus, concomitant chronic diseases [1]. Special exclusion criteria in RA group – leucopenia. All P were receiving the sustained DMARD therapy: methotrexate (75%), sulfasalazine (15%), leflunomide (5%), as well as intramuscular gold, cyclosporine, cyclophosphamide, hydroxychloroquine; 16 patients were receiving infliximab), intraarticular corticosteroids during the exacerbations of RA (~40% of P), 20% P were receiving corticosteroids per os in average 10 mg prednisolone daily.

All those R and D under study were not chronic patients from their point of view and from the point of view of all surrounding them including doctors; for all that these subjects did not seek a regular medical advice.

A long - term (> 10 years) clinical observation was made with at least semiannual supervision and the documented data on catamnesis were studied in P and R with the special attention on the number and duration of focal infectious episodes. The incid-

ence and duration of infectious episodes was analyzed every 3 - 6 months. All the infectious episodes, observed by us, were outpatient.

Clinical examination was conducted according to protocols for diagnosing infectious syndrome in the cases of suspected primary immunodeficiency provided by the Institute of Immunology of the Russian Public Health Ministry [2]. The protocols practically coincide with those offered by European and Panamerican immunodeficiency society for estimating risk factors of primary immunodeficiency, the Russian variant being more detailed and taking in stock non severe infections as well with recording incidence and duration of all infectious episodes [3]. In brief – fungal, herpes, respiratory viral infections, acute as well as presence and exacerbations of chronic focal infections of otolaringologic organs and of respiratory and genitourinary tracts, skin tissue infections, and acute gastroenteritis, acute cholecystitis, infections were registered.

Statistical analysis was performed employing sign criterion and Student's t-test .

Clinical examination results. D suffered from focal infections at an average 2.63 times per year with the total duration of infectious episodes 21.32 days annually.

The characteristics of the infectious syndrome in the whole P group were exceptionally similar to that in D – the incidence of episodes 2.46 times / year, the total duration of infectious episodes 24.52 days annually. The analysis of interrelation of the studied induces and RA duration revealed some interesting regularity. Frequency and duration of infectious episodes per year in the RA onset were reliably higher than that in D, these induces consequently decreasing in three years. For example, 33 patients with early RA (< 6 months of arthritis) suffered from focal infections 4.35 times / year, 45.36 days annually. In subgroup of 102 P with advanced RA (>3 years duration) these induces were 1.68 times / year and 16.4 days annually. The mod-

erate reverse correlation of RA duration with the incidence of infectious episodes ($r = - 0.32$, $p < 0.01$) and with their duration ($r = - 0.33$, $p < 0.01$) was revealed.

In R the incidence of infectious episodes (4.98 times / year), and their duration (50.82 days annually) were similar to that in early RA and reliably exceeded that in D and P with advanced RA.

In R lyzosome activity and complement system activity, as well as polymorphonuclear and mononuclear phagocyte functions were decreased, the induces being abundant in rheumatoid arthritis group.

The levels of serum antibodies to common infectious agents in relatives and rheumatoid arthritis patients.

In 100% relatives and rheumatoid arthritis patients the increased levels of proinflammatory cytokines (TNF alpha, IL-1beta, IL-6) were found.

So, the following chain of events looks quite permissible. In prone to RA individuals the focal anti infectious factors do not cope well enough with repeated exposure of commonplace infectious agents, that leading to frequent and continuous focal infectious episodes and, eventually, to attachment of systemic proinflammatory and adaptive immune responses. This activity, being undoubtedly beneficial in anti infectious defense, lets to stop the repeated infections, but also provokes RA onset. The further interrelation of RA and infections is an instable process, sensitive to a lot of internal and external factors.

The work was supported by RFBR grants №№00-04-48224, 09-04-97053

MONOCYTE AND GRANULOCYTE APHERESIS IMMUNOTHERAPY IN A CLINICAL SETTING

Peter Björk M.D., Ph.D.

Lund University, Malmö, Sweden.

This talk will include method and clinical results with several forms of immunoregulatory therapy modalities.

Extracorporeal photopheresis is used to inhibit T lymphocyte expansions in cutaneous T cell lymphoma (mycosis fungoides), Sezary syndrome and severe cases of transplant rejection, as well as in systemic lupus resistant to conventional treatment.

Plasmapheresis is used in organ-specific autoimmune disorders with pathogenic immunoglobulins.

Apheresis for the specific adsorption and elimination of granulocytes from peripheral blood (Adacolumn) is used mainly in inflammatory bowel disease (IBD) (Crohn's disease and ulcerative colitis).

CANCER IN PATIENTS: MORE OF POLYGENIC DISEASE AND LESS OF MULTIPLE MUTATIONS?

Anders Bredberg M.D., Ph.D.

Lund University, Malmö, Sweden.

In this review talk some quantitative aspects of carcinogenesis are described, to suggest that the mutations driving cancer cells is not a main cause of clinical cancer disease. There is a striking quantitative difference between the high numbers of tumor-influencing molecular events and the resulting cases of cancer disease. This observation suggests the presence of a robust biological mechanism which determines a narrow window of cancer incidence, indicating opportunities for highly potent therapeutic tools.

The focus of cancer research at present is on cancer-specific mutations, with most clinical trials involving targeted drugs. However, there has been skepticism to the muta-

tion-centered model of cancer. The Weinberg and Hanahan classical paper from the year of 2000 defining the six hallmarks of cancer urged attention on systemic factors, especially the interaction between cancer cells and the tumor stroma. Most recently, Brash and Cairns has related classical animal experiments, with a single genotoxic initiation step followed by a non-mutational promotion period, and alerted the ‘readers to new developments that could at least start to clarify what is going on during carcinogenesis’.

This talk will outline some quantitative aspects of carcinogenesis, and then make the argument that these could imply a network-type of robust regulatory mechanism.

Huge numbers of DNA lesions and tumour resistance events, in each of the $>10^{13}$ cells of a human individual, form a striking contrast to the low, and also very narrow, cancer incidence window (10^{-1} - 10^0), with only one person out of three that gets a cancer during his or her life-time. A detailed consideration of these quantitative observations seems to put the present paradigm to the question, and to indicate that a systemic regulatory network mechanism is a stronger determinant for overt cancer disease, as compared with cancer-specific gene products. If we shall ever achieve major improvements in survival, we must gain understanding of this systemic network, rather than targeting therapy to a limited set of molecules or mutations. This may give us new opportunities for development of highly potent therapeutic tools.

**IMMUNOMODULATORY PROBIOTICS AS A NEW
THERAPEUTIC OPTION IN TREATMENT OF CNS
AUTOIMMUNITY**

Shahram Lavasani Ph.D.

Lund University, Malmö, Sweden.

Abstract:

Probiotics, including lactobacilli, are known to induce immunomodulatory activity with promising effects in inflammatory diseases. We tested various strains of lactobacilli for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis, and selected three unique bacteria that reduced inflammation in central nervous system (CNS) and autoreactive T cell responses. Prophylactic treatment with each strain induced CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) in mesenteric lymph nodes (MLNs) and enhanced production of anti-inflammatory cytokines in the serum. Importantly, we evaluated the therapeutic efficacy of each strain and showed that only a combination of all three lactobacilli suppressed the progression and reversed the clinical and histological EAE. The suppressive activity correlated with attenuation of pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokines followed by IL-10 induction in MLNs, spleen and blood. Our data provide sufficient evidence showing that the therapeutic effect was associated with induction of tolerogenic Tregs in MLNs but also in the periphery and the CNS, mediated through an IL-10-dependent mechanism. Our findings indicate a therapeutic potential of a novel combination of probiotics and provide a more complete understanding for the host-commensal interactions that contribute to beneficial effects in autoimmune diseases.

**USE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) TO
MONITOR PROBIOTIC LACTOBACILLI IN THE IN-
TESTINAL TRACT OF MICE, INCLUDING INTERAC-
TION WITH GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE**

Mehrnaz Nouri Ph. D. student

Lund University, Malmö, Sweden.

Abstract:

Probiotic bacteria are health beneficial microorganisms that can colonize the gut and induce immunomodulatory effects on immune system. The interactions with gut associated cell populations can highly influence the outcome of the immune responses. The aim of our study was to introduce GFP-gene to bacteria and study their interaction with intestinal dendritic cells and macrophages. Three different strains of Lactobacilli were transformed with GFP expression vector pRV85. The GFP expressed clones were characterized by flow cytometry and fluorescence microscopy. C57BL/6 mice were orally treated with GFP-bacteria. Peyer's patches were isolated and analyzed for presence of GFP-bacteria. The results showed stable expression of GFP in transformed bacteria. Confocal microscopic analysis confirms translocation of the bacteria in gut associated lymphoid tissues. In conclusion, GFP-labelled probiotics can be used to characterize bacterial translocation and elucidate the interaction between the bacteria and GALT organs in order to reveal the mechanism behind the immunomodulatory action of probiotics.

DNA METHYLATION AND HORMONE NUCLEAR RECEPTORS IN HUMAN CELLS

Tove Sandberg Ph.D., University Lecturer
Lund University, Malmö, Sweden.

This talk will describe techniques for quantitative determination of DNA methylation in the CpG sites of the whole genome, and in specific gene promoters.

Results from experiments on epigenetic effects by ATRA (all-trans retinoic acid) treatment of human leukemia cell lines will be shown. The similarities between estrogen and retinoic nuclear receptors, and their influence on gene expression will be discussed.

IDENTIFICATION AND DEVELOPMENT OF BIOMARKERS FOR TARGETED AND EFFECTIVE DELIVERY OF THERAPIES AND FOR PREDICTING DRUG RISK FOR TREATMENT OF METASTATIC CANCER

Jenny L Persson, PhD, Associate Professor

Head of Division of Experimental Cancer Research
Clinical Research Center, Lund University, U-MAS, 205
02, Malmö, Sweden.

Most of the advanced cancer cases will develop into the highly aggressive and invasive stages, and as the disease progresses, will reach a clinical stage associated with metastases. Once cancer became metastasis, no curable treatment exists. Variability in response to therapy, both with regards to efficacy and to adverse events, is leading the pharmaceutical industry down the path of personalized medicine.

The aim of our study is to develop and validate biomarkers for targeted and effective delivery of therapies and for predicting drug risk for treatment of metastatic cancer.

We have been applying comprehensive biological systems such as genomics and proteomics, and we have utilized the information from bio-banks and bio-information on proteomic array data, CGH array data and other genom-wide screening data based on patient materials. We have identified series of biomarkers that are preferentially associated to aggressive and metastatic prostate cancer. These protein markers have been tested for their roles as multi-parameter markers for stratification of patients with aggressive stage of prostate cancer into subgroups for their response to treatment. As the next step, we have established *in vitro* cell-based and *in vivo* mouse models that recapitulate tumor progression and metastatic stage of human prostate cancer. We are also in the process to design and create synthetic probes by computer modelling and chemical synthesis. Each biomarker will be conjugated with a unique radio tracer for

imaging analysis. The radio tracer can be used to assess biomarkers expression in vivo and possible changes of biomarkers in response to therapeutic agents can be monitored by imaging. By using these models, multiple biomarkers such as tumor size, tumor invasion and metastasis can be measured in real time by molecular imaging assessment. We are applying the bio-markers, small animal models and molecular imaging to test the treatment effect and drug risks for the metastatic cancer, in particular prostate cancer.

Related publication:

1. Wegiel, B., Bjartell, A., Tumolea, J., Dizeyi, N., Tinzl, M., Helczynski, L., Nilsson, E., Otterbein, L. E., Harkonen, P., Persson, J. L. (2008). Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis. *Journal of National Cancer Institute*. 100:1022-1036.

2. Wegiel, B., Ekberg, J., Talasila, K. M., Jalili, S., Persson J. L. (2009). The role of VEGF and a functional link between VEGF and p27^{Kip1} in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 23:251-261.