

# GEORGIAN MEDICAL NEWS

---

ISSN 1512-0112

№ 9 (162) Сентябрь 2008

---

ТБИЛИСИ - NEW YORK



ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Медицинские новости Грузии  
საქართველოს სამედიცინო სიახლენი

# GEORGIAN MEDICAL NEWS

**No 9 (162) 2008**

*The issue is dedicated to the 90th anniversary  
of Iv. Javakhishvili Tbilisi State University*

*The editor of the issue:  
Head of the department of Genetics, Iv. Javakhishvili Tbilisi State University  
professor Teimuraz Lezhava*

*Номер посвящается 90-летию со дня основания  
Тбилисского государственного университета им. Ив. Джавахишвили*

*Редактор номера:  
Заведующий кафедрой генетики Тбилисского государственного университета  
им. Ив. Джавахишвили – профессор Теймураз Александрович Лежава*

**ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ  
ТБИЛИСИ - НЬЮ-ЙОРК**

“**Georgian Medical News**” is a Georgian-Russian-English-German monthly journal and carries original scientific articles on medicine and biology, which are of experimental, theoretical and practical character.

“**Georgian Medical News**” is a joint publication of GMN Editorial Board and The International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (U.S.A.).

“**Georgian Medical News**” is included in the international system of medical information “MEDLINE” which represents the central electronic database of the world medical scientific literature. The journal is stored in the funds of US national library. It is listed in the catalogue of The Central Scientific-Medical Public Library of Russian Federation and world-wide catalogues: “*Ulrich’s International Periodicals Directory*” and “*Medical and Health Care Serials in Print*”. Articles from the bulletin are under review of *scientific and technological informative journal of the Russian Academy of Sciences*.

“**Georgian Medical News**” - ежемесячный научно-медицинский рецензируемый журнал, в котором на русском, английском и немецком языках публикуются оригинальные научные статьи экспериментального, теоретического и практического характера в области медицины и биологии, статьи обзорного характера, рецензии; периодически печатается информация о проведенных научных мероприятиях, новшествах медицины и здравоохранения.

“**Georgian Medical News**” является совместным изданием с Международной Академией Наук, Образования, Искусств и Естествознания (IASEIA) США.

“**Georgian Medical News**” включен в международную систему медицин-ской информации “MEDLINE”, которая является центральной электронной базой данных мировой медицинской научной литературы. Журнал хранится в фондах библиотеки конгресса США; входит в каталог Государственной Центральной научно-медицинской библиотеки Российской Федерации и Всемирные каталоги *Ulrich’s International Periodicals Directory* и *Medical and Health Care Serials in Print*. Статьи из журнала реферируются в реферативном журнале *Всероссийского института научной и технической информации Российской академии наук (ВИНИТИ РАН)* и хранятся в его базе данных по медицине.

“**Georgian Medical News**” - არის ყოველთვიური სამეცნიერო სამედიცინო რეცენზირებადი ჟურნალი, რომელშიც რუსულ, ინგლისურ და გერმანულ ენებზე ქვეყნდება ექსპერიმენტული, თეორიული და პრაქტიკული ხასიათის ორიგინალური სამეცნიერო სტატიები მედიცინისა და ბიოლოგიის სფეროში, მიმოხილვითი ხასიათის სტატიები, რეცენზიები.

“**Georgian Medical News**” წარმოადგენს ერთობლივ გამოცემას აშშ-ის მეცნიერების, განათლების, ინდუსტრიის, ხელოვნებისა და ბუნებისმეტყველების საერთაშორისო აკადემიასთან (IASEIA) ერთად.

“**Georgian Medical News**” შეყვანილია სამედიცინო ინფორმაციის საერთაშორისო სისტემა “MEDLINE”-ში, რომელიც წარმოადგენს მსოფლიოს სამედიცინო სამეცნიერო ლიტერატურის ცენტრალურ ელექტრონულ მონაცემთა ბაზას. ინახება აშშ-ის კონგრესის ბიბლიოთეკის ფონდებში; შესულია რუსეთის ფედერაციის სახელმწიფო ცენტრალური სამეცნიერო ბიბლიოთეკის კატალოგსა და საერთაშორისო კატალოგებში “*Ulrich’s International Periodicals Directory*” და “*Medical and Health Care Serials in Print*”. ჟურნალში გამოქვეყნებული სტატიები რეფერირდება *რუსეთის მეცნიერებათა აკადემიის სამეცნიერო და ტექნიკური ინფორმაციის ინსტიტუტის* რეფერატულ ჟურნალში და ინახება მედიცინის მონაცემთა ბაზაში.

## МЕДИЦИНСКИЕ НОВОСТИ ГРУЗИИ

Ежемесячный совместный грузино-американский научный электронно-печатный журнал Агентства  
медицинской информации Ассоциации деловой прессы Грузии,  
Академии медицинских наук Грузии, Международной Академии Наук, Индустрии,  
Образования и Искусств США.  
Издается с 1994 г. Распространяется в СНГ, ЕС и США

### НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

Лаури Манагадзе

### ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Нино Микаберидзе

### НАУЧНО-РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Игумен Адам - Вахтанг Ахаладзе, Нелли Антелава, Тенгиз Ахметели,  
Лео Бокерия, Николай Гонгадзе, Палико Кинтраиа, Зураб Кеванишвили,  
Теймураз Лежава, Джианлуиджи Мелотти, Караман Пагава,  
Николай Пирцхалаишвили, Вальтер Стакл, Фридон Тодуа, Кеннет Уолкер,  
Рамаз Хецуриани, Рудольф Хохенфеллнер, Рамаз Шенгелия

### НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Михаил Бахмутский (США), Александр Геннинг (Германия),  
Амиран Гамкрелидзе (Грузия), Константин Кипиани (Грузия),  
Георгий Кавтарадзе (Грузия), Георгий Камкамидзе (Грузия),  
Паата Куртанидзе (Грузия), Вахтанг Масхулия (Грузия),  
Тенгиз Ризнис (США), Дэвид Элуа (США)

Website:

[www.geomednews.org](http://www.geomednews.org)

[www.viniti.ru](http://www.viniti.ru)

The International Academy of Sciences, Education, Industry & Arts. P.O.Box 390177,  
Mountain View, CA, 94039-0177, USA. Tel/Fax: (650) 967-4733

**Версия:** печатная. **Цена:** свободная.

**Условия подписки:** подписка принимается на 6 и 12 месяцев.

**По вопросам подписки обращаться по тел.: 93 66 78.**

**Контактный адрес:** Грузия, 380077, Тбилиси, ул.Асатиани 7, IV этаж,  
тел.: 995(32) 39 37 76, 995(32) 22 54 18, 39 47 82,

Fax: +995(32) 22 54 18, e-mail: [ninomikaber@hotmail.com](mailto:ninomikaber@hotmail.com); [nikopir@aol.com](mailto:nikopir@aol.com); [gmn@caucasus.net](mailto:gmn@caucasus.net)

**По вопросам размещения рекламы обращаться по тел.: 8(99) 97 95 93**

© 2001. Ассоциация деловой прессы Грузии

© 2001. The International Academy of Sciences,  
Education, Industry & Arts (USA)

# **GEORGIAN MEDICAL NEWS**

Monthly Georgia-US joint scientific journal published both in electronic and paper formats of the Agency of Medical Information of the Georgian Association of Business Press; Georgian Academy of Medical Sciences; International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (USA).  
Published since 1994. Distributed in NIS, EU and USA.

## **SCIENTIFIC EDITOR**

Lauri Managadze

## **EDITOR IN CHIEF**

Nino Mikaberidze

## **SCIENTIFIC EDITORIAL COUNCIL**

Hegumen Adam - Vakhtang Akhaladze, Nelly Antelava, Tengiz Akhmeteli, Leo Bokeria, Nicholas Gongadze, Rudolf Hohenfellner, Ramaz Khetsuriani, Zurab Kevanishvili, Paliko Kintraia, Teymuraz Lezhava, Gianluigi Melotti, Kharaman Pagava, Nicholas Pirtskhalaishvili, Ramaz Shengelia, Walter Stackl, Pridon Todua, Kenneth Walker

## **SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD**

Michael Bakhmutsky (USA), Alexander Gënning (Germany), Amiran Gamkrelidze (Georgia), Konstantin Kipiani (Georgia), Giorgi Kavtaradze (Georgia), Giorgi Kamkamidze (Georgia), Paata Kurtanidze (Georgia), Vakhtang Maskhulia (Georgia), Tengiz Riznis (USA), David Elua (USA)

## **CONTACT ADDRESS IN TBILISI**

GMN Editorial Board  
7 Asatiani Street, 4<sup>th</sup> Floor  
Tbilisi, Georgia 380077

Phone: 995 (32) 39-37-76  
995 (32) 22-54-18  
995 (32) 39-47-82  
Fax: 995 (32) 22-54-18

## **CONTACT ADDRESS IN NEW YORK**

D. & N. COM., INC.  
111 Great Neck Road  
Suite # 208, Great Neck,  
NY 11021, USA

Phone: (516) 487-9898  
Fax: (516) 487-9889

## **WEBSITE**

[www.geomednews.org](http://www.geomednews.org)  
[www.viniti.ru](http://www.viniti.ru)

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ!

При направлении статьи в редакцию необходимо соблюдать следующие правила:

1. Статья должна быть представлена в двух экземплярах, на русском или английском языках, напечатанная через полтора интервала на одной стороне стандартного листа с шириной левого поля в три сантиметра. Используемый компьютерный шрифт - **Times New Roman (Кириллица)**, размер шрифта - **12**. К рукописи, напечатанной на компьютере, должна быть приложена дискета со статьёй. Файл следует озаглавить латинскими символами.

2. Размер статьи должен быть не менее пяти и не более десяти страниц машинописи, включая указатель и резюме.

3. В статье должны быть освещены актуальность данного материала, методы и результаты исследования и аспекты их обсуждения.

При представлении в печать научных экспериментальных работ авторы должны указывать вид и количество экспериментальных животных, применявшиеся методы обезболивания и усыпления (в ходе острых опытов).

4. Таблицы необходимо представлять в печатной форме. Фотокопии не принимаются. **Все цифровые, итоговые и процентные данные в таблицах должны соответствовать таковым в тексте статьи.** Таблицы и графики должны быть озаглавлены.

5. Фотографии должны быть контрастными и обязательно представлены в двух экземплярах. Рисунки, чертежи и диаграммы следует представлять четко выполненные тушью; фотокопии с рентгенограмм - в позитивном изображении.

На обороте каждого рисунка карандашом указывается его номер, фамилия автора, сокращённое название статьи и обозначаются верхняя и нижняя его части.

Подписи к рисункам составляются обязательно на отдельном листе с указанием номеров рисунков. В подписях к микрофотографиям следует указывать степень увеличения через окуляр или объектив и метод окраски или импрегнации срезов.

6. Фамилии отечественных авторов приводятся в статье обязательно вместе с инициалами, иностранных - в иностранной транскрипции; в скобках должен быть указан соответствующий номер автора по списку литературы.

7. В конце каждой оригинальной статьи должен быть приложен библиографический указатель основных по данному вопросу работ, использованных автором. Следует указать порядковый номер, фамилию и инициалы автора, полное название статьи, журнала или книги, место и год издания, том и номер страницы.

В алфавитном порядке указываются сначала отечественные, а затем иностранные авторы. Указатель иностранной литературы должен быть представлен в печатном виде или написан от руки четко и разборчиво тушью.

8. Для получения права на публикацию статья должна иметь от руководителя работы или учреждения визу и сопроводительное отношение, написанные или напечатанные на бланке и заверенные подписью и печатью.

9. В конце статьи должны быть подписи всех авторов, полностью приведены их фамилии, имена и отчества, указаны служебный и домашний номера телефонов и адреса или иные координаты. Количество авторов (соавторов) не должно превышать пяти человек.

10. К статье должны быть приложены краткое (на полстраницы) резюме на английском и русском языках (включающее следующие разделы: вступление, материал и методы, результаты и заключение) и список ключевых слов (key words).

11. Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять статьи. Корректур авторам не высылаются, вся работа и сверка проводится по авторскому оригиналу.

12. Недопустимо направление в редакцию работ, представленных к печати в иных издательствах или опубликованных в других изданиях.

**При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются.**

## REQUIREMENTS

Please note, materials submitted to the Editorial Office Staff are supposed to meet the following requirements:

1. Articles must be provided with a double copy, in English or Russian languages and typed or computer-printed on a single side of standard typing paper, with the left margin of **3** centimeters width, and **1.5** spacing between the lines, typeface - **Times New Roman (Cyrillic)**, print size - **12** (referring to Georgian and Russian materials).

With computer-printed texts please enclose a diskette carrying the same file titled with Latin symbols.

2. Size of the article, including index and resume, must be at least 5 pages and not exceed the limit of 10 pages of typed or computer-printed text.

3. Submitted material must include a coverage of a topical subject, research methods, results, and review.

Authors of the scientific-research works must indicate the number of experimental biological species drawn in, list the employed methods of anesthetization and soporific means used during acute tests.

4. Tables must be presented in an original typed or computer-printed form, instead of a photocopied version. Numbers, totals, percentile data on the tables must coincide with those in the texts of the articles. Tables and graphs must be headed.

5. Photographs are required to be contrasted and must be submitted with doubles. Please number each photograph with a pencil on its back, indicate author's name, title of the article (short version), and mark out its top and bottom parts. Drawings must be accurate, drafts and diagrams drawn in Indian ink (or black ink). Photocopies of the X-ray photographs must be presented in a positive image.

Accurately numbered subtitles for each illustration must be listed on a separate sheet of paper.

In the subtitles for the microphotographs please indicate the ocular and objective lens magnification power, method of coloring or impregnation of the microscopic sections (preparations).

6. Please indicate last names, first and middle initials of the native authors, present names and initials of the foreign authors in the transcription of the original language, enclose in parenthesis corresponding number under which the author is listed in the reference materials.

7. Each original article must have in its closing a list of source materials used by the author, which must include only the basic works on the given issue, numbered in succession, with indication of the last names and first and middle initials of the authors, names of periodicals, titles of the articles or books, place and year of edition, volume and page numbers.

List first the native authors, and then the foreign ones alphabetically. The index of foreign literature must be typed, computer-printed or legibly hand-written in Indian or black ink.

8. To obtain the rights of publication articles must be accompanied by a visa from the project instructor or the establishment, where the work has been performed, and a reference letter, both written or typed on a special signed form, certified by a stamp or a seal.

9. Articles must be signed by all of the authors at the end, and they must be provided with a list of full names, office and home phone numbers and addresses or other non-office locations where the authors could be reached. The number of the authors (co-authors) must not exceed the limit of 5 people.

10. Articles must have a short (half page) abstract in English and Russian (including the following sections: introduction, material and methods, results and conclusions) and a list of key words.

11. Editorial Staff reserves the rights to cut down in size and correct the articles. Proof-sheets are not sent out to the authors. The entire editorial and collation work is performed according to the author's original text.

12. Sending in the works that have already been assigned to the press by other Editorial Staffs or have been printed by other publishers is not permissible.

რედაქციაში სტატიის წარმოდგენისას საჭიროა დავიცვათ შემდეგი წესები:

1. სტატია უნდა წარმოადგინოთ 2 ცალად, რუსულ ან ინგლისურ ენებზე, დაბეჭდილი სტანდარტული ფურცლის 1 გვერდზე, კსმ სივანის მარცხენა ველისა და სტრიქონებს შორის 1,5 ინტერვალის დაცვით. გამოყენებული კომპიუტერული შრიფტი Times New Roman (Кириллица); შრიფტის ზომა – 12. სტატიას თან უნდა ახლდეს დისკეტი სტატიით. ფაილი დაასათაურეთ ლათინური სიმბოლოთი.

2. სტატიის მოცულობა არ უნდა შეადგენდეს 5 გვერდზე ნაკლებსა და 10 გვერდზე მეტს ლიტერატურის სიის და რეზიუმეს ჩათვლით.

3. სტატიაში საჭიროა გაშუქდეს: საკითხის აქტუალობა; კვლევის მიზანი; საკვლევი მასალა და გამოყენებული მეთოდები; მიღებული შედეგები და მათი განსჯა. ექსპერიმენტული ხასიათის სტატიების წარმოდგენისას ავტორებმა უნდა მიუთითონ საქსპერიმენტო ცხოველების სახეობა და რაოდენობა; გაუტკივარებისა და დაძინების მეთოდები (მწვავე ცდების პირობებში).

4. ცხრილები საჭიროა წარმოადგინოთ ნაბეჭდი სახით. ყველა ციფრული, შემაჯამებელი და პროცენტული მონაცემები უნდა შეესაბამებოდეს ტექსტში მოყვანილს. ცხრილები, გრაფიკები – დაასათაურეთ.

5. ფოტოსურათები უნდა იყოს კონტრასტული; სურათები, ნახაზები, დიაგრამები - დასათაურებული და ტუშით შესრულებული. რენტგენოგრაფიების ფოტოასლები წარმოადგინეთ პოზიტიური გამოსახულებით. თითოეული სურათის უკანა მხარეს ფანქრით აღნიშნეთ მისი ნომერი, ავტორის გვარი, სტატიის სათაური (შემოკლებით), სურათის ზედა და ქვედა ნაწილები. სურათების წარწერები წარმოადგინეთ ცალკე ფურცელზე მათი N-ის მითითებით. მიკროფოტოსურათების წარწერებში საჭიროა მიუთითოთ ოკულარის ან ობიექტივის საშუალებით გადიდების ხარისხი, ანათალების შედეგების ან იმპრეგნაციის მეთოდი.

6. სამამულო ავტორების გვარები სტატიაში აღინიშნება ინიციალების თანდართვით, უცხოურისა – უცხოური ტრანსკრიპციით; კვადრატულ ფხხილებში უნდა მიუთითოთ ავტორის შესაბამისი N ლიტერატურის სიის მიხედვით.

7. სტატიას თან უნდა ახლდეს ავტორის მიერ გამოყენებული სამამულო და უცხოური შრომების ბიბლიოგრაფიული სია (ბოლო 5-8 წლის სიღრმით). ანბანური წყობით წარმოდგენილ ბიბლიოგრაფიულ სიაში მიუთითეთ ჯერ სამამულო, შემდეგ უცხოელი ავტორები (გვარი, ინიციალები, სტატიის სათაური, ჟურნალის დასახელება, გამოცემის ადგილი, წელი, ჟურნალის №, პირველი და ბოლო გვერდები). მონოგრაფიის შემთხვევაში მიუთითეთ გამოცემის წელი, ადგილი და გვერდების საერთო რაოდენობა.

8. სტატიას თან უნდა ახლდეს: ა) დაწესებულების ან სამეცნიერო ხელმძღვანელის წარდგინება, დამოწმებული ხელმოწერითა და ბეჭდით; ბ) დარგის სპეციალისტის დამოწმებული რეცენზია, რომელშიც მითითებული იქნება საკითხის აქტუალობა, მასალის საკმაობა, მეთოდის სანდოობა, შედეგების სამეცნიერო-პრაქტიკული მნიშვნელობა.

9. სტატიის ბოლოს საჭიროა ყველა ავტორის ხელმოწერა, რომელთა რაოდენობა არ უნდა აღემატებოდეს 5-ს.

10. სტატიას თან უნდა ახლდეს რეზიუმე ინგლისურ და რუსულ ენებზე არანაკლებ ნახევარი გვერდის მოცულობისა (სათაურის, ავტორების, დაწესებულების მითითებით და უნდა შეიცავდეს შემდეგ განყოფილებებს: შესავალი, მასალა და მეთოდები, შედეგები და დასკვნები; ტექსტუალური ნაწილი არ უნდა იყოს 15 სტრიქონზე ნაკლები) და საკვანძო სიტყვების ჩამონათვალი (key words).

11. რედაქცია იტოვებს უფლებას შეასწოროს სტატია. ტექსტზე მუშაობა და შეჯერება ხდება საავტორო ორიგინალის მიხედვით.

12. დაუშვებელია რედაქციაში ისეთი სტატიის წარდგენა, რომელიც დასაბეჭდად წარდგენილი იყო სხვა რედაქციაში ან გამოქვეყნებული იყო სხვა გამოცემებში.

აღნიშნული წესების დარღვევის შემთხვევაში სტატიები არ განიხილება.



Содержание:

<b>Джохадзе Т.А., Кахидзе Х.Р., Рогава М.А., Лежава Т.А.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ С-СТРУКТУРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА В КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ КАРДИОМИОПАТИЕЙ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ.....	7
<b>Джохадзе Т.А., Гаиозишвили М.Н., Лежава Т.А.</b> ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ФРАГИЛЬНЫХ САЙТОВ ХРОМОСОМ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ И У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГРУДИ.....	11
<b>Monaselidze J., Barbakadze Sh., Gorgoshidze M., Lezhava T., Jokhadze T.</b> THE MICROCALORIMETRIC INVESTIGATION OF CELLULAR SUSPENSIONS OF BLOOD LYMPHOCYTES FROM HEALTHILY AND SUFFERING FROM ATHEROSCLEROSIS INDIVIDUALS .....	15
<b>Monaselidze J., Barbakadze Sh., Kiladze M., Kuchadze Z., Lezhava T.</b> THERMODYNAMIC PROPERTIES OF BLOOD PLASMA OF PATIENT SUFFERING FROM ATHEROSCLEROSIS.....	19
<b>Shakarishvili R., Beridze M.</b> PROINFLAMMATORY REACTANTS AS DETERMINANTS OF STROKE SEVERITY IN ELDERLY.....	23
<b>Baratashvili N., Chitanava G., Menabde M.</b> GENETIC CHANGES INDUCED BY THE PESTICIDE RIDOMOL IN THE SOYBEANS SPROUTED FROM THE SEEDS OF DIFFERENT AGES.....	27
<b>Mikeladze D., Zhuravliova E., Barbakadze T.</b> RAS PROTEINS, NITROSYLATION AND HOMOCYSTEINE METABOLISM.....	30
<b>Шатиришвили А.Ф., Мачавариани Н.А., Менабде М.В.</b> ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА ШТАММЫ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ (SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR VINI) РАЗНОГО ВОЗРАСТА .....	34
<b>Воробьева Е.О., Ахвледиани М.В., Эмухвари М.Г., Шарашидзе Н.А., Гзиришвили Л.М.</b> ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО.....	40
<b>Шахбазов Ш.К., Рустамов Р.Ш.</b> СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БЕРЕМЕННЫХ, НОСИТЕЛЕЙ НАСЛЕДСТВЕННЫХ АНОМАЛИЙ-МУТАЦИЙ Ф-V-ЛЕЙДЕН И ТРОМБОТИЧЕСКИХ G20210A .....	46
<b>Gogorishvili I., Archvadze, A. Kipiani V., Kipshidze N.</b> TREATMENT OF PATIENTS WITH CARDIOGENIC SHOCK IN THE SETTING OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION ( <i>Case Reports</i> ).....	51

**Цуцкиридзе Л.Р., Курашвили Р.Б., Цибадзе А.Д., Курашвили Г.Р., Шелестова Е.Л.**  
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ БЛОКАТОРОВ РЕЦЕПТОРОВ АНГИОТЕНЗИНА  
НА ТЕЧЕНИЕ МИКРОСОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА ..... 54

**Dididze M.**  
RESTORING MOVEMENT TO PARALYZED LIMBS BY TREATING  
NERVE ROOT AVULSION: A SEVEN YEAR RETROSPECTIVE ..... 58

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ С-СТРУКТУРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА В КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ КАРДИОМИОПАТИЕЙ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ

Джохадзе<sup>1</sup> Т.А., Кахидзе<sup>2</sup> Х.Р., Рogaва<sup>2</sup> М.А., Лежава<sup>1</sup> Т.А.

<sup>1</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили,

<sup>2</sup>Национальный центр терапии Грузии

К группе болезней, известных под названием кардиомиопатий, относятся формы, в развитии которых роль генетических факторов достоверно подтверждена [8,11]. Следует отметить, что заболевания с установленной генетической предрасположенностью, как правило, характеризуются изменчивостью морфо-функциональных параметров хромосомного аппарата [1]. Ранее нами была показана изменчивость ряда хромосомных показателей в клетках больных гипертрофической и дилатационной кардиомиопатией и их родственников [1,2]. В частности, определилась повышенная частота структурных мутаций хромосом, изменчивость спонтанной соматической рекомбинации (межсестринских хроматидных обменов) и уровня активности ядрышковых организаторов, а также более высокая чувствительность к повреждающему воздействию, по сравнению с клетками здоровых лиц.

Одним из основных морфо-функциональных параметров хромосомного аппарата является показатель конституционного – прицентромерного гетерохроматина, представляющего собой tandemно расположенные нуклеотидные последовательности блоков альфа-сателлитных ДНК, выявляемые с помощью окраски С-методом и носящие название С-сегментов. Известно, что размеры С-сегментов гетерохроматина стабильны, наследственны и сегрегируют в потомстве в соответствии с законами Менделя [3]. Вместе с тем, существуют данные об изменчивости вариантов С-сегментов при ряде заболеваний, которые характеризуются нестабильностью генетического аппарата [3,13]. Ввиду того, что как при гипертрофической форме кардиомиопатии, так и при дилатационной доля семейных случаев довольно высока, изучение вариабельности блоков С-структурного гетерохроматина в клетках больных вышеуказанными двумя формами кардиомиопатий и их родственников, представляется особенно интересным.

Целью исследования явилось определение вариабельности С-структурного гетерохроматина в клетках больных гипертрофической и дилатационной формами кардиомиопатии и их родственников.

**Материал и методы.** Материалом для исследования служили клетки ФГА-стимулированных краткосрочных лимфоцитарных культур больных гипертрофической и дилатационной кардиомиопатией, а также их родственников первой степени родства (родители, дети, братья и сестры) – всего 32 индивида (от каждого индивида анализировалось на С-структурный гетерохроматин не менее 25-и клеток). Контролем служили клетки лимфоцитарных культур клинически здоровых лиц среднего возраста. Культивирование и фиксация лимфоцитов проводились по стандартной методике. Выявление блоков С-структурного гетерохроматина осуществлялось по методу Sumner [14]. Хромосомные препараты подвергались 1-часовому гидролизу в 0,2 нормальной соляной кислоте, обработке гидроокисью бария при температуре 52°C, инкубации в растворе 2xSSC. После отмывания и высушивания проводили окраску 2% азур-эозином. Для сравнительного анализа С-сегментов применялась классификация Петила и Лабса [12], распределяющая сегменты по 5-и вариантам:  $a < 0,5 \times 16\mu$ ;  $b > 0,5 - 1 \times 16\mu$ ;  $c > 1,5 \times 16\mu$ ;  $d > 1,5 - 2 \times 16\mu$ ;  $e > 2 \times 16\mu$ .

**Результаты и их обсуждение.** Выявляемый С-методом структурный гетерохроматин преимущественно локализован в районах вторичных перетяжек хромосом 1, 9, и 16. Блоки С-гетерохроматина этих хромосом наиболее крупные, стабильные и удобные для изучения. Согласно литературным данным [4,7], изменчивость размеров С-сегментов данных хромосом играет значимую роль в экспрессии блокированных мутантных генов, индуцирующих нарушения

развития и злокачественный рост. На первом этапе был проведен суммарный анализ частоты вариантов С-блоков по всем трем изученным парам хромосом.

Результаты анализа показали, что в лимфоцитах клинически здоровых лиц с наибольшей частотой проявляются *b*-варианты С-блоков, *a*- и *c*-варианты представлены практически с одинаковой частотой; с очень низкой частотой встречаются крупные *d*-варианты и не зарегистрировано ни одного самого крупного - *e*-варианта. Полученные нами данные для контрольной группы согласуются с данными литературы [3,6].

Примерно такое же распределение частот вариантов наблюдалось при обеих формах кардиомиопатий, хотя и имелось некоторое различие. В клетках больных дилатационной кардиомиопатией проявилась тенденция повышения частоты встречаемости средних *c*-вариантов структурного гетерохроматина при одновременном понижении доли самых мелких *a*-вариантов. Четкая тенденция возрастания частоты выявляемости крупных *d*-вариантов (достоверная в одном случае), на фоне уменьшения частоты мелких *b*-вариантов, прослеживалась среди родственников больных обеими формами кардиомиопатии, т.е. в последних трех случаях (при дилатационной форме и в клетках родственников) суммарное количество С-структурного гетерохроматина несколько возросло.

В литературе имеются данные об изменчивости суммарного С-структурного гетерохроматина при ряде патологий. В частности, показана положительная корреляция между уменьшением общего С-гетерохроматина 1-ой, 9-ой и 16-ой хромосом у больных с эмбриопатией неизвестной этиологии и с трисомией по 21-ой хромосоме [5]. Авторы объясняют полученные результаты тем, что уменьшение общего количества структурного С-гетерохроматина способствует проявлению действия мутантных генов, обуславливающих нарушение развития. Увеличение общего количества С-гетерохроматина отмечается при аутоиммунных заболеваниях – красной волчанке, ревматоидном артрите и синдроме гипермобильных суставов [9]. Интересно, что все перечисленные патологии характеризуются очень высокой хромосомной нестабильностью, и, как полагают авторы, зафиксиро-

ванная для них возросшая гетерохроматинизация прилегающих к центромерам участков, возможно, препятствует эффективной работе репарационной системы [10].

При раскладке полученных результатов по хромосомам оказалось, что в норме, в клетках здоровых лиц, наибольшее число вариантов С-блоков встречается в 1-й хромосоме (*a*-, *b*-, *c*-, *d*-варианты), причем, с наибольшей, почти равной частотой встречаются *b*- и *c*-варианты. По 9-ой хромосоме, наибольшая частота отмечалась для мелких *b*-вариантов С-блоков, крупные *d*- и *e*-варианты вовсе не регистрировались. На 16-ой хромосоме наблюдались только мелкие *a*- и *b*-варианты блоков. Полученная раскладка соответствует существующим в литературе данным [1,4].

Результаты анализа вариабельности С-блоков по хромосомам у больных гипертрофической и дилатационной кардиомиопатией и их родственников оказались несколько различными. В клетках больных гипертрофической кардиомиопатией, а также их родственников, раскладка результатов по хромосомам практически совпадала с показателями здоровых лиц. Исключение составили данные по 16-ой хромосоме, на которой проявилась низкая частота *c*-вариантов, не встречающаяся у здоровых лиц.

Что касается больных дилатационной кардиомиопатией и их родственников, разница в раскладке вариантов С-блоков по сравнению с нормой отмечалась для 9-ой и 16-ой хромосом. Средние *c*-варианты блоков на 9-ой хромосоме встречались достоверно чаще, чем у здоровых лиц, кроме того, на этой же хромосоме встречались и редкие случаи наличия крупных *d*-вариантов. Единичные *c*-варианты блоков регистрировались и на 16-ой хромосоме, также как и при гипертрофической кардиомиопатии. Следует отметить, что согласно литературным данным 16-ая хромосома отличается наибольшей стабильностью.

В литературе показано, что в редких случаях С-сегменты подвержены инверсиям, что является одним из показателей их полиморфизма и причиной образования анеуплоидии и развития ряда патологий [6]. Нами был проведен анализ перичентрических инверсий С-сегментов в клетках больных изучаемыми формами кардиомиопатий

и их родственников. Как показали результаты анализа, во всех случаях имела место повышенная суммарная частота инверсий. В частности, в случае гипертрофической кардиомиопатии она составила  $7,2 \pm 1,1\%$ ; при дилатационной кардиомиопатии –  $6,9 \pm 1,1\%$ ; у родственников больных гипертрофической кардиомиопатией –  $4,9 \pm 0,8\%$ ; у родственников больных дилатационной кардиомиопатией –  $7,5 \pm 1,2\%$  (рис.). Анализ данных частоты инверсий по хромосомам показал, что наиболее активной в этом отношении является хромосома 9, в которой регистрируется наибольшее число инверсий. О высоком полиморфизме 9-ой хромосомы свидетельствуют и данные

литературы [5,6]. С гораздо меньшей частотой регистрируются инверсии для 1-ой хромосомы, однако следует отметить, что в клетках родственников больных дилатационной кардиомиопатией частота перичентрических инверсий на 1-ой хромосоме достоверно выше, чем в остальных изученных вариантах и практически не отличается от показателя для 9-ой хромосомы. Что касается 16-й хромосомы, оказалось, что, несмотря на ее инертность в отношении формирования инверсий, в двух случаях – в клетках больных гипертрофической кардиомиопатией и родственников больных дилатационной кардиомиопатией, единичные инверсии регистрировались и на ней.

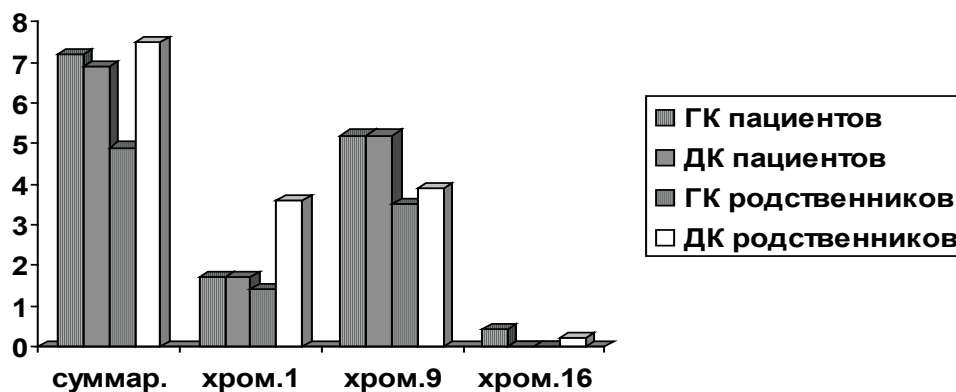


Рис. Частота инверсий прицентромерного гетерохроматина у больных двумя формами кардиомиопатии и их родственников

Таким образом, сопоставление полученных нами результатов внутри исследуемых групп, а также с данными литературы, позволяет заключить, что в клетках больных двумя формами кардиомиопатии и их родственников наблюдается вариабельность С-структурного гетерохроматина по отдельным хромосомам, что носит специфический характер.

**Благодарность.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта STCU – 4307.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Джохадзе Т., Лежава Т., Кахидзе Х., Рогава М. Хромосомная нестабильность у пациентов с двумя формами кардиомиопатии и их родственников. *Georg. Med. News* 2005; 12: 134-138.
2. Кахидзе Х., Джохадзе Т., Буадзе Т. Изучение индуцированного радиацией адапционного ответа в Т-лимфоцитах больных гипертрофической кардиомиопатией. *Аллергология и иммунология* 2006; 7 (5): 536-538.
3. Лежава Т.А. Функциональные особенности хро-

мосом человека и старение. *Успехи геронтологии* 2001; 8: 34-43.

4. Пендина А.А., Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Баранов В.С. Особенности метилирования прицентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16 у эмбрионов человека. *Цитология* 2001; 43 (8): 772-776.

5. Подугольникова О.А., Солонищенко В.Г. Цитогенетическое изучение функций вариабельных регионов С-гетерохроматина человека. *Эффект С-гетерохроматина в экспрессии генов. Цитология* 1994; 36 (11): 1035-1040.

6. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: «Наука»; 1986; 431.

7. Amiel A., Sardos-Albertini F., Fejgin M.D., Sharony R., Diukman R., Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *Hum. Genet.*, 2001; 46 (5): 245-50.

8. Chien K.R. Genotype, phenotype: upstrais, downstrais in the family of cardiomyopathies. *J. Clin. Invest.*, 2003; 11 (3): 175-178.

9. Dvalishvili N., Sigua N., Bablishvili N., Lominadze R. Polymorphism of C-heterochromatin in cultured lymphocytes from patients with systemic autoimmune disorders (Lupus erythematosus, Rheumatoid Arthritis and Sclerodermia) Proc. Georgian Acad. Sci., Ser. A., 2004; 2 (5-6): 49-52.
10. Lezhava T.A. Human chromosomes and aging from 80 to 114 years. Nova Biomedical. New-York: 2006.
11. Mogensen J., Perrot A., Andersen P et al., Clinical and genetic characteristics of a cardiac actin gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. J. Med. Genet. 2004; 3: 85-89.
12. Patil S., Lubs M. Classification of 9h regions in human chromosomes 1, 9, 16 by C-banding. Hum. Genet., 1977; 38 (1): 35-38.
13. Podugolnokova O.A., Blumina M.G. Heterochromatic regions on chromosomes 1, 9, 16 and Y in children with some disturbances occurring during embryo development. Hum Genet., 1983; 63 (2): 183-188.
14. Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res., 1972; 75: 304-306.

## SUMMARY

### VARIABILITY OF C-STRUCTURAL HETEROCHROMATIN IN CELLS DERIVED FROM THE PATIENTS WITH CARDIOMIOPATHY AND FROM THEIR RELATIVES

**Jokhadze<sup>1</sup> T., Kakhidze<sup>2</sup> Kh., Rogava<sup>2</sup> M., Lezhava<sup>1</sup> T.**

*<sup>1</sup>Department of Genetics Iv.Javakhishvili Tbilisi state university, <sup>2</sup>National center of Therapy, Tbilisi*

Variability of C-structural heterochromatin segments in chromosome 1, 9 and 16 has been studied in lymphocyte cultures of peripheral blood taken from the patients with the hypertrophy (HC) and dilatate (DC) forms of cardiomyopathy and their 1<sup>st</sup> degree relatives (32 individuals, in total). 10 healthy individuals composed the control group. C-segments were sorted according to Patil and Lubs:  $a < 0,5 \times 16\mu$ ;  $b > 0,5-1 \times 16\mu$ ;  $c > 1,5 \times 16\mu$ ;  $d > 1,5-2 \times 16\mu$ ;  $e > 2 \times 16\mu$ . The total amount of C-heterochromatin in all the studied chromosomes was tended to increase for DC patients and the relatives of the patients with the two forms of cardiomyopathy. Individual specificity within the group was found when the *c*-variants were assessed in chromosomes. In particular, the results obtained in cells of HC patients and their relatives did not differ from the control values, while the distribution pat-

tern of C-segments within the group of DC patients and their relatives underwent changing. The elevated induces of pericentromeric inversion were found in all the patients with both forms of the disease and their relatives indicating C-structural heterochromatin polymorphism in the tested individuals.

**Key words:** cardiomyopathy, C-structural heterochromatin, lymphocyte cultures of peripheral blood.

## РЕЗЮМЕ

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ С-СТРУКТУРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА В КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ КАРДИОМИОПАТИЕЙ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ

**Джохадзе<sup>1</sup> Т.А., Кахидзе<sup>2</sup> Х.Р., Рогавა<sup>2</sup> М.А., Лежава<sup>1</sup> Т.А.**

*<sup>1</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили, <sup>2</sup>Национальный центр Терапии Грузии*

Изучалась изменчивость размеров сегментов С-структурного гетерохроматина 1, 9 и 16 хромосом в культурах лимфоцитов периферической крови больных гипертрофической (ГК) и дилатационной (ДК) формами кардиомиопатии и их родственников (всего 32 индивида). Контрольную группу составили 10 клинически здоровых лиц. С-сегменты классифицировались по Петилу и Лабсу:  $a < 0,5 \times 16\mu$ ;  $b > 0,5-1 \times 16\mu$ ;  $c > 1,5 \times 16\mu$ ;  $d > 1,5-2 \times 16\mu$ ;  $e > 2 \times 16\mu$ . По суммарному количеству С-гетерохроматина всех изучаемых хромосом тенденция к его возрастанию проявилась в клетках больных ДК и родственников больных обеими формами кардиомиопатий. Специфичность внутри исследуемых групп проявилась при раскладке вариантов С-сегментов по хромосомам. В частности, в клетках больных ГК и их родственников, результаты практически не отличались от контрольных, в то время, как при ДК, а также в случае их родственников, картина раскладки сегментов изменилась. Выявлена высокая частота прицентромерных инверсий как у больных обеими формами кардиомиопатии, так и их родственников, что свидетельствует о наличии полиморфизма по С-структурному гетерохроматину в тестируемых группах индивидов.

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ФРАГИЛЬНЫХ САЙТОВ ХРОСОМ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ И У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГРУДИ

Джохадзе Т.А., Гаюзишвили М.Н., Лежава Т.А.

*Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили*

Для понимания закономерностей функционирования хромосомного аппарата большое значение имеет изучение изменчивости его показателей на разных этапах онтогенеза. Если на ранних этапах изменчивость состояния хроматина обеспечивает нормальное развитие, то на поздних этапах она связана с нарушениями гомеостаза, что, в свою очередь, вызывает постепенную потерю функций организма и развитие возрастных патологий. Показано, что клетки лиц старческого возраста характеризуются повышенной нестабильностью генома, проявляющейся в повышении уровня структурно-числовых нарушений хромосом [6]. Выявлено также, что хромосомы пожилых людей более подвержены повреждающему воздействию агентов различной природы [5]. Своеобразным проявлением хромосомной нестабильности являются фрагильные («ломкие») сайты хромосом. Фрагильные сайты известны уже давно, однако интерес к их изучению в последние годы значительно возрос, т.к. выявилась их связь с определенными онкогенами [3]. Согласно литературным данным, выявляемость фрагильных сайтов с возрастом меняется [4]. Однако данные об их индукции соединениями, обладающими биологической активностью, отсутствуют.

Целью данного исследования явилось изучение характера экспрессии фрагильных сайтов под влиянием ионов металлов – никеля, кобальта и цинка в двух возрастных группах (20-38 и 75-86 лет), возможность ее модификации геропротекторными биорегуляторами – ливагеном и эпиталоном, а также частоты их выявляемости в лимфоцитах больных раком молочной железы.

**Материал и методы.** Исследования проводились на лимфоцитарных культурах 20-38 (n=10) и 75-86-летних (n=10) клинически здоровых доноров и 8-и больных раком молочной железы. Лимфоциты периферической крови культивировали по стандартной методике в течение 72-х часов. В качестве питательной среды использовалась

среда RPMI-640 (Sigma), в качестве митогена – фитогемагглютинин (Sigma-P и ПанЭко). Для выявления фрагильных сайтов использовали растворы 5-бромдезоксигуанидина и метатрексата, которые добавлялись в культуры на 24 часа. Растворы хлористых солей изучаемых металлов никеля, кобальта и цинка добавляли в концентрации  $0.5 \times 10^{-4}$  М, пептидные биорегуляторы – ливаген и эпиталон, в концентрации, соответствующей их однократной терапевтической дозе. Хромосомные препараты окрашивались 5% азур-эозином.

Изучался также показатель фрагильных сайтов на клетку, распределение фрагильных сайтов по хромосомным группам и особенности их положения на хромосоме – прицентромерное, медиальное и терминальное. Полученные данные сравнивались с аналогичными показателями для клинически здоровых лиц соответствующих возрастов.

**Результаты и их обсуждение.** Как известно, фрагильные хромосомные сайты связаны с экстраординарным феноменом – экспансией одного из вида микросателлитов – тринуклеотидных повторов. С целью выявления фрагильных участков хромосом нами использованы два соединения – метатрексат, являющийся антагонистом фолиевой кислоты и аналог тимина – бромдезоксигуанидин. Анализ полученных результатов показал, что фрагильные сайты с гораздо большей частотой выявляются в клетках лиц среднего возраста, чем в старческой возрастной группе, причем указанное приемлемо как для культур, подвергшихся обработке тестируемыми металлами, так и без обработки. Выявленная нами закономерность согласуется с литературными данными [4]. Контрольный показатель средней возрастной группы составил  $0,42 \pm 0,04$  сайт/кл. С наибольшей частотой экспрессию фрагильных сайтов индуцировал хлорид цинка ( $3,9 \pm 0,2$  сайт/кл - для индивидов среднего возраста;  $0,50$  сайт/кл - для старшей возрастной группы). Наименьший эффект наблюдался при воздействии никелем ( $0,81 \pm 0,07$  сайт/кл и

0,35±0,03 сайт/кл, соответственно), хотя и в этом случае достоверно превышал соответствующие контрольные показатели.

Добавление пептидных регуляторов в среду вызвало снижение эффектов всех трех тестируемых солей металлов, однако следует отметить, что снижение имело достоверный характер только в клетках культур лиц средней возрастной группы, в старческой группе наблюдалась только тенденция снижения. Было изучено также распределение фрагильных сайтов по хромосомным группам. Оказалось, что в клетках интактных культур лиц среднего возраста фрагильные сайты с наибольшей частотой (40%) проявлялись на хромосомах группы С. При совместном воздействии солями испытуемых металлов и биорегуляторов частота проявления фрагильных сайтов на хромосомах группы С несколько понизилась. В клетках интактных культур лиц старческого возраста более высокая частота проявления фрагильных сайтов отмечалась на хромосомах групп А и В. Добавление солей металлов в клеточные культуры пожилых индивидов вызвало возрастание экспрессии фрагильных сайтов на хромосомах группы С.

Следует отметить, что из трех тестируемых нами металлов, специфический эффект наблюдался для

кобальта, при воздействии которым фрагильные сайты с высокой частотой проявлялись в прицентромерных районах хромосом (рис.). Как известно из литературы, кобальт вызывает деконденсацию центромерных районов и при воздействии кобальтом повышается также частота межсестринских обменов в прицентромерных участках хромосом [7]. С другой стороны известно, что обмены преимущественно проходят в эухроматиновых районах. Соответственно, выявленный нами эффект следует приписать специфическому действию кобальта именно на эти участки хромосом. Известно также, что существует связь между выявлением фрагильных сайтов и онкогенами [8]. Показано, что блоки прицентромерного гетерохроматина содержат гены, контролирующие пролиферацию в раннем эмбриогенезе [7], которые впоследствии переходят в дегетерохроматинизированное состояние, инактивируются. Как известно, такие гены являются потенциальными онкогенами. Соответственно, можно допустить предположение, что зафиксированный в литературе канцерогенный эффект кобальта, возможно, связан с его специфическим влиянием на прицентромерный гетерохроматин. При воздействии остальными двумя металлами – никелем и цинком, подобное специфическое действие на прицентромерный гетерохроматин не отмечалось.

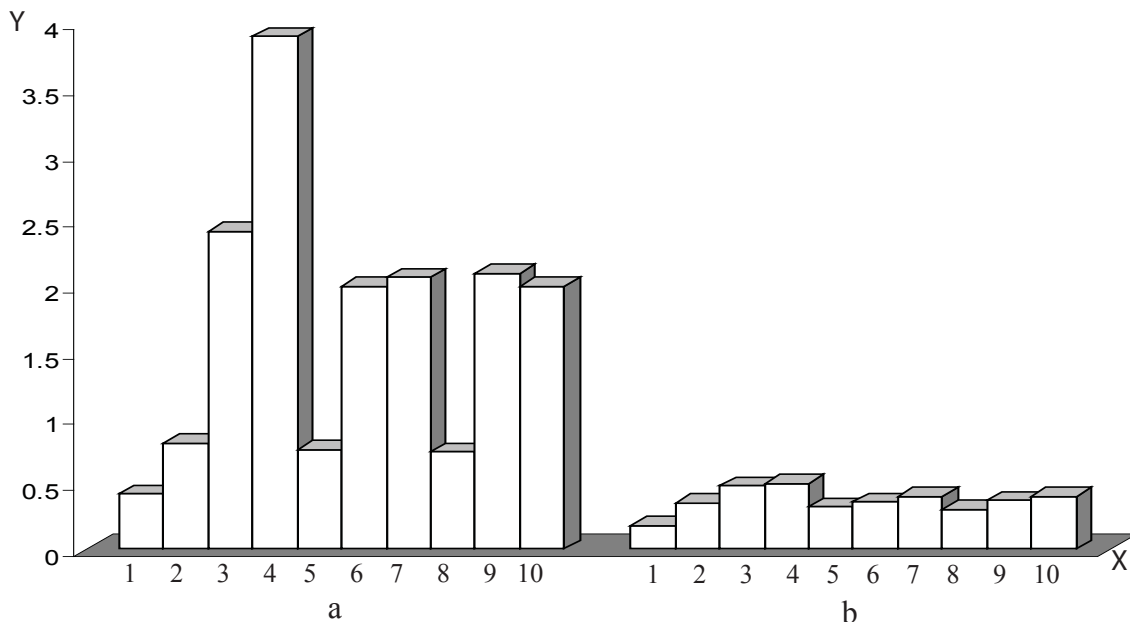


Рис. Влияние ионов металлов и пептидных биорегуляторов на частоту фрагильных сайтов в клетках индивидов разного возраста. а – индивиды среднего возраста; б - индивиды старческого возраста. X – варианты опыта: 1 - интактные; 2 - NNiCl<sub>2</sub>; 3 - CoCl<sub>2</sub>; 4 - ZnCl<sub>2</sub>; 5 - эпит + NiCl<sub>2</sub>; 6 - эпит. + CoCl<sub>2</sub>; 7-эпит. + ZnCl<sub>2</sub>; 8 - лив. + NiCl<sub>2</sub>; 9 - лив. + CoCl<sub>2</sub>; 10 - лив. + ZnCl<sub>2</sub>. Y – кол-во фрагильных сайтов на клетку



Результаты проведенного нами анализа показали, что в клетках всех исследованных пациентов фрагильные сайты проявлялись с очень высокой частотой; пределы колебаний между индивидами составили от 2,4 сайт/кл до 6,6 сайт/кл; усредненный показатель равнялся 4,1 сайт/кл (средний показатель для контрольной группы составил 0,4 сайт/кл). Зафиксированная нами высокая частота выявления фрагильных сайтов у пациентов с раком груди соответствует данным литературы [2].

Данные по частоте распределения фрагильных сайтов по хромосомным группам у пациентов, в случае хромосом групп А, В и С близки к контрольным показателям, хотя и намечается некоторая тенденция отклонения. В частности, показатель для хромосом С группы несколько занижен, а для группы А имеет тенденцию к повышению. Достоверно понижена частота образования фрагильных сайтов на хромосомах группы D. У пациентов отмечалось возрастание активности хромосом групп Е и F в отношении образования ломких сайтов по сравнению с полученными нами, а также зафиксированными в литературе [2] контрольными показателями.

При изучении особенностей расположения фрагильных сайтов на хромосомах оказалось, что, в отличие от контроля, у пациентов ломкие сайты с наибольшей частотой занимают прицентромерное положение ( $89,1 \pm 5,3\%$  от общего числа сайтов; в контроле  $20,0 \pm 1,2\%$ ). Предположительно, что выявленная закономерность, по всей вероятности, является специфической для хромосом больных раком грудной железы.

Результаты проведенных нами исследований позволяют заключить, что хромосомы лиц разных возрастных групп проявляют, с одной стороны, разную активность в отношении выявляемости фрагильных сайтов, с другой – неодинаковую чувствительность по отношению индуцирующего воздействия тестируемых трех металлов, влияние которых в ряде случаев носит строго специфический характер и поддается коррекции биорегуляторами – ливагеном и эпителином. Специфичность в отношении распределения ломких сайтов по хромосомным группам и длине хромосом, свойственна и клеткам пациентов с раком молочной железы.

**Благодарность.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта STCU – 4307.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пендина А.А., Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Баранов В.С. Особенности метилирования прицентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16 у эмбрионов человека. Цитология 2001; 43 (8): 772-776.
2. Egeli U., Cecener G., tunka B. et al. Common fragile site expression and genetic predisposition to breast cancer. Teratog. Carcinog. Mutagen. 1998; 18 (6): 279-91.
3. Guler G., Uner A., Guler N., Han SY., Iliopoulos D., McCue P., Huebner K. Concordant loss of fragile gene expression early in breast cancer development. Pathol Int. 2005; 55 (8): 471-478.
4. Kadotani T., Watanabe Y., Kadotani T. Chromosomal Study in Aging. The Kadotani Medical Research Foundation. 1248, Saijohigashi Saijo, Higashi-Hiroshima 739-0042, Japan. IJHG 2002; 2 (1): 5-9.
5. Lezhava T.A. Chromosomes and aging. Genetic conception of aging. Biogerontology 2001; 2 (4): 253-261.
6. Lezhava T.A. Human chromosomes and aging from 80 to 114 years. Nova Biomedical. New-York: 2006.
7. Lezhava T., Jokhadze T. Activation of pericentromeric and telomeric heterochromatin in cultured lymphocytes from old individuals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 110: 387-399.
8. Smith D.I., McAvoy S., Zhu Y., Perez D.S. Large common fragile site genes and cancer. Semin Cancer Biol. 2007; 17 (1): 31-41.

## SUMMARY

### THE EFFECT OF HEAVY METAL IONS AND PEPTIDE BIOREGULATORS ON THE EXPRESSION OF CHROMOSOME FRAGILE SITES IN THE INDIVIDUALS OF DIFFERENT AGE GROUPS AND BREAST CANCER PATIENTS

**Jokhadze T., Gaiozishvili M., Lezhava T.**

*Department of Genetics Iv. Javakhishvili Tbilisi State University*

Expression rates of chromosome fragile sites in peripheral blood lymphocytes have been studied in clinically healthy individuals of different age groups (20-38 yrs and 75-86 yrs) and breast cancer patients (8 cases). In individuals with a normal check-up of

different age groups the heavy metal (nickel, zink and cobalt) ions were also examined on their influence on the expression of the fragile sites and the peptide bioregulators (Livagen and Epithalon) were tested on their ability to correct the pattern of expression. Short-term lymphocyte cultures were used as tested material. The analysis showed that the chromosomes of people from young and old age groups differ from each other by the expression pattern of fragile sites – the chromosomes of young individuals were found to be more active by spontaneous formation of fragile

sites. They were also sensitive to their induction by heavy metals. Both tested bioregulators lessen heavy metals effect that was statistically reliable only for the young people group. As for the patients with breast cancer general elevated fragility of chromosomes and specific distribution of the fragile sites along the chromosomes were revealed.

**Key words:** peripheral blood lymphocytes, expression rates of chromosome fragile sites, peptide bioregulators, heavy metal ions, in healthy, in breast cancer.

## РЕЗЮМЕ

### ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ФРАГИЛЬНЫХ САЙТОВ ХРОМОСОМ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ И У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГРУДИ

Джохадзе Т.А., Гаიოზიშვილი М.Н., Лежава Т.А.

*Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили*

Проведено исследование экспрессии фрагильных сайтов хромосом лимфоцитов периферической крови клинически здоровых лиц двух возрастных групп (20-38 и 75-86 лет) и 8-и больных раком молочной железы. У здоровых доноров разных возрастных групп изучалось также влияние ионов металлов – никеля, цинка и кобальта на частоту экспрессии ломких сайтов и возможность ее коррекции пептидными биорегуляторами - ливагеном и эпителином. Исследование проводилось на краткосрочных лимфоцитарных культурах. В результате анализа оказалось, что хромосомы лиц

разных возрастных групп различаются по характеру экспрессии фрагильных сайтов – хромосомы молодых лиц более активны как по отношению спонтанного образования ломких сайтов, так и при их индукции тяжелыми металлами. Оба используемых биорегулятора понижали эффект тестируемых металлов, что имело достоверный характер только в клетках младшей возрастной группы. У больных раком молочной железы зафиксирована общая высокая фрагильность хромосом и специфический характер распределения ломких сайтов по хромосомам.

## THE MICROCALORIMETRIC INVESTIGATION OF CELLULAR SUSPENSIONS OF BLOOD LYMPHOCYTES FROM HEALTHILY AND SUFFERING FROM ATHEROSCLEROSIS INDIVIDUALS

Monaselidze<sup>1</sup> J., Barbakadze<sup>1</sup> Sh., Gorgoshidze<sup>1</sup> M., Lezhava<sup>2</sup> T., Jokhadze<sup>2</sup> T.

<sup>1</sup>E. Andronikashvili Institute of Physics; <sup>2</sup>Tbilisi State University

The *in situ* study into the unique native structure of chromatin is necessary for deepening the understanding of the physicochemical mechanisms responsible for its structural stability. The native dynamic structure of chromatin is determined not only by H1 histone but also by the transcription factors [12]. However, even the most modern methods are incapable of separating chromatin from cell nuclei without disturbing its highly ordered structure [3,8].

The above is particularly important at various diseases including atherosclerosis since the fine changes in the thermal parameters of chromatin denaturation as compared with their normal values are discernible better at the level of cells and nuclei, rather than in dilute chromatin solutions [1,4-6,9].

The given work is a try to obtain some new information about the atherosclerosis, in particularly: a) to find out those fine changes in structural organizations of hetero and active chromatin which are observed in lymphocytes of patients with atherosclerosis; b) to determine degree of cell survival with the help of measurements of lymphocyte heat production in case of sick patients; and to connect these changes with changes in structural organization of hetero- and active chromatin.

**Materials and methods.** *DSC method.* The measurements of lymphocytes denaturation parameters were carried out by DSC designed especially for study of complex biological systems with high sensitivity – 0.1 μcal. The measuring cell – 0.22 ml, temperature interval of measurement – 2-130°C, scanning rate – 0.7°C/min [7,11]. The method gives the possibility to determine thermodynamic melting parameters with milligram quantities of preparation directly in composition of cells and cellular nuclei, hetero- and active chromatin in contrast to optical and hydrodynamical methods. The measurement of heat production was carried out by microcalorimeter working in isothermic regime.

Lymphocytes were isolated from blood of patients as in work [5]. The pellet of lymphocytes was resuspended in serum and transferred into the DSC vessel. There was serum or cultural medium in the reference vessel to compensate for the contribution of heat absorption/evolution of serum proteins. The biomass concentration was determined according to dry weight directly in measuring vessel. DNA concentration was determined from dried weight at 105°C biomass taken from measuring vessel [11].

**Results and their discussion.** In Fig.1(a, b) the excess of heat capacity  $\Delta C=dQ/dT$  has been replotted as a function of temperature for lymphocytes isolated from blood of 91 years old man sick with atherosclerosis and 88 years old healthy person. a) 91 years old sick man. Dry biomass is 10.1 mg ; DNA– 0.23 mg; b) 88 years old healthy person. Dry biomass is 9.1 mg; DNA– 0.21 mg;

As it is seen, melting curves profiles have complex character. An intensive heat absorption peak (exotherm) and a shoulder from lowtemperature side are observed in the temperature range 10-40 °C, some clear maxima (endotherms), shoulders and bends are observed in the temperature range higher than 40-120 °C. According to our and literature data on melting of cells, nuclei and chromatin [2, 8, 9], the endotherms on calorimetric curve in the temperature range 42-75°C correspond to denaturation (melting) of membranes, plasma proteins and nuclear proteins, and in the temperature range 80-120 °C – to genetic material – chromatin.

In the given report we shall consider only the temperature ranges 10-40 °C and 80-120 °C, as a given investigation is aimed at study of thermodynamic stability of hetero - and active chromatin and their influence on cells survival.

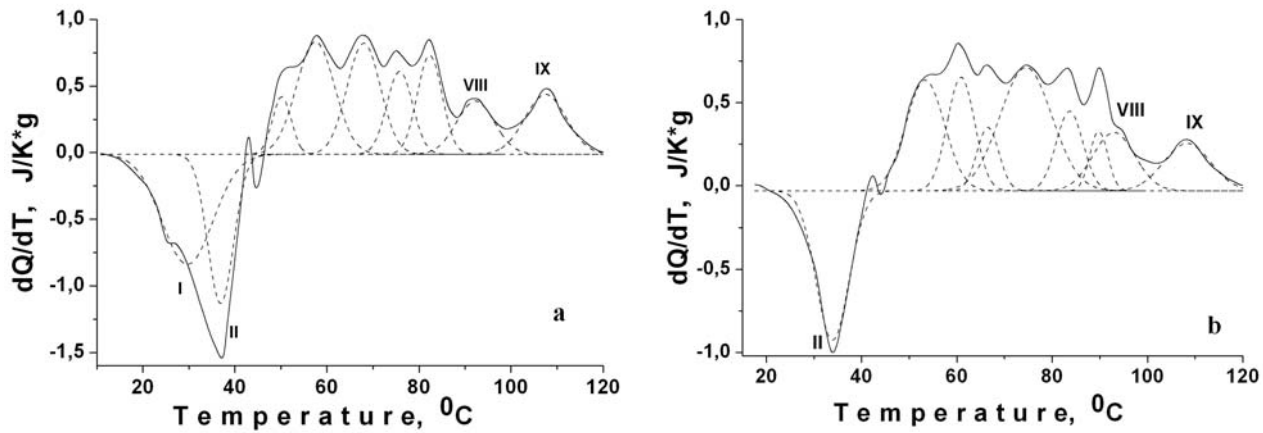


Fig. 1. The excess of heat capacity  $\Delta C = dQ/dT$  has been replotted as a function of temperature for lymphocytes isolated from blood of 91 years old man and 88 years old healthy person (see text)

The Fig. 2, 3 present microcalorimetric curves of lymphocytes of 7 and 26 years old patients recalculated per gram of dry biomass. The presented data (Fig. 1, 2, 3) show that significant changes in a thermal spectrum are observed just in the temperature range in which a chromatin complex is denaturated. In particular, in the case of scanning of healthy old man (88 years old) lymphocytes, the chromatin has two stages of melting with maxima of heat absorption about 92, 1 and 106,5°C and in the case of patients sick with atherosclerosis approximately of the same age 91 - has three stages of melting which were find out after curve deconvolution are 86, 92, 106°C. We carried out a deconvolution of curves for calculation of heat coming on every stage of chromatin melting (on every structural domain of chromatin) and obtained 9 stages of transition

(Fig. 1 a) and 10 stages (Fig.1 b). As it was mentioned above, at a given stage we are interested in heat absorption peaks (endotherms) connected with chromatin complex melting. In the particular endotherms VIII, IX (curve 1 a), VIII, IX, X (curve b) and I, II exotherms which are connected with metabolic heat.

So we see that besides of small changes of hetero- and active chromatin thermostability of 91, 26 and 7 year-old patients in comparison with hetero-and active chromatin of 88-year-old healthy man is also observed the heat rearrangement between endotherms VIII and IX and the appearance of additional heat absorption peak (endotherm) with maximum at about 87.5°C in case of 91-year-old patient and his 7-year-old granddaughter. (Fig. 2,3).

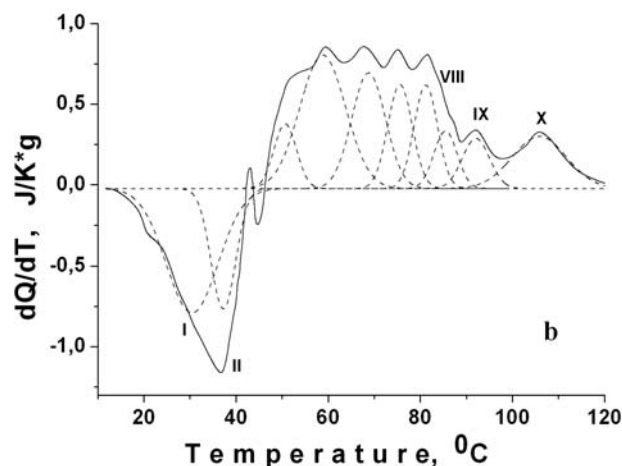


Fig. 2. The excess of heat capacity  $\Delta C = dQ/dT$  has been replotted as a function of temperature for lymphocytes isolated from blood of 7 years old persons sick with ischemia. Conditions as in Fig.1 biomass 8,4mg, DNA – 0,18 mg

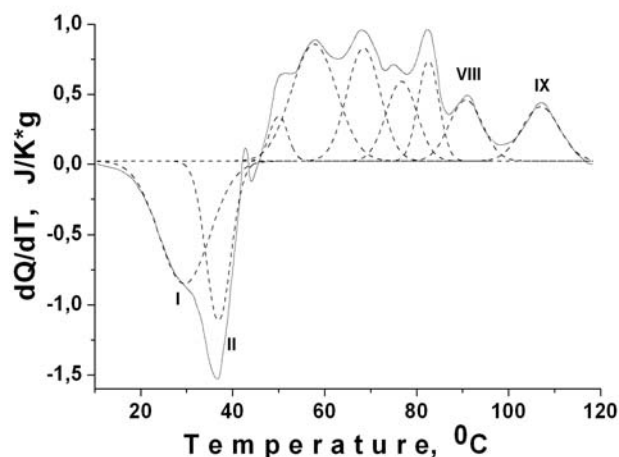


Fig. 3. The excess of heat capacity  $\Delta C = dQ/dT$  has been replotted as a function of temperature for lymphocytes isolated from blood of 26 years old man. dry biomass is 9,1 mg; DNA – 2,0 mg. Conditions as in Fig.1

The calculation of heats showed that summary melting heat  $Q_{\text{integ}} (\Delta H_{\text{integ}}) = Q(\text{VIII}) + Q(\text{IX})$  and  $Q_{\text{integ}} (\Delta H_{\text{integ}}) = Q(\text{VIII}) + Q(\text{IX}) + Q(\text{X})$ , as in case of norm also in case of 91-year-old man, his 27-year-old son and his 7-year-old granddaughter coincide with each other with exactness of experimental error and was equal to  $Q_{\text{DNA}} = 24 \text{ cal} \pm 3 \text{ cal/g DNA}$ . We also have observed that the heat which was lost in peak at  $107^{\circ}\text{C}$  was added to peaks at  $91 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$  and  $96 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ .

The data presented on Fig. 1, 2, 3 show that the exothermal effect (heat evolution) with two shoulder about  $27,0^{\circ}\text{C} - 30,0^{\circ}\text{C}$  and maximum about  $38^{\circ}\text{C}$  are observed in the temperature range  $5 - 42^{\circ}\text{C}$ . According to our data [7, 11] on determination of heat evolution by the same method in case of *Sp. platensis* cells and human cell culture L - 41 this heat evolution in the temperature range  $5 - 42^{\circ}\text{C}$  is the metabolic heat. Therefore, the value  $-Q$  calculated from the exotherm area (Fig. 1 a) is equal to  $8.2 \pm 2.5 \text{ J/g}$  dry mass of lymphocytes in anaerobic conditions and it is mainly determined by cell breath [7, 11]. Our preliminary data showed that  $-Q$  of 91-years old patient with atherosclerosis in comparison with healthy 88 years old person was decreased by 20 %. Our further study on determination of  $-Q_{\text{metab}}$  value will be connected with finding out the connection between  $-Q$  and structural rebuilding of chromatin.

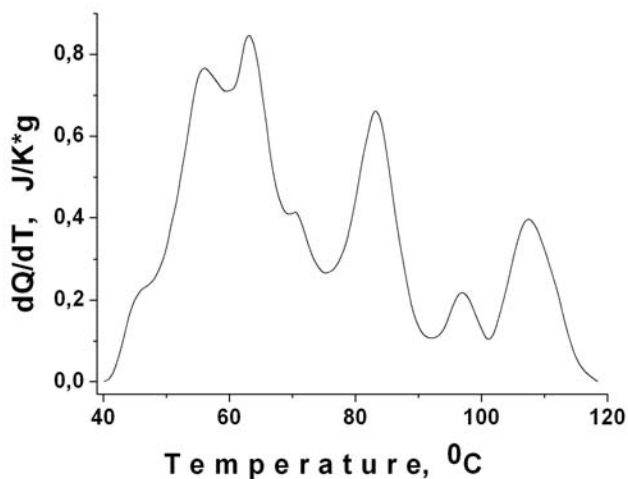


Fig. 4. The excess of heat capacity  $\Delta C = dQ/dT$  has been replotted as a function of temperature for lymphocytes isolated from blood of 30 years old healthy persons. The lymphocytes were in physiological solution, pH 7.0. Dry biomass in vessel is 16 mg. DNA – 0.37 mg

So we conclude that atherosclerosis disease leads to chromatin rebuilding in the interphase state and

decrease of cell survival. The chromatin rebuilding may be imagined as partially unfolding of 30 nm chromatin fiber into 10 nm one [1,9] due to loss of some part of H1 histone [10]. The nature of shift to low temperatures of the endotherm maxima by  $1 \div 2^{\circ}\text{C}$  in comparison with the norm is unknown yet. It may be connected with damage of the linker part of internucleosomal DNA after loss of H1 histone. This will be checked at further studies on the basis of measurements of DNA integrity by electrophoresis.

**Acknowledgement:** The work is supported by STCU project 4307.

## REFERENCES

1. Andronikashvili E., Bregadze V., Monaselidze J. Interactions between Nickel and DNA: Considerations about the role of nickel in carcinogenesis. Metal Ions In Biological Systems 1988; 23: 331-346.
2. Almagor M., David Cole R. A High Melting ( $105^{\circ}\text{C}$ ) Form of chromatin characterizes the potential of cells for mitosis. The Journal of Biological Chemistry 1987; 282:31: 15071-15075.
3. Balby C., Abelmoshi M., Barboro P., Cavazza B. and Patrone E., Biochemistry. 1989; 28: 3220-3224.
4. Khavinson V., Lezhava T., Monaselidze J., Barbakadze Sh., Djokhadze T., Dvalishvili N., Bablishvili N. Bioregulator Vilon-induced reactivation of chromatin in cultured lymphocytes from old people. Biogerontology 2004; 5: 73-79.
5. Khavinson V., Lezhava T., Monaselidze J., Djokhadze T., Dvalishvili N., Bablishvili K. Peptide Epitalon activates chromatin at the old age. Neuroendocrinol. Lett. 2003; 4: 24: 329-333.
6. Lezhava T., Khavinson V., Monaselidze J., Djokhadze T., Dvalishvili N., Bablishvili N., Barbakadze Sh. Bioregulator Vilon-induced reactivation of chromatin in cultured lymphocytes from old people. Biogerontology 2004; 4: 73-79.
7. Monaselidze J., Abuladze M., Asatiani N., Kiziria E., Barbakadze Sh., Majagaladze G., Iobadze M., Tabatadze L., Hoi-Ying Holman, Sapojnikova N. Characterization of chromium-induced apoptosis in cultured mammalian cells. A different scanning calorimetry study. Thermochemia Acta 2006; 441: 8–15.
8. Monaselidze J. Mgeladze G. Chanchalashvil Z. Majagaladze G. and Chitadze G. Thermal Properties of Intact Nucleoproteides. J. of Polymer Science 1981; 69: 17-20.
9. Monaselidze J., Kalandadze Ya., Khachidze D.

Microcalorimetric investigation of influence of cancerogenic and anticarcinogenic compounds on nuclear chromatin of tumor cells". Journal of Thermal Analysis 1996; 46: 431-440.

10. Russo I., Barboro P., et al. Role of H1 in chromatin folding. A thermodynamic study of chromatin, reconstitution by differential scanning calorimetry. Biochemistry 1995; 34: 301-311.

11. Topchishvili L., Barbakadze Sh., Khizanishvili A., Majagaladze G. and Monaselidze J. Microcalorimetric Study of Iodized and Noniodized Cells and C-Phycocyanin of *Spirulina platensis*. Biomacromolecules. 2002; 3: 3: 415-420.

12. Van Hole K. and Zlatanova G. J. Biol. Essays 1996; 18: 697-701.

## SUMMARY

### THE MICROCALORIMETRIC INVESTIGATION OF CELLULAR SUSPENSIONS OF LYMPHOCYTES IN HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS SUFFERING FROM ATHEROSCLEROSIS

Monaselidze<sup>1</sup> J., Barbakadze<sup>1</sup> Sh., Gorgoshidze<sup>1</sup> M., Lezhava<sup>2</sup> T., Jokhadze<sup>2</sup> T.

<sup>1</sup>E. Andronikashvili Institute of Physics; <sup>2</sup>Iv. Javakhishvili Tbilisi State University

The denaturation thermodynamic parameters – enthalpy ( $\Delta H$ ) and temperature of hetero- and active chromatin of lymphocytes and metabolic heat of these cells were determined for healthy and suffering from atherosclerosis individuals. It is supposed that atherosclerosis disease leads to chromatin rebuilding in the interphase state and decrease of cell survival. The

chromatin rebuilding may be imagined as partially unfolding of 30 nm chromatin fiber into 10 nm one due to loss of some part of H1 histone.

**Key words:** atherosclerosis, thermodynamic melting parameters, calorimeter, lymphocytes, chromatin, melting heat.

## РЕЗЮМЕ

### МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СУСПЕНЗИИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Монаселидзе<sup>1</sup> Дж.Р., Барбакадзе<sup>1</sup> Ш.И., Горгошидзе<sup>1</sup> М.З., Лежава<sup>2</sup> Т.А., Джохадзе<sup>2</sup> Т.А.

<sup>1</sup>Институт физики им. Е. Андроникашвили;

<sup>2</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили

Термодинамические параметры денатурации, энтальпия ( $\Delta H$ ) и температура гетеро- и активного хроматина лимфоцитов, а также метаболическое тепло этих клеток были определены у здоровых лиц и больных атеросклерозом. Было высказано предположение, что атеросклероз вызывает изме-

нение структуры хроматина в состоянии интерфазы и уменьшает выживаемость клеток. Структурное перестроение хроматина можно представить как частичный переход 30 нм фибриллы в 10 нм структуру ввиду потери определенной части H1 гистонов.

## THERMODYNAMIC PROPERTIES OF BLOOD PLASMA OF PATIENT SUFFERING FROM ATHEROSCLEROSIS

Monaselidze J., Barbakadze Sh., Kiladze M., Kuchadze Z., Lezhava T.

*E. Andronikashvili Institute of Physics*

It is proved that the method of differential scanning microcalorimetry (DSC) is one of the leading methods for study of thermostability of macromolecules and their complexes in composition of cells and cell nuclei [1,6,7], because both optical and hydrodynamic methods are difficult to use for opaque solutions and suspensions.

Earlier, on the basis of DSC investigation of blood plasma of healthy individuals [8], it was shown that at heating of plasma in the temperature range 25-100°C some weak heat absorption peaks at 53°, 83°, 89°C and an intensive peak at 61-63°C were observed. It was established that the peaks at 53° and 87°C corresponded to melting of D and F domains of the fibrinogen and the peaks at 62° and 80°C - to albumin denaturation. The ratio of the heats absorbed ( $Q_1/Q_2$ ) peak at  $T_d=62^\circ$  and  $T_d=80^\circ$  of blood plasma of healthy person is 10:1. The first stage corresponds to fatless fraction of albumin and the second one - to fatty fraction. It was also shown that  $\gamma$ -globulin denaturates at 72°C and the melting of  $\alpha$  and  $\beta$  globulins is observed only after deconvolution of the curve on Gaussian components [3,4].

We have used this approach to find out specific and fine changes in thermostability of dominant proteins in plasma composition of patients with atherosclerosis, in comparison with the norm.

The goal of the work is to find out the changes in the heat parameters of blood plasma denaturation of a son and a granddaughter, in comparison with the same parameters of a 91 years old grandfather with atherosclerosis.

**Materials and methods.** The investigations were carried out on differential scanning microcalorimeter (DSC) designed at the Institute of Physics, Department of Biological System Physics. The sensitivity of microcalorimeter is 0.1  $\mu$ W [5, 9]. The volume of measuring vessel was 0.20 cm<sup>3</sup>, the heating rate was 0.55°C/min, and the temperature range of measurements - 25-110 °C. The exactness of the temperature

measurements was not less than 0.1 °C. The error in determination of heat denaturation ( $Q_d$ ) was not more than 8%. The microcalorimeter (DSC) processor was equipped with all software needed for determination of the thermodynamic parameters of investigated solutions and deconvolution of calorimetric curves.

The protein concentration was determined in the measuring vessel at 102 °C according to dry weight. The concentration of inorganic compounds was also determined according to dry weight at 400 °C.

The fresh venous blood of healthy persons and patients suffering from atherosclerosis was used. Heparin and EDTA were used as anticoagulants. Blood plasma was obtained by blood centrifugation during 10 min at 8000 rev min<sup>-1</sup> and supernatant was used for calorimetric study. An experiment began immediately after pouring a sample into the measuring cell. The preservation of plasma and serum for 24 h at 4.0 °C changed the thermal parameters of denaturation by 5%.

**Results and discussion.** Thermodynamic properties of blood plasma of patients suffering from atherosclerosis were studied for the first time. It was shown that the protein stability of blood plasma of patients with atherosclerosis significantly differs from the norm (Fig. 1 a, b), and it also differs from the plasma of his son and granddaughter (Fig. 2). It is clearly seen that  $T_d$  of main stage of blood plasma at  $63\pm 1^\circ\text{C}$  of patient with atherosclerosis is increased by 2.4°C and integral heat of denaturation ( $Q_d$ ) is decreased in comparison with the norm. Deconvolution of these curves on Gaussian compounds showed that the denaturation process of blood plasma of healthy and sick persons had seven stages of transition (Fig. 1a, b).

The stages I and VII with denaturation temperatures at 55.2.°C and 91.4°C correspond to denaturation of D and F domains of the fibrinogen [5, 11], the stages II and VI correspond to denaturation of albumin fraction, the stages III and V correspond to  $\alpha$  and  $\beta$  globulins, and the stage IV corresponds to  $\gamma$ -globulins denaturation [3,4].

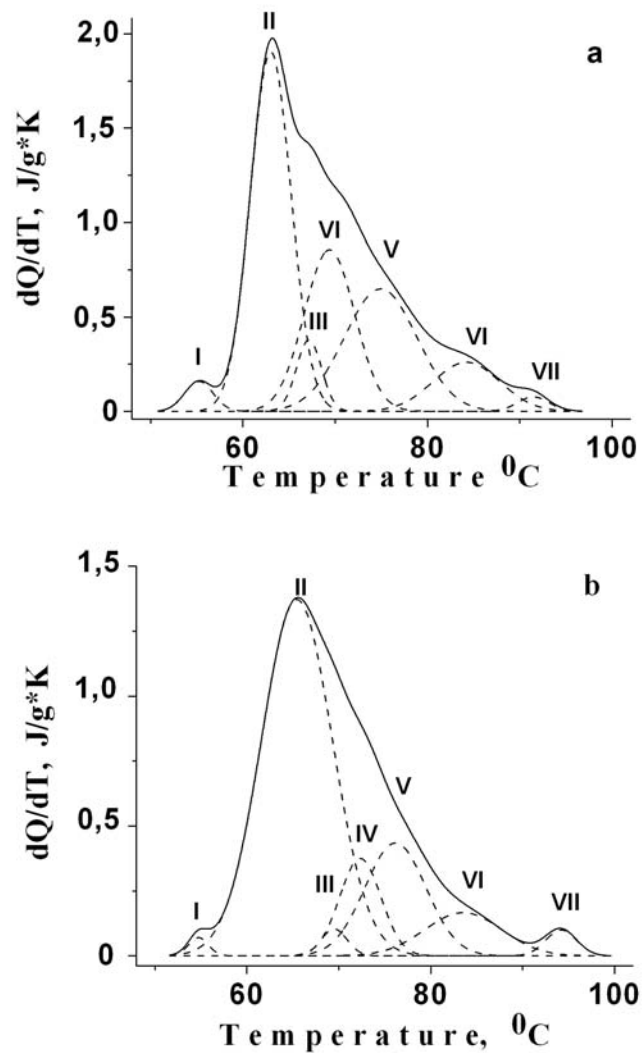


Fig. 1. Heat absorption curve of blood plasma of the patient with atherosclerosis (91 years old man) (b) and norm (a), calculated per gram of dry proteins. (a) – The quantity of suspension is 0.205 ml,  $M_{dry}(protein) - 9.1$  mg. (b) – The quantity of suspension - 0.208 ml,  $M_{dry}(protein) - 8.8$  mg

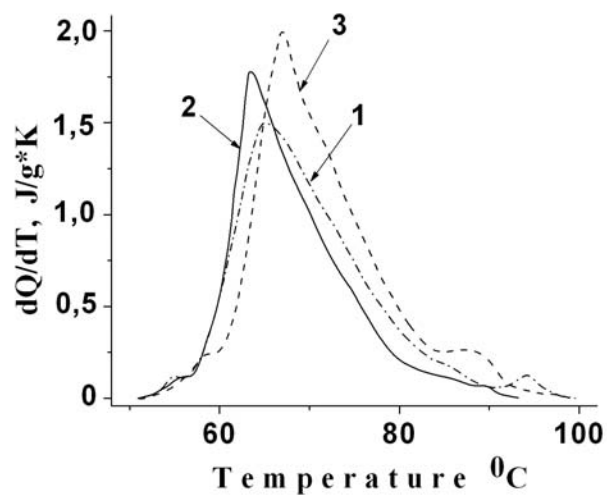


Fig. 2. Heat absorption curve of the blood plasma of (1) a patient with atherosclerosis (91-year old men), (2) his son (26-year old), (3) his granddaughter (7-year old), calculated per gram of dry proteins



We showed that the thermostability of D and F domains of fibrinogen of the patient (91-year-old men) was changed in comparison with the same domain of norm (Fig. 1). In particular, D domain thermostability was decreased by 0.5 °C and F domain was increased

by 2.8 °C, compared with the norm (Table 1,2).

In case of the 7-year-old-girl, the  $Q_d$  of D domain was increased by 6 times,  $T_d$  was increased by 4 °C in comparison with her grandfather (Table 1, 2).

*Table 1. The denaturation heat (in J/g per gram dry biomass) of main proteins plasma calculated from deconvolutions picks*

Subject	Total $Q_d$	D Domain	Albumin	$\alpha$ Globulin	$\gamma$ Globulin	$\beta$ Globulin	Albumin	E Domain
Norm	25.5	1.2	8.1	2.2	6.2	4.8	2.9	0.2
91-year-old	22.0	0.2	13.4	0.8	3.5	1.8	2.0	0.35
26-year-old	21.1	0.9	9.4	1.0	3.2	3.9	2.3	0.4
7-year-old	26.7	1.2	13.8	1.2	4.4	4.2	1.8	0.1

*Table 2. The denaturation temperature of main proteins plasma calculated from deconvolutions picks*

Subject	$T_d$ I	$T_d$ II	$T_d$ III	$T_d$ IV	$T_d$ V	$T_d$ VI	$T_d$ VII
Norm	55.2	63.0	67.2	69.4	74.9	84.2	91.4
91-year-old	54.7	65.4	69.5	72.3	76.2	83.5	94.2
26-year-old	55.5	63.9	67.1	69.3	73.1	80.8	89.5
7-year-old	58.7	66.9	71.4	73.8	78.6	87.8	96.1

*Deconvolution of cuve was conducted with Origin 6.0 (Microcal™ Software Inc.).*

*The errors in determination  $Q_d$  of main proteins plasma was determined to 20%,  $T_m$  was to  $\pm 1$  °C*

In case of the 91 year-old patient, the decreased intensity of the heat absorption peak of the albumin fatless fraction was observed, and the heat absorption peak intensity of F domain was increased by several times, and its  $T_d$  was increased by ~3°C in comparison with the norm. The significant changes in denaturation parameters of  $Q_d$  (melting heat) and  $T_d$  (melting temperature) were observed in case of the 26-year old son (in comparison with his father) and they are closed to the norm.

The exact value of the melting heats ( $Q_d$ ) of albumin and its fractions –  $\gamma$ -globulin and  $\alpha, \beta$ -globulins – are already known from our and literature data [10,11]. As value  $Q_d$  of proteins (without significant changes of their structural organization due to protein-ligand interactions) is directly proportional to protein concentration in solution it is possible to obtain the exact quantitative value of the abovementioned proteins in one experiment during 50÷120 minutes, at various heating rate.

But the main point in these experiments is that we can judge about the changes in dynamic structure

of proteins, and we can say that the decrease of  $T_d$  is caused by formation of defects in the three-dimensional protein structure and increase of  $T_d$  is a result of formation of protein-marker complexes.

The changes in the denaturation heat parameters of main proteins of plasma are connected with the fatless fraction of albumin ( $T_d$  of albumin in the case of norm is equal to 63 °C),  $\gamma$ -globulins (a clearly expressed shoulder on the calorimetric curve in the temperature range 65-78°C), and the fat fraction of albumin at  $T_d=84.2^\circ\text{C}$ .

Now we process the obtained data, including deconvolution of the denaturation curves. The values of  $T_d$ ,  $\Delta T_d$ ,  $Q_d$  of each deconvolution curve correspond to denaturation of fatless, fat fractions of albumin,  $\gamma$ -globulins and  $\alpha$ -globulins, D and F fractions of fibrinogen.

Thus we conclude that DSC method give the possibility to obtain information about the quantity of plasma main proteins and their thermostability in one experi-

ment during 50-120 minutes in depend on scanning rate, that is important in case of disease diagnostics.

**Acknowledgement:** The work is supported by STCU project 4307.

## REFERENCES

1. Andronikashvili E., Bregadze V., Monaselidze J. Interactions between Nickel and DNA: Considerations about the Role of Nickel in Carcinogenesis. *Metal Ions In Biological Systems* 1988; 23: 331-346.
2. Donald W.N. From branch to clinic with apoptosis – based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407: 810-816.
3. Khachidze D., Monaselidze J. Independent denaturation of albumin and globulin in human blood serum. *Biophysics* 2000; 45: 2: 317-319.
4. Khachidze D., Monaselidze J. Microcalorimetric study of human blood serum. *Biophysics* 2000; 45: 2: 312-316.
5. Lezhava T., Khavinson V., Monaselidze J., Djokhadze T., Dvalishvili N., Bablishvili N., Barbakadze Sh. Bioregulator Vilon-induced reactivation of chromatin in cultured lymphocytes from old people. *Biogerontology* 2004; 4: 73-79.
6. Monaselidze J., Mgeladze G., Chanchalashvil Z, Chitadze G. Thermal Properties of Intact Nucleoproteides. *J. of Polymer Science* 1981; 69: 17-20.
7. Monaselidze J., Majagaladze G., Bakradze N., Birkaya B., Sapojnikova N., Asatiani N. Peculiarities of the denaturation of chromatin in leukemic tissues and cells of mouse spleen. *Biophysics* 2000; 44: 5: 882-885.
8. Monaselidze J., Kalandadze Ya. Thermodynamic properties of serum and plasma of patients sick with cancer. *High Temperatures – High Pressures* 1997; 29: 677-68.
9. Monaselidze J., Majagaladze G., Barbakadze Sh., Khachidze D., Gorgoshidze M., Kalandadze Y., Haroutiunian S., Dalyan Y., Vardanyan V. Microcalorimetric investigation of DNA, poly(dA)poly(dT) and poly[d(A-C)]poly[d(G-T)] Melting in the presence of water soluble (Meso-tetra-(4-N-oxyethylpyridyl) Porphyrin) and its Zn Complex. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 2008; 25 (4): 419-424.
10. Privalov P., Monaselidze J. Calorimetric investigation of serum of albumin. *Biofizika* 1963; 8: 420-426.
11. Privalov P. L. Stability of proteins. *Advanced in Protein Chemistry* 1982; 35: 1-104.

## SUMMARY

### THERMODYNAMIC PROPERTIES OF BLOOD PLASMA OF PATIENT SUFFERING FROM ATHEROSCLEROSIS

**Monaselidze J., Barbakadze Sh., Kiladze M., Kuchadze Z., Lezhava T.**

*E. Andronikashvili Institute of Physics*

The goal of the work is to find out the changes in the heat parameters of blood plasma denaturation of a son and a granddaughter, in comparison with the same parameters of a 91 years old grandfather with atherosclerosis.

The significant changes in heat ( $Q_d$ ) and denaturation temperature ( $T_d$ ) of albumin, globulins and fibrinogen of 91-year-old patient suffering from atherosclerosis relative to the norm (88-year-old man) are found out. In particular,  $Q_d$  increase by 60% of albumin fat fraction and fibrinogen of F domain and the increase of their  $T_d$  by 2.4 °C and 2.8 °C relative to the norm;  $Q_d$  decrease by 1.8 times and  $T_d$  increase by 2.9 °C of  $\gamma$  globulin relative to the norm;  $Q_d$  decrease by 6 time of D domain fibrinogen and  $\alpha$  and  $\beta$  globulins by 1.4 and 2.9 times relative to the norm. Total denaturation heat of donor blood plasma is equal to 25.5±3J/g and patient suffering from atherosclerosis is equal to 22.0 J/g.

The most significant changes of heat parameters are observed between grandfather and granddaughter: an increase of D domain  $T_d$  by 4 °C and  $Q_d$  by 6 times;  $T_d$  increase of albumin fat fraction by 4.3 °C and its  $Q_d$  decrease by 10% of granddaughter in comparison with her grandfather.

As value  $Q_d$  of proteins is directly proportional to protein concentration in solutions, we conclude that the significant changes of concentration main proteins in blood plasma and changes of their thermodynamic stability occur at atherosclerosis, relative to the norm.

**Key words:** blood plasma, denaturation temperature, atherosclerosis.

## РЕЗЮМЕ

### ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТА БОЛЬНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Монаселидзе Дж.Р., Барбакадзе Ш.И., Киладзе М.Т., Кучадзе З.Г., Лежава Т.А.

*Институт физики им. Е. Андроникашвили*

В настоящей работе делается попытка получения дополнительной информации об изменениях параметров тепловой денатурации плазмы крови у сына и внучки в сравнении с параметрами у 91-летнего деда с атеросклерозом.

Выявлены существенные изменения в теплоте ( $Q_d$ ) и температуре ( $T_d$ ) денатурации альбумина, глобулинов и фибриногена 91-летнего больного атеросклерозом относительно нормы (88-летний мужчина), в частности, 20% увеличение  $Q_d$  жирной фракции альбумина и фибриногена F домена и увеличение их  $T_d$  на 2,4 и 2,7 °C относительно нормы; уменьшение в 2,6 раза  $Q_d$  и повышение на 2,9 °C  $T_d$   $\gamma$  глобулина; уменьшение в 3,5 раза  $Q_d$

фибриногена D домена и увеличение примерно в 2 раза  $\alpha$  и  $\beta$  глобулинов относительно нормы. Общая теплота плавления плазмы крови донора равна  $32,7 \pm 3$  Дж/г, а пациента страдающего атеросклерозом – 28,1 Дж/г. Наибольшие изменения тепловых параметров наблюдаются между дедушкой и нормой, внучкой и нормой.

Учитывая, что  $Q_d$  белков без значительных изменений их структурной организации прямо пропорциональна концентрации белка в среде, мы делаем вывод, что при атеросклерозе происходят значительные изменения концентрации основных белков в плазме крови и их термодинамической стабильности относительно нормы.

---

### PROINFLAMMATORY REACTANTS AS DETERMINANTS OF STROKE SEVERITY IN ELDERLY

Shakarishvili<sup>1</sup> R., Beridze<sup>2</sup> M.

*<sup>1</sup>Iv. Javakhishvili Tbilisi State University; <sup>2</sup>Tbilisi State Medical University*

Stroke is the third most frequent cause of death, the most common cause of severe and prolonged physical disability in industrialized world and the second most frequent cause of dementia [1,9]. The incidence of stroke and its associated mortality increases with age. The population aged 60 years and more in developed countries is rapidly expanding and is expected to double over the next three decades [1]. Therefore, since 75% of stroke patients are aged over 65, most of recent knowledge accumulated in stroke management in general is definitely appropriate for the elderly subgroup [7,9]. Three main causes account for more than 80% of all cerebral infarcts in the elderly: atherothrombotic

vascular occlusion, cardio embolism and lipohyalinosis associated with segmental fibrinoid arterial degeneration in the deep perforate [10]. The brain tissue inflammatory response is universal reaction and plays the crucial role in metabolic consequences of acute cerebral ischemia regardless of its origin. Local inflammatory reactions start with activation of microglia via  $\gamma$  – interaction and release of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  with subsequent progression of cytokine cascade [7-9]. Proinflammatory cytokines induce transendothelial migration of neutrophils in the penumbra region, enhance platelet and red blood cell aggregation and adhesion, trigger

release of fatty acids, production of radical oxygen species, that lead to microcirculatory plugging and spread of injury through salvageable ischemic tissue [4,8]. Local immune response is modulated by anti-inflammatory cytokines release, which is mainly produced by lymphocytes and monocyte-macrophage targeting on neurotoxic factors of enzymatic cascade – the ultimate mechanism of necrosis or neuronal apoptosis in penumbra region [4,5]. Monitoring of proinflammatory proapoptotic immunochemical patterns in acute stage of cerebral ischemia may play decisive role in prognosis and prediction of remote consequences of stroke in elderly [7].

On this background the aim of the present study was to perform a retrospective analysis in a group of old hospitalized patients with acute stroke in order to evaluate the impact of several acute phase reactants and the prevalence of short-term mortality.

**Material and methods.** Forty two patients aged 60-75 (26 female) have been investigated retrospectively. Exclusion criteria comprised the inflammatory disease, autoimmune disorder, renal and liver insufficiency, cancer and recent history of craniocerebral trauma. Two age category were separated:  $\leq 60$  years old – 17 patients and  $> 65$  years old – 25 patients. Initial neurological status, later impairment and functional outcome were evaluated using Glasgow Coma Scale (GCS), National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and Barthel Index (BI). Patients of both age categories were divided into two groups: severe stroke (GCS  $\leq 10$ , NIHSS  $> 15$ , BI  $< 16$ , n=25) and a moderate/mild stroke (GCS  $> 10$ , NIHSS  $\leq 15$ , BI  $\geq 18$ , n=17). Control comprised 15 age matched patients exposed to lumbar discectomy. Ischemic lesion size was evaluated on conventional MRI scans (0,5 and 1,5T) by neuroradiologist blinded to the study.

The NO concentration was detected by spectrophotometric method and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) method. Cytokine plasma level was determined applying the Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Cytokines concentrations were calculated by computer program TITERSOFT using the standard curve. Statistical evaluation was performed applying the SPSS program with t-paired test for mean values. Pearson Product-Moment Correlation and multivariate logistic regression (entered stepwise model) has been used.

**Results and their discussion.** The NO plasma concentration within 48 hours after stroke onset was reduced more pronounced in aged patients, while in less severe cases and in relatively young patients it was significantly elevated ( $p < 0,01$ ). The high plasma levels of IL-6 in the acute phase of stroke is the strong predictor of poor outcome rather for aged, than for younger patients.

The plasma levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (interferon, beta 2) (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were elevated in comparison with control in both groups of patients within 48 hours of stroke onset. There was no statistical difference regarding the IL-1 $\beta$  plasma levels between the groups by that time ( $p < 0,5$ ). The TNF- $\alpha$  and IL-6 plasma levels at the same time of stroke onset were significantly different in the group I versus group II ( $p < 0,01$ ). The TNF- $\alpha$  and IL-6 in acute period of stroke significantly prevailed in comparatively old patients ( $p < 0,01$ ), while NO content in plasma revealed much higher values in relatively young age. On the 14<sup>th</sup> day of stroke onset the plasma levels of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  were decreased in contrast to initial levels measured within 48 hours from symptoms onset ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ). Significant difference between values of IL-6 in periods of the first 48 hours and 14<sup>th</sup> day from stroke onset was noted only in relatively young patients, who also demonstrated much better functional outcome for the one month post stroke period. In a month after stroke only in patients over 70 years old constantly abnormal plasma values of NO and TNF- $\alpha$  were revealed, but positive correlation with worse functional outcome was not significant ( $p < 0,5$ ).

Several mechanisms are to be supposed by which the proinflammatory cytokines may induce the brain tissue injury. On one hand these effects appear to be related to direct interactions between cytokines and glial cells, astrocytes and neurons. On the other hand, they activate the production of heat shock proteins and nitric oxide, which are considered being involved in programmed cell death [12, 13]. It is believed that release of the free fatty acids and other proinflammatory lipid metabolites promote the expression of cytokines cascade as a direct consequence of ionic imbalances and calcium accumulation in neurons associated with glutamate-induced toxicity in acute brain injury [10]. The generalized immune response to the local brain ischemia appears to be mediated through hypothalamus activation via proinflammatory cytokines's direct

influence [11], which appear to be signal transmitters between immune and neural system established on feedback mechanism. Activated peripheral blood lymphocytes and macrophages produce the high concentration of proinflammatory cytokines with peak response by 48 hours from stroke onset that is proved by experimental and clinical studies [2,3]. In accordance with mentioned studies we found the elevated levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the peripheral blood plasma within 48 hours from stroke onset. On the 14<sup>th</sup> day of stroke onset only the level of IL-6 was elevated in the group of patients with severe stroke, more prominent in older age. The decreased levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  on the 14<sup>th</sup> day after stroke indicate activation of anti-inflammatory compensatory mechanisms. The significant difference observed regarding the IL-6 initial plasma levels in acute stage of stroke and its negative correlation toward the month outcome in more aged patients support experimental and clinical data evidencing that increased initial plasma level of IL-6 correlates with larger volume of lesion and is associated with poor prognosis. As well as in experimental studies, the negative correlation was established in our study toward TNF- $\alpha$  initial plasma levels and functional outcome of disease envisaging the difference in corresponding patients' age and severity degree. Recent publications suggest [6] that transcriptional regulation of macrophagal NO-synthase (NOS-2), which is independent of Ca<sup>2+</sup> concentrations and regulates the production of NO, is supposed to be intensified in conditions of immunodeficiency. It is evidenced that in conditions of immune imbalance that is developing in the most severe cases of brain ischemia and to which aged patients are highly sensitive, intensive production of TNF- $\alpha$  suppresses the expression of endothelial NO-synthase (NOS-3) caused by reduction of life expectancy of appropriate mRNA [8]. Accordingly, in our study the significant negative correlation was found between the plasma levels of TNF- $\alpha$  and free NO plasma levels at the same period of stroke development. Expression of free NO in peripheral blood, induced by macrophagal and endothelial NO-synthase activation in acute stage of stroke is directed toward vasodilatation, inhibition of platelets and red blood cell aggregation and adhesion on the endothelium regulation of blood flow and arterial pressure via endothelium-dependent relaxation muscle-type arteries through nitergic transmission may play protective role at early stages of ischemic stroke. Favoring this assumption we found the better outcomes in rela-

tively young patients with high initial plasma levels of NO. Though the high initial amounts of TNF- $\alpha$  in our study correlated with worse prognosis, there is a conflicting opinion on TNF- $\alpha$ . Several experimental studies suggest that local injection of TNF- $\alpha$  into brain greatly increases leukocyte infiltration in this area certifying that TNF- $\alpha$  may potentate neuronal death. Another studies report that animals without TNF- $\alpha$  have larger infarcts and decreased neuronal survival compared to control [4, 11]. According to recent data it may be supposed that high TNF- $\alpha$  expression at the critical stage of stroke development is directed toward the compensation of immune reactions, taking in account that TNF signaling pathway considered to be controlling mechanism of T-cell expansion during immune response [12,13].

Finally, we can conclude that age-related peculiarity of proinflammatory substances' balance in acute stroke allows considering the IL-6 plasma level to be the strong predictor of late outcome in elderly patients over seventy. Although TNF- $\alpha$  initial high level in these patients were correlated with worse outcome, the ultimate role of TNF- $\alpha$  involvement in acute brain ischemia remains controversial.

## REFERENCES

1. Ameriso S., Sahai S. Management of acute ischemic stroke in the elderly. In: Stroke in Elderly. Eds: A. Bruno, F. Chollet, B. Vellas. Springer, 1996, 73-78.
2. Einstein E. R. Proteins of the Brain and CSF in Health and Disease. Springfield Ill., Ch. C. Thomas Publ, 1982
3. Fassbender K., Rossol S., Kammer T. et al. Proinflammatory cytokines in the serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. J. Neurol Sci., 1994, 122 (2): 135-139
4. Feurstein G.Z., Wang X., Yue T.L., Barone F.C. Inflammatory cytokines and stroke: emerging new strategies for stroke therapeutics, J. Cerebrovascular Disease, 1995, 75-91
5. Garcia, J. H., Lassen, N. A., Weiller, C., et al. Ischemic stroke and incomplete infarction J. Stroke, 1996, 27, 761-765
6. Ignarro L. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. Biochem Pharmacol, 1991, 41, 485-490.
7. Leys D., Lucas C., Henon H. and et al Ischemic stroke in the elderly: is it necessary to look for a cause? In: Stroke in Elderly. Eds: A. Bruno, F. Chol-

- let, B. Vellas. Springer, 1996, 23-40
8. Lui K., Garcia J., Gutierrez J. Microglial response in focal brain ischemia are influenced by astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55, 665-669
  9. Moody D., Brown W., Challa V. Cerebral microvascular alteration in aging, leucoaraiosis and Alzheimer Disease. In : *Cerebrovascular Pathology in Alzheimer Disease*. Eds: Torre J., Hachinski V. N. Y. Academy of Sciences, 1997, 103-116
  10. Norving B. Metabolic control in acute stroke. In : *Update on Stroke Therapy*. Ed: N. G. Wahlgren Stockholm, 215-226
  11. Prussin C. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the signal-cell level. *J. Clin. Immunol.*, 1997, 17, 199-200
  12. Rothwell N., Hopkins S. Cytokines and the nervous system: II action and mechanisms of action. *Trends in Neuroscience* 1995, 18, 130-136
  13. The 2000 Karolinska Stroke Update consensus statements. In: *update on Stroke Therapy*. Ed: N. G. Wahlgren. Stockholm, 2001, 21-39

## SUMMARY

### PROINFLAMMATORY REACTANTS AS DETERMINANTS OF STROKE SEVERITY IN ELDERLY

Shakarishvili<sup>1</sup> R., Beridze<sup>2</sup> M.

<sup>1</sup>*Iv. Javakhishvili Tbilisi State University;* <sup>2</sup>*Tbilisi State Medical University*

Investigations aimed at studying of peripheral blood levels of free nitric oxide (NO) and proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in correlation with initial ischemic lesion size and neurological dynamics during a month of acute brain ischemia.

Forty two patients aged 60-75 (26 male) have been investigated. Initial neurological status, later deterioration and functional outcome were evaluated using Glasgow Coma Scale (GCS), National institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and Barthel Index (BI). Patients were divided into two groups: severe stroke (GCS $\leq$  10, NIHSS  $>$ 15, BI $<$  16, n=25) and a moderate/mild stroke (GCS $>$ 10, NIHSS  $\leq$ 15, BI $\geq$ 18, n=17). The NO concentration was detected by spectrophotometric and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) methods. Cytokine plasma levels were determined applying the Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

Statistical evaluation was performed by SPSS. Mean values calculated using the t-paired test. Pearson correlation and multivariate logistic regression have been applied.

In the first days of stroke onset the plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  revealed the slight negative correlation toward the functional outcome, while the elderly patients found to have the significant negative correlation of IL-6 plasma levels toward the functional outcome (p $<$ 0.01).

The NO plasma concentration within 48 hours after stroke onset more profoundly was reduced in aged patients, while in less severe cases and in relatively young patients it was significantly elevated (p $<$ 0,01).

The high plasma level of IL -6 in the acute phase of stroke seems to be the strong predictor of poor outcome rather for aged, than for younger patients.

**Key words:** free nitric oxide, proinflammatory cytokines, stroke in elderly.

## РЕЗЮМЕ

### ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ РЕАКТАНТЫ КАК ДЕТЕРМИНАНТЫ ТЯЖЕСТИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У ПОЖИЛЫХ

Шакаришвили<sup>1</sup> Р.Р., Беридзе<sup>2</sup> М.З.

<sup>1</sup>*Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили;* <sup>2</sup>*Тбилисский государственный медицинский университет*

Исследовали возрастзависимые изменения плазменного уровня свободной окиси азота (NO) и провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  в корреляции с исходным объемом церебрального инфаркта и динамикой данных неврологического обследования в течение месячного периода после развития острой мозговой ишемии у 42-х пациентов (26 женщин) в возрасте 60-75 лет. Исходные показатели неврологического статуса, последующую динамику их ухудшения и функциональный исход оценивали по шкале комы Глазго (GCS), шкале Национального института здоровья (NIHSS), индексу Бартеля (BI). Пациенты распределялись в группы тяжелого (GCS $\leq$ 10, NIHSS  $>$ 15, BI $<$ 16, n=25) и умеренного/легкого (GCS  $>$ 10, NIHSS  $\leq$ 15, BI $\geq$ 18, n=17) течения за-

болевания. Содержание в плазме NO определяли спектрофотометрическим методом и методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР); для оценки концентрации цитокинов применяли метод энзимсвязанной иммуноабсорбции (ELISA). Статистическую обработку данных производили с помощью программы SPSS, средние величины вычисляли t-парным тестом, корреляционные показатели определяли мультивариантной логической регрессией и коэффициентом Пирсона.

Концентрация IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  в первые сутки после развития инсульта обнаруживала отрицательную

нерезкую корреляцию с функциональным исходом, тогда как у более пожилых пациентов отмечалась выраженная отрицательная корреляция содержания IL-6 с функциональным исходом ( $p < 0,01$ ). Выявлено резкое выраженное снижение концентрации NO у более пожилых пациентов, в то время как у относительно молодых пациентов с легким или умеренно тяжелым инсультом регистрировались повышенные показатели NO ( $p < 0,01$ ). Высокий плазменный уровень IL-6 в острой стадии инсульта является предиктором неблагоприятного функционального исхода у пациентов относительно старшей возрастной группы.

---

## GENETIC CHANGES INDUCED BY THE PESTICIDE RIDOMOL IN THE SOYBEANS SPROUTED FROM THE SEEDS OF DIFFERENT AGES

Baratashvili<sup>1</sup> N., Chitanava<sup>2</sup> G., Menabde<sup>1</sup> M.

<sup>1</sup>*Iv. Javakhishvili Tbilisi State University;* <sup>2</sup>*Shota Rustaveli Batumi State University*

To reveal the aging-causing factors is a question at issue. The process of aging differently advances not only in various species but in individual representatives of the same species as well. The life processes critical for organisms gradually weaken with biological aging followed by decrease in activity of the organism [5,12].

In contrast to animals, plants don't clearly exhibit the process of aging. Flowering plants much differ by their lifespan not having common mechanisms of aging. Aging rates are specific for every species due to the difference in reasons. It is stated, that during aging chromosomes undergo heterochromatinization resulting in inactivation of normal expression of genes [6,12].

This process is influenced by some physical and chemical agents. Xenobiotics differently affect particular stages of individual development inducing increase or decrease of the process.

An objective of presented study was to investigate the effect of the genetically active xenobiotics Ridomil on the genetic apparatus of the plants sprouted from

the soybean seeds of different ages. The experiments were conducted on the soybean (*Glycine max*) genetic line L65-1237 made by the American scientists B. Vig and E. Podok and described in our early publications [1].

The studies were performed on the 1-, 2- or 3- year old seeds of the heterozygous  $Y_{11}y_{11}$  plants ( $Y_{11}$  allele is semidominant and controls the chlorophyll synthesis).

The seeds of different ages were exposed to the pesticide Ridomil diluted in distilled water in different concentrations – 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% and 0.1%. 100 air-dried seeds were treated with the relevant concentration of the agent for 24 hrs, rinsed in running water for 4 hrs and seeded in wooden boxes following the accepted rules.

Three phenotype classes – green ( $Y_{11}Y_{11}$ ), light-green (lettus-like color;  $Y_{11}y_{11}$ ) and yellow ( $y_{11}y_{11}$ ) in proportion 1:2:1.

The heterozygous light-green sprouts were selected for analysis as they are suitable to register any

somatic genetic alteration. Induced Spots on the surfaces of first two simple and the third complex leaves were studied under the microscope (MBC-1, magnification 2X10). The results obtained were analyzed statistically [8].

The systemic pesticide Ridomil ( $C_{15}H_{21}NO_4$ ; N – (2,2-dimethylphenole) –N-(2-methylxiacethyl) alanine methyl ether) is used as an agent against fungal diseases in the vine, tobaccos, tomatoes, and other vegetables. Genetic changes induced by Ridomil are

shown in table 1. In the light-green sproutes developed from 1-year-old seeds ( $Y_{11}y_{11}$ ) both the direct mutations (yellow spots) and the reversions (green spots) were induced. The spots reflect genetic changes (such as point mutations, deletions and chromosome non-disjunctions) in somatic cells. The higher concentrations of Ridomil induced high rates of yellow-spots. Dose-dependent phenomenon was observed. Such a relationship was not seen with the induction of the green spots. The spontaneous background was rather low and didn't exceed 0.22.

Table 1. Ridomili induced genetic changes in the plants sprouted from 1-year-old seeds

Concentration of the preparation %	Number of leaves analyzed.	Total number of spots	Number of spots per leaf			
			yellow	green	double	total
0.02	105	96	0.58±0.009	0.33±0.03	0	0.91±0.02
0.04	90	93	0.64±0.06	0.39±0.05	0	1.03±0.02
0.06	95	104	0.70±0.08	0.39±0.02	0	1.09±0.03
0.08	80	88	0.71±0.07	0.40±0.06	0	1.10±0.02
0.1	85	96	0.83±0.11	0.38±0.02	0	1.13±0.03
control	120	26	0.12±0.02	0.10±0.01	0	0.22±0.07

Increase in spontaneous mutation rate was observed with aging (tables 2 and 3). In the plants developed

from 2-year-old seed it equaled 0.39 but in those sprouted from 3-year-old seeds – 0.69.

Table 2. Ridomili induced genetic changes in the plants sprouted from 2-year-old seeds

Concentration of the preparation %	Number of leaves analyzed.	Total number of spots	Number of spots per leaf			
			yellow	green	double	total
0.02	72	72	0.65±0.07	0.35±0.09	0	1.00±0.08
0.04	87	88	0.71±0.02	0.30±0.06	0	1.01±0.02
0.06	93	99	0.79±0.03	0.27±0.02	0.03±0.02	1.06±0.03
0.08	86	106	0.81±0.05	0.39±0.03	0.05±0.01	1.23±0.04
0.1	88	117	0.86±0.05	0.41±0.06	0	1.32±0.06
control	109	43	0.22±0.04	0.17±0.05	0	0.39±0.07

Table 3. Ridomili induced genetic changes in the plants sprouted from 3-year-old seeds

Concentration of the preparation %	Number of leaves analyzed.	Total number of spots	Number of spots per leaf			
			yellow	green	double	total
0.02	98	114	0.71±0.09	0.36±0.06	0.09±0.01	1.16±0.09
0.04	92	133	0.87±0.03	0.42±0.04	0.15±0.08	1.44±0.07
0.06	95	156	0.80±0.09	0.60±0.07	0.23±0.04	1.64±0.11
0.08	86	194	1.08±0.06	0.86±0.09	0.31±0.03	2.25±0.13
0.1	88	211	1.12±0.09	0.90±0.08	0.38±0.07	2.40±0.22
control	106	80	0.35±0.05	0.28±0.05	0.06±0.03	0.69±0.09

Enhancement of yellow and green spot induction was registered for the plants developed from 2- and

3-year-old seeds (tables 2 and 3). In the case of yellow spots “dose-effect” phenomenon was observed.



The reverse frequencies for 2-year-old seeds did not differ from those for 1-year old ones. The high doses of the preparation induced few numbers of complex (with half-yellow and half-green) spots. It should be referred to mitotic crossingover.

All the concentrations of the substance caused mitotic crossingovers in the plants sprouted from the 3-year-old seeds (table 3). The higher doses of Ridomil (0.06-0.1%) here caused induction of reversions much more frequently than in the case of 1- and 2-year-old seeds. The tendency to the dose-dependant effect was also observed.

Embryonic cells of 3-year-old seeds were found to be highly sensitive. The levels of direct mutations were rather common there.

There are some data [3,9] concerning the reactions of seeds of different ages caused by physical factors. Age-dependent increase in spontaneous and induced by chemical mutagens levels of aberrations was described in the Crepis [6].

Growing and development processes have been studied in plants sprouted from the seeds of different ages in the soybean test-system. Significant inhibition of the processes was revealed [7]. Using the same test-system, the effect of the ionizing radiation and chemicals on the sprouts from 1-year-old seeds was also studied. The obtained results indicated significantly higher induction of direct mutations and reversion than that observed in our investigations [2,4,11].

## REFERENCES

1. Baratashvili N. A. Studies on Genetic Activity of Some Chemicals used in Vinehausing of Georgia. Thesis of Dissert. for Cand. Degree. Tbilisi: 1997.
2. Davronov I.D., Zakharov I.A. Induction of Mitotic Crossingover and Somatic Mutations in Soybeans by Neutrons in Comparison with  $\gamma$ -radiation. Genetics 1985; vol. XXI (11): 1864-1868.
3. Dubinin N.P. Radiation and Chemical Mutagenesis. Selected works "Nauka": 2000; , vol. 2.
4. Evans D.A., Paddock E.F. Characterization of x-ray induced increase of mitotic crossingovers in Glycine max. Theor. Appl. Genetic. 1980; 56: 256-253.
5. Hayflick L. Biological aging is no longer unsolved problem. Annals of New York academy of sciences 2007; 1100: 1-13.
6. Jokhadze T.A. Influence of Metal Ions on the Rate

of Spontaneous and Induced Chromosome Aberrations at different Functional States of Cells. Thesis of dissert for cand. Degree. Tbilisi: 1999.

7. Kadagishvili E., Doborjginindze T., Shatirishvili A., Baratashvili N., Chitanava Zh. The Effect of Pesticide B-Cyfluthrin (Buldok) on Growth of Soybean (Glycine max) Seedlings of different genotypes. Bull of Georgian National Academy of Sciences 2006; 2: 319-321.
8. Plokhinski I.A. Biometry. Moscow State University, 1970.
9. Valeva S.A. Modern problms in radiation Genetics. Moscow: Autoizdat 1969.
10. Vig B.K. Paddock E.F. Studies in the Expression of Somatic Crossing-over in Glycine max. (L) Theor. Appl. Genet. 1970; 40: 316-321.
11. Vig B.K. Somatic crossing-over in Glycine max (L) Merrill differential response to  $^3\text{H}$ -emided B-particlos and  $\text{Co}^{60}$  emitted Y-rays. Badiat. Batony 1974; 14: 127-137.
12. Zhmylev P.U. Evolution of plant lifespan, facts and hypotheses. General Biology Magazine 2006; 67 (2): 107-109.

## SUMMARY

### GENETIC CHANGES INDUCED BY THE PESTICIDE RIDOMOL IN THE SOYBEANS SPROUTED FROM THE SEEDS OF DIFFERENT AGES

Baratashvili<sup>1</sup> N., Chitanava<sup>2</sup> G., Menabde<sup>1</sup> M.

<sup>1</sup>Iv. Javakhishvili Tbilisi State University; <sup>2</sup>Shota Rustaveli Batumi State University

An objective of presented study was to investigate the effect of the genetically active xenobiotics Ridomili on the genetic apparatus of the plants sprouted from the soybean seeds of different ages. The experiments were conducted on the soybean (Glycine max) genetic line L65-1237. The studies were performed on the 1-, 2- or 3- year old seeds of the heterozygous  $Y_{11}y_{11}$  plants.

The seeds of different ages were exposed to the pesticide Ridomili diluted in distilled water in different concentrations – 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% and 0.1%.

Three phenotype classes – green ( $Y_{11}Y_{11}$ ), light-green ( $Y_{11}y_{11}$ ) and yellow ( $y_{11}y_{11}$ ) in proportion 1:2:1. All the concentrations of the substance caused mitotic crossingovers in the plants sprouted from the 3-year-

old seeds. The higher doses of Ridomil (0.06-0.1%) caused induction of reversions much more frequently than in the case of 1- and 2-year-old seeds. The tendency to the dose-dependant effect was also observed. Embryonic cells of 3-year-old seeds were found to be highly sensitive. The levels of direct mutations were rather common there.

**Key words:** soybean, pesticide Ridomil, mutation.

## РЕЗЮМЕ

### ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ СОИ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СЕМЯН РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПЕСТИЦИДА РИДОМИЛА

Бараташвили<sup>1</sup> Н.А., Читанова<sup>2</sup> Ж.В., Менабде<sup>1</sup> М.В.

<sup>1</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили; <sup>2</sup>Батумский государственный университет им. Ш. Руставели

Целью настоящего исследования явилось определение влияния генетически активного пестицида

ридомила на генетический аппарат ростков соевых бобов различного возраста.

Эксперимент проводили на соевых бобах (*Glycine max*) генетической линии L65-1237. Семена различного возраста (одно-, двух- и трехлетние) гетерозиготных (генотип Y<sub>11</sub>у<sub>11</sub>) растений обрабатывались различными концентрациями (0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08% и 0,1%) препарата ридомила. Регистрировались как различные мутации, так и частота митотического кроссинговера, индуцированные ридомилом.

У растений, полученных из однолетних семян, индукция прямых мутаций наблюдалась с большей частотой, чем реверсии. При этом фиксировался феномен доза-эффект. У растений, полученных из двух- и трехлетних семян, зафиксировано увеличение частоты как спонтанных, так и индуцированных мутаций. Индукция митотического кроссинговера наблюдалась у растений полученных из выдержанных (двух- и трехлетних) семян, при высоких концентрациях препарата.

---

## RAS PROTEINS, NITROSYLATION AND HOMOCYSTEINE METABOLISM

Mikeladze<sup>1,2</sup> D., Zhuravliova<sup>1</sup> E., Barbakadze<sup>1</sup> T.

<sup>1</sup>I. Beritashvili Institute of Physiology, Tbilisi; <sup>2</sup>I. Javakhishvili Tbilisi State University

Ras proteins have essential roles in controlling several crucial signaling pathways that regulate normal cell proliferation, differentiation and survival. Mutations in *ras* gene have been identified in approximately 30% of all human cancers, making this G protein an important target for the development of anticancer drugs. Oncogenic mutations of *ras* reduce the intrinsic GTPase activity and, more importantly, completely abolish the GAP-induced GTPase activation [1]. Thus, unlike normal Ras, oncogenic Ras mutant proteins remain constitutively in the active GTP-bound form

and continuously activate the downstream effectors. Moreover, extensive data indicate that bypassing the normal control mechanisms oncogenic H-Ras, initiate signal transduction cascades leading to the activation of specific transcription factors and playing contributory roles in promoting Ras-induced oncogenic transformation. [2,3,5].

Ras proteins are synthesized in the cytosol on free polysomes and secondarily associate with endo- and plasmic membranes after posttranslational modifica-

tions. Ras may undergo at least three lipid post-translational modifications prior to correct localization, including farnesylation, methylation, and palmitoylation. Most of these modifications occur at the Ras C terminus, which has a consensus CAAX motif (C is cysteine; A is aliphatic and X is any amino acid). This sequence is necessary for incorporation of protein into inner surface of membranes and important for proper biological functions of Ras. Enzymatic farnesylation of Ras is the initial step in a series of posttranslational modifications and catalyzed by the farnesyltransferase (FTase), which transfers a farnesyl moiety from farnesyl diphosphate to the cysteine residue (Cys-186) of the CAAX motif. After farnesylation, Ras undergo subsequent biochemical processes involving proteolytic cleavage of the AAX peptide, carboxymethylation of the farnesylated cysteine residue, and lastly in the case of H-Ras, N-Ras, cysteine residues just upstream from the CAAX motif (Cys-181 or Cys-184) become palmitoylated. In contrast to farnesylation, palmitoylation is reversible. Palmitoylation of Cys-181 is required for efficient trafficking of H-Ras to the plasma membrane, whereas palmitoylation of Cys-184 supports correct GTP-regulated lateral segregation of H-Ras between cholesterol-dependent and cholesterol-independent microdomains. Besides lipid modifications, C-terminal cysteine residues of Ras are potential sites for regulatory nitrosylation reactions. Nitrosylation of these cysteine residues could be important, since oxidation of Cys-186, Cys-184 and Cys-181 would prevent membrane attachment of Ras or change the rate of palmitate turnover. Thus, the competition between these post-translational modifications for surface exposed cysteines of proteins may be important for correct signal transduction in both normal and cancer cells.

Hyperhomocysteinemia is recognized as a major risk factor for atherosclerotic and thromboembolic disease as well as for cognitive impairment, including that seen in Alzheimer's disease. Hyperhomocysteinemia is a common phenomenon among elderly people and homocysteine-lowering strategy may prevent or slow the development of these age-related problems. Homocysteine is a sulfur-containing, nonproteinogenic, neurotoxic amino acid biosynthesized during methyl cycles after demethylation of S-adenosylmethionine (SAM) to adenosylhomocysteine (SAH) and sub-

sequent hydrolysis of SAH into homocysteine and adenosine. Enhanced intracellular concentrations of SAH may result in product inhibition of SAM-dependent methyltransferases [4] and increased intracellular ratio of SAH/SAM favors inhibition of methylation. Formed homocysteine is either catabolized into cystathionine (transsulfuration pathway) by cystathionine  $\beta$ -synthase, a vitamin B6-dependent enzyme or remethylated into methionine (remethylation pathway) by methionine synthase, which uses N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolate as the methyl donor and cobalamin as the cofactor. Cystathionine then converted into cysteine, a precursor of glutathione, which is the main antioxidant compound of cells. It has been found that methionine synthase is inactivated by oxidation and requires reductive methylation for reactivity, while cystathionine beta-synthase is a heme protein and active in the oxidized form [6]. These data suggest, that oxidative stress can reduces remethylation and enhances transsulfuration to maintain, via an adaptive process, the intracellular glutathione pool, which would be essential for the redox-regulating capacity of cells.

PC12 pheochromocytoma cells expressing a dominant inhibitory mutant of Ha-*ras* (M-M17-26) and PC12 cells transfected with normal *c-rasH* (M-CR3B) has been used to investigate the role of nitrosylation and farnesylation of Ras on the production of homocysteine and the activities of the redox-sensitive transcription factors NF- $\kappa$ B and c-Fos. We found that under serum and nerve growth factor withdrawal conditions undifferentiated apoptotic M-CR3B cells accumulated more homocysteine, than M-M17-26 cells and the production of homocysteine decreased under the action of manumycin (inhibitor of farnesyltransferase) and increased in the presence of L-NAME (inhibitor of nitric oxide synthase). Furthermore, we have shown that manumycin increased the activity of c-Fos in the M-CR3B cells and decreased the activity of NF- $\kappa$ B, while L-NAME reduced the activities of both transcription factors, and accelerated apoptosis of M-CR3B cells. In contrast to the M-CR3B cells, in M-M17-26 cells manumycin did not change the activity of c-Fos, or the activity of NF- $\kappa$ B. These data suggest that trophic factor withdrawal stimulates Ras, which apparently through the Rac/NADPH oxidase system induces permanent oxidative stress, modulates the activities of NF- $\kappa$ B and c-Fos, induces production of homocysteine and

accelerates apoptosis. Nitrosylation of Ras is necessary for maintaining the survival of PC12 cells, while farnesylation of Ras stimulates apoptosis under withdrawal conditions.

Enhanced intracellular concentrations of SAH may result in product inhibition of SAM-dependent methyltransferases [4] and increased intracellular ratio of SAH/SAM favors inhibition of methylation. To demonstrate the specificity of Ras-elicited effects on the activity of methyl cycles, wild-type of pheochromocytoma PC12 cells, PC12 pheochromocytoma cells expressing a mutant *ras* gene (MVR), and M-CR3B cells that had been stably transfected with normal *c-rasH* were incubated with the L-NAME and manumycin. We have found that L-NAME significantly changes the SAM/SAH ratio in both MCR and MVR cells. Moreover, these alterations in methyl cycles have reciprocal character; in the MCR cells, the SAM/SAH ratio was raised, whereas in the MVR cells this ratio was reduced. These alteration results of change of activity of two enzymes: cystathionine  $\beta$ -synthase, which catabolized homocysteine to cystathione and then into glutathione (transsulfuration pathway), and methionine synthase, which remethylated homocysteine into methionine (remethylation pathway). Since intracellular ratio of SAM/SAH indicates the rate of transmethylation, it can be suggest that L-NAME in the MVR cells can reduce remethylation pathway, whereas in the MCR cells L-NAME cause attenuation of transsulfuration. Taking into account, that methionine synthase is inactivated by oxidation and requires reductive methylation for reactivity; while cystathionine beta-synthase is a heme protein and active in the oxidized form, it may be suppose that in MVR cells reduction of remethylation is a result of enhancement of oxidative stress. Thus, oncogenic Ras, in contrast to wild type Ras, induce oxidative stress in PC12 cells.

The results presented here suggest that in conditions of a low level of nitric oxide PC12 cells with mutated oncogenic Ras produce more ROS than cells with wild type Ras. It seems that reduction of constitutional levels of nitric oxide can change palmitate turnover in Ras and increase oncogenic potential. Apparently, the production of ROS by oncogenic Ras is mediated by Rac1/NADPH oxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pathway and gives rise to oxidative conditions. Oxidative stress can reduces remethylation and enhances cystathionine

beta-synthase and transsulfuration to maintain, via an adaptive process, the intracellular glutathione pool, which would be essential for the redox-regulating capacity of cells.

## REFERENCES

1. Adjei A.A. Blocking oncogenic ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer* 2001; 3(14): 1062-1074.
2. Hanson J.L., Hawke N.A., Kashatus D., Baldwin A.S. The nuclear factor  $\kappa$ B subunits *relA*/p65 and *c-rel* potentiate but are not required for ras-induced cellular transformation. *Cancer Res* 2004; 64:7248-7255.
3. Juravleva E., Barbakadze T., Mikeladze D., Kekelidze T. Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glia cells, modulates ras/NF-B signaling, and increases the generation of reactive oxygen species. *J Neurosci Res* 2005; 79:224-230.
4. Perna A.F., Ingrosso D., De Santo N.G., Galletti P., Brunone M., Zappia V. Metabolic consequences of folate-induced reduction of hyperhomocysteinemia in uremia. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8:1899-1905.
5. Pincus M.R., Brandt-Rauf P.W., Michl J., Carty R.P., Friedman F.K. Ras-p21-induced cell transformation: unique signal transduction pathways and implications for the design of new chemotherapeutic agents. *Cancer Invest* 2004; 18:39-50.
6. Taoka S., Ohja S., Shan X., Kruger W.D., Banerjee R. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine  $\beta$ -synthase activity. *J Biol Chem* 1998; 273: 25179-25184.

## SUMMARY

### RAS PROTEINS, NITROSYLATION AND HOMOCYSTEINE METABOLISM

**Mikeladze<sup>1,2</sup> D., Zhuravliova<sup>1</sup> E., Barbakadze<sup>1</sup> T.**

<sup>1</sup>*I. Beritashvili Institute of Physiology, Tbilisi;*

<sup>2</sup>*Iv. Javakishvili Tbilisi State University*

Elevated levels of homocysteine and S-adenosylmethionine are causal risk factors for several neurological disorders. Homocysteine is a sulfur-containing, nonproteinogenic, neurotoxic amino acid biosynthesized during methyl cycles after demethylation

tion of S-adenosylmethionine (SAM) to adenosylhomocysteine (SAH) and subsequent hydrolysis of SAH into homocysteine and adenosine.

PC12 pheochromocytoma cells expressing a dominant inhibitory mutant of Ha-ras (M-M17-26, PC12 pheochromocytoma cells expressing a mutant v-ras gene (MVR) and PC12 cells transfected with normal c-rasH (M-CR3B) has been used to investigate the role of nitrosylation and farnesylation of Ras on the production of homocysteine and the activities of the redox-sensitive transcription factors NF- $\kappa$ B and c-Fos. We found that under serum and nerve growth factor withdrawal conditions undifferentiated apoptotic M-CR3B cells accumulated more homocysteine, than M-M17-26 cells and the production of homocysteine decreased under the action of manumycin (inhibitor of farnesyltransferase) and increased in the presence of L-NAME (inhibitor of nitric oxide synthase). Furthermore, we have shown that manumycin increased the activity of c-Fos in the M-CR3B cells and decreased the activity of NF- $\kappa$ B, while L-NAME reduced the activities of both transcription factors, and accelerated apoptosis of M-CR3B cells. In contrast to the M-CR3B cells, in M-M17-26 cells manumycin did not change the activity of c-Fos or the activity of NF- $\kappa$ B. Moreover, we have shown that L-NAME significantly changes the SAM/SAH ratio in both MCR and MVR cells. Moreover, these alterations have reciprocal character; in the MCR cells, the SAM/SAH ratio was raised, whereas in the MVR cells this ratio was reduced.

We conclude that trophic factor withdrawal stimulates Ras, which apparently through the Rac/NADPH oxidase system induces permanent oxidative stress, modulates the activities of NF- $\kappa$ B and c-Fos, induces production of homocysteine and accelerates apoptosis. Nitrosylation of Ras is necessary for maintaining the survival of PC12 cells, while farnesylation of Ras stimulates apoptosis under withdrawal conditions. Besides, our results suggest that in conditions of a low level of nitric oxide PC12 cells with mutated oncogenic Ras produce more ROS than cells with wild type Ras and switch homocysteine metabolism toward to transsulfuration.

**Key words:** Ras nitrosylation, Ras farnesylation, nitric oxide, homocysteine, redox-sensitive transcription factors, ROS.

## РЕЗЮМЕ

### РАС БЕЛКИ, НИТРОЗИЛИРОВАНИЕ И МЕТАБОЛИЗМ ГОМОЦИСТЕИНА

Микеладзе<sup>1,2</sup> Д.Г., Журавлева<sup>1</sup> Е.Ю., Барбакадзе<sup>1</sup> Т.Т.

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И. Берташвили, Тбилиси; <sup>2</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили

Повышенный уровень гомоцистеина и S-аденозилметионина является риск-фактором неврологических заболеваний. Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, которая является продуктом переработки в организме так называемой незаменимой аминокислоты метионина во время метилового цикла. В результате деметилирования S-аденозилметионина (SAM) в S-аденозилгомоцистеин (SAH) и последующего гидролиза SAH образуется гомоцистеин и аденозин. Для исследования роли нитрозилированного и фарнезилированного Ras-белка в образовании гомоцистеина и в редоксчувствительности транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и c-Fos при условиях дефицита трофических факторов, были использованы 3 вида PC12 клеточной культуры феохромоцитомы: первая культура PC12, содержащая доминантнегативный мутантный Ha-ras ген (M-M17-26); вторая, содержащая мутантный v-ras ген (MVR) и третья, содержащая нормальный c-rasH ген (M-CR3B). В результате экспериментов обнаружилось, что дефицит трофических факторов стимулирует Ras-белок, который через Rac/NADPH оксидазную систему вызывает перманентный оксидативный стресс, изменяя активность NF- $\kappa$ B и c-Fos транскрипционных факторов, побуждает образование гомоцистеина и ускоряет апоптоз. Нитрозилирование Ras-белка необходимо для жизнеспособности PC12 клеток, когда фарнезилирование Ras-белка стимулирует апоптоз в условиях дефицита трофических факторов. Более того, полученные результаты доказывают, что в условиях низкого уровня оксида азота в клеточной культуре феохромоцитомы PC12, содержащей мутантный v-ras ген (MVR), образуется больше ROS, чем в клетках содержащих нормальный Ras, при этом метаболизм гомоцистеина переключается на транссульфирование.

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА ШТАММЫ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VAR *VINI*) РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Шатиришвили<sup>1</sup> А.Ф., Мачавариани<sup>2</sup> Н.А., Менабде<sup>2</sup> М.В.

<sup>1</sup>Тбилисский государственный университет им. И. Чавчавадзе;

<sup>2</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили

За последние годы ведутся интенсивные исследования по проблеме механизмов старения. В научной литературе широко рассматриваются множество различных теорий, объясняющих причины старения [5,7], свойственного как одноклеточным, так и многоклеточным организмам. Процессы старения, протекающие в одноклеточных организмах, соответствуют старению в многоклеточных организмах [5-7]. Для изучения старения одноклеточных организмов одним из наилучших модельных объектов является дрожжевой грибок (*Saccharomyces cerevisiae*), так как он является генетически самым полноценно изученным эукариотическим организмом [2,3].

У дрожжевых грибов обнаружены репликационные и хронологические формы старения. Выявлены и изучены гены, контролирующие эти процессы [6,8].

При репликационном старении материнская клетка, которая, обычно, может в среднем 25 раз почковаться, после каждого такого акта постепенно стареет. Каждый последующий клеточный цикл в клетке замедляется, а затем прекращается.

Возраст в данном случае определяется по числу делений, через которые прошла клетка, а не календарным временем. Типовая средняя продолжительность жизни дрожжей дикого типа составляет около 25-и поколений [6-8].

В определенных внешних условиях стационарная фаза роста дрожжей увеличивается и начинает действовать хронологический процесс старения, в результате чего клетки деградируют и теряют способность к жизни. Во время старения обеих форм происходит не обновление клеточных структур, а наоборот - имеет место постепенное разрушение генетической программы, что вызывает постепенную деградацию клетки и ее смерть [5-8].

Целью настоящего исследования явилось вызвать хронологическое старение штаммов винных дрожжей, выделенных из природных популяций и изучить резистентность клеток разного возраста к ионам меди.

**Материал и методы.** Выделение штаммов из природных популяций, их инкубация и определение видового статуса происходило стандартными методами [2,4,9]. В опытах использовали 25 штаммов винных дрожжей, выделенных из популяции «Цоликаури» села Свири (Западная Грузия, Имерети). Штаммы репликатором переносили на обыкновенную (контрольный вариант) и содержащую 1-7 мМ сульфата меди полную солевую среду. Штаммы хранились при температуре +20°C. После 10, 20 и 30-и дней определяли способность резистентности к ионам меди. Мы исключили из питательной среды соли магния, так как известно, что ионы магния увеличивают резистентность к ионам металлов [1]. Учет живых и мертвых клеток производили с помощью камеры Горяева. Для идентификации мертвых клеток использовали метиленовую синь, посредством которой темным цветом окрашиваются только мертвые клетки.

**Результаты и их обсуждение.** На рисунке 1 показана зависимость штаммов разного возраста от ионов меди. Молодые культуры штаммов (5-дневные культуры, развитые на среде, можно считать завершившими рост молодыми вариантами) проявляли разную резистентность к ионам меди. Подавляющей дозой посчитали ту дозу ионов меди, которая по сравнению с контрольной (среда не содержала ионов меди) вызывает ингибирование роста культуры частично или полностью. Изученные штаммы условно можно разделить на три морфа: «чувствительные» (развитие происходит на 1-2мМ среде, к ним относятся 6 штаммов), «средние» (развиваются на 3-4 мМ среде - 17 штаммов), «стойкие» (развиваются на 5мМ среде - 3 штамма).

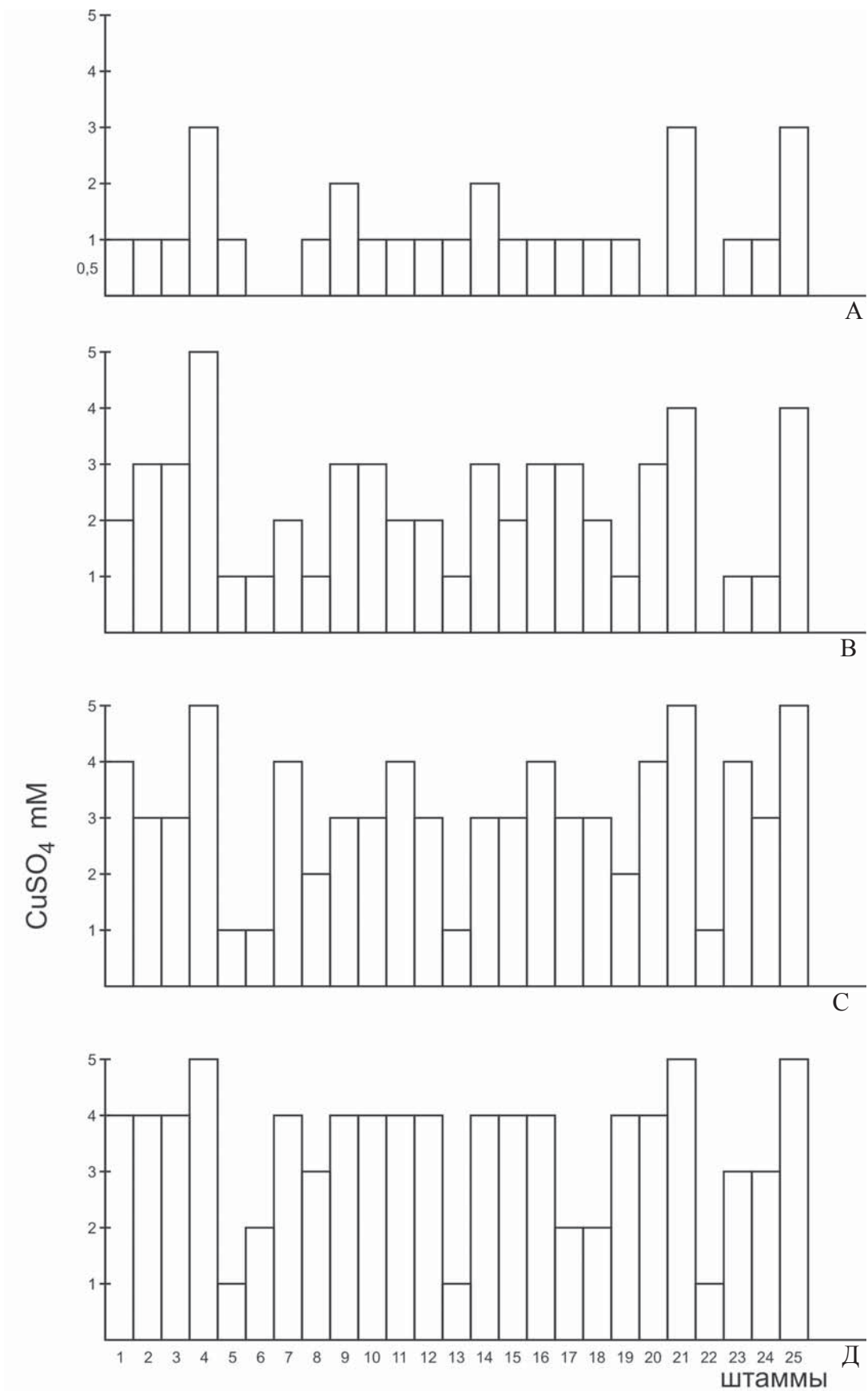


Рис. 1. Резистентность разновозрастных штаммов к сульфату меди:  
А - 5-дневные; В - 10-дневные; С - 20-дневные; Д - 30-дневные

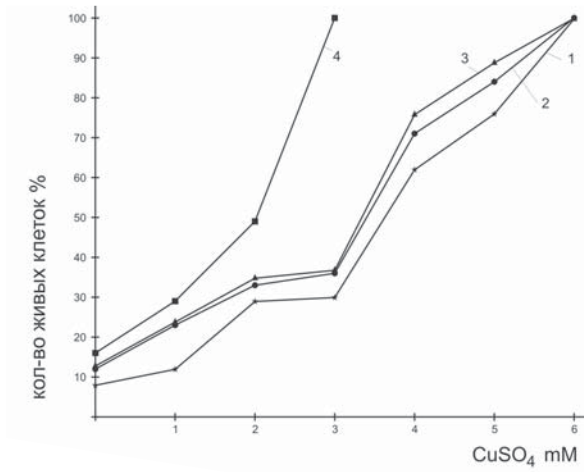


Рис. 2. Резистентность к сульфату меди штамма №4 (разных возрастов) «устойчивой» морфы 1 - 5-дневного; 2 - 10-дневного; 3 - 20-дневного; 4 - 30-дневного

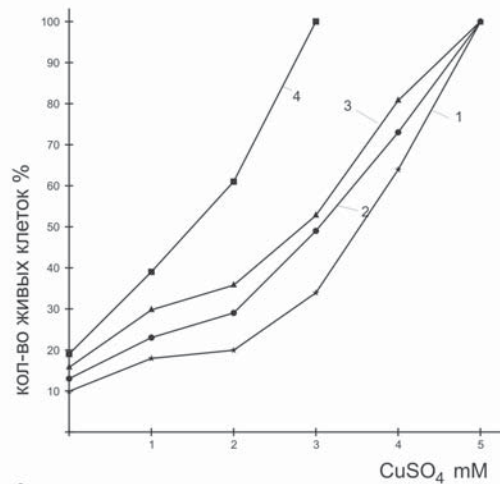


Рис. 3. Резистентность к сульфату меди штамма №1 (разных возрастов) «средней» морфы 1 - 5-дневного; 2 - 10-дневного; 3 - 20-дневного; 4 - 30-дневного

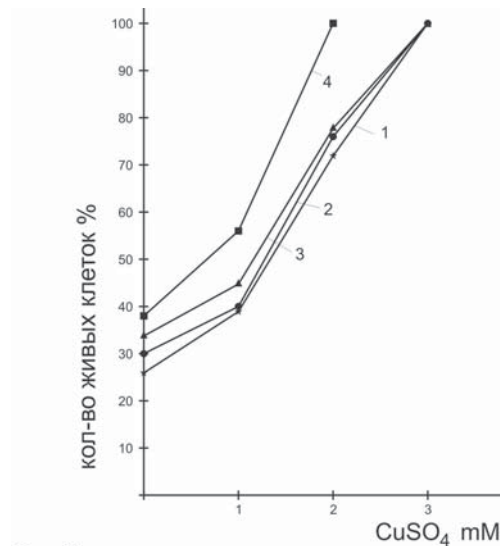


Рис. 4. Резистентность к сульфату меди штамма №13 (разных возрастов) «чувствительной» морфы 1 - 5-дневного; 2 - 10-дневного; 3 - 20-дневного; 4 - 30-дневного



По резистентности к ионам меди популяция полиморфна, что обусловлено генетической гетерогенностью. Сходный феномен описан в наших ранних публикациях [9].

С прибавлением возраста (10-, 20-дневные культуры) «чувствительные» и «стойкие» штаммы сохраняют характерную для них стойкость к ионам меди, что касается «среднего» морфа, в нем была обнаружена вариабельность. В старых (30-дневные) культурах явно проявляется сильное ингибирующее действие ионов меди. В отличие от других морфов, резистентную способность сохранила «стойкая» морфа. По нашему мнению, такая реакция - результат гетерогенности штаммов. В различных генотипах с прибавлением возраста по-разному происходит деградация генотипической информации. Резистентную способность к ионам меди сохранили только те штаммы, генетический аппарат которых имеет способность к сохранению стабильности.

Мы изучали частоту жизнеспособных клеток, штаммов, развитых на контрольной и содержащей ионы меди средах. В штаммах определяли количество живых и мертвых клеток. Для примера мы представили результаты только одного штамма из трех изученных морфов (рис. 2,3,4). Входящий в состав морфа «чувствительный» штамм М13 содержит мертвые клетки довольно большой частоты (26%). В двух №1 и №4 штаммах тот же показатель довольно низкий и они почти не отличаются друг от друга. С увеличением возраста и концентрации сульфата меди в питательной среде понижается частота жизнеспособных клеток. По сравнению с молодыми культурами (5-дневные культуры) у 10- и 20-дневных культур заметно понижена резистентность. Дальнейшее увеличение возраста (30-дневная культура) до того понижает жизнестойкость, что катастрофически уменьшается резистентная способность клеток.

Винные дрожжи в природе существуют в виде отдельных клеток, способность флокуляции (образование агрегатов) у них отсутствует. Этот признак контролируется генетическим аппаратом и зависит от структуры клеточной стенки [4]. В старых (20- и 30-дневных) штаммах имела место флокуляция. В агрегатах клеток довольно легко происходит аменсализм, вследствие чего клетке

легче противостоять стрессовому воздействию химического агента. Флокуляция оказалась зависима от возраста. Это, так сказать, стратегия выживания при воздействии стрессовых факторов.

Таким образом, изученная нами популяция винных дрожжей оказалась полиморфной к долголетию.

Штаммы отличаются и по скорости хронологического старения, что обусловлено различной генетической структурой.

Многие авторы изучали влияние различных физических и химических факторов на клетки в разных фазах роста, в которых спонтанные и индуцированные мутации происходят с различной частотой [1]. Выявлены и изучены гены, которые регулируют процесс хронологического старения; показано, что чрезмерная экспрессия RAS2 увеличивает продолжительность жизни дрожжей. Некоторое количество других генов регулирует старение, увеличивая сопротивление окислительному стрессу [6,8].

Таким образом, проведенные нами исследования позволяют заключить, что изученная популяция винных дрожжей оказалась полиморфной к долголетию. Штаммы отличаются друг от друга по скорости хронологического старения. Это обусловлено их различной генетической структурой.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров И.А., Ковальцова С.В., Кожина Т.Н., Федорова И.В., Яровой Б.Ф. Мутационный процесс у грибов. Л:1980.
2. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей - сахаромисетов. Л: 1984.
3. Инге-Вечтамов С.Г., Карпова Т.С. Частная генетика дрожжей сахаромисетов. СПб: 1993.
4. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи, пути использования. Киев: 1991.
5. Потепенко А.И., Акифьев А.П. На пути поиска программы и инициального субстрата старения. Российский биомедицинский журнал 2003; 4: 75, 103-107.
6. Bitterman K.J., Medvedik O., Sinclair D.A. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*; linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67: 377-399.
7. Kirkwood T., Understanding the odd science of

aging: Cell 2005; 120: 437-447.

8. Longo V. Chronological aging-indicend apoptosis in yeast. Biochim Biophys Acta 2008; 1783 (7): 1280-1285.

9. Machavariani M., Shatirishvili A., Jorbenadze Ts. Study of Resistance of copper ionnes in local populations of wine yeast. Bull Georgian Acad. Sci. 2006; 174 (2): 322-325.

## SUMMARY

### THE AGE-DEPENDENT EFFECT OF COPPER IONS ON DIFFERENT STRAINS OF THE WINE YEAST (*SACCHATOMYCES CEREVISIAE* VAR *VINI*)

Shatirishvili<sup>1</sup> A., Machavariani<sup>2</sup> N., Menabde<sup>2</sup> M.

<sup>1</sup>I. Chavchavadze Tbilisi State University; <sup>2</sup>Iv. Javakhishvili Tbilisi State University

The chronological ageing of wine yeast strains isolated from natural populations and the resistance of cells of different age to copper ions have been studied. In total, 25 wine yeast strains derived from the “Tsolikauri” population of Svirivillage (Imereti, West Georgia) were tested. The strains were transferred to the standard (control samples) and the copper sulphate-containing complete media and stored at 20°C temperature. 10, 20 and 30 days after setting up the cultures their resistance to copper ions were examined. Methylene blue dye was used for identification of survived cells.

Young strain cultures have revealed different resistance to copper ions. The strains under investigation may be conditionally divided into three morphs, such as: “sensitive” (capable of growing on 1-2mM medium. 6 strains belong to this group), “mild” (grow on 3-4 mM medium – 17 strains and “resistant” (can grow on 5mM medium, includes 3 strains). The population was found to be polymorphic by the resistance to copper ions.

The “sensitive” and “resistant” strains in spite of ageing (10 or 20 days after the onset of culturing)

retain their resistance to copper ions, while the “mild” morphs exhibited some degree of variability. In the “aged” (30-day long) cultures strong inhibitory activity of copper ions was apparently observed. In contrast to the others, the resistance was sustained in the “resistant” morphs.

The frequency of living cells was defined in the strains grown on the control and copper ion-containing substrates. Survived and died cells were counted. The strains belonged to the sensitive morphs contained high number of died cells – 26-30%. The same index was rather low in the other morphs with no difference between them. Further ageing of the cultures (30 days and more) caused so sharp decrease in the liability of the strains, that they completely lose their resistance. Thus, the examined populations of the wine yeast were found to be polymorphic by their lifespan. They differ from each other by the speed of chronological ageing, that should be attributed to their genetic structure.

**Key words:** yeast population, copper resistance, wine yeast, yeast aging.

## РЕЗЮМЕ

### ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА ШТАММЫ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ (*SACCHATOMYCES CEREVISIAE* VAR *VINI*) РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Шатиришвили<sup>1</sup> А.Ф., Мачавариани<sup>2</sup> Н.А., Менабде<sup>2</sup> М.В.

<sup>1</sup>Тбилисский государственный. университет им. И. Чавчавадзе; <sup>2</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили

Изучено хронологическое старение штаммов винных дрожжей, выделенных из природных по-

пуляций и резистентность клеток разного возраста к ионам меди.

В опытах были использованы 25 штаммов винных дрожжей, выделенных из популяции «Цоликаури» села Свири (Западная Грузия, Имерети). Штаммы были перенесены на обыкновенную (контрольный вариант) и содержащую 1мМ-7мМ сульфат меди полную среду. Штаммы хранились при температуре +2°C. Спустя 10, 20 и 30 дней была определена способность резистентности к ионам меди. Для идентификации живых клеток использован краситель метиленовая синь.

Молодые культуры штаммов проявляли разную резистентность к ионам меди. Изученные штаммы условно можно разделить на три морфа: «чувствительные» (развитие происходит на 1-2мМ среде, к ним относятся 6 штаммов), «средние» (развиваются на 3-4 мМ среде - 17 штаммов), «стойкие» (развиваются на 5мМ среде, объединяются 3 штамма). По резистентности к ионам меди популяция - полиморфна.

С прибавлением возраста (10-, 20-дневные культуры) «чувствительные» и «стойкие» штаммы сохраняют характерную для них стойкость к ионам меди, что касается «среднего» морфа, в нем была обнаружена вариабельность. В старых

(30-дневные) культурах явно намечается сильное ингибирующее действие ионов меди. В отличие от других морфов, резистентную способность сохранила «стойкая» морфа.

Изучена частота жизнеспособных клеток в штаммах, развитых на контрольной и содержащей ионы меди средах. Было определено количество живых и мертвых клеток. Штаммы, входящие в состав морфа «чувствительный», содержали мертвые клетки довольно большой частоты (26-30%). В других морфах тот же показатель - довольно низкий и они почти не отличаются друг от друга. С увеличением возраста и концентрации сульфата меди в питательной среде понижается частота жизнеспособных клеток. По сравнению с молодыми культурами, у 10- и 20-дневных культур достаточно понижена резистентность. Дальнейшее увеличение возраста (30-дневная культура) до того понижает жизнестойкость, что катастрофически понижается резистентная способность клеток. Таким образом, изученная популяция винных дрожжей оказалась полиморфной к долголетию. Штаммы отличаются друг от друга по скорости хронологического старения. Это обусловлено их различной генетической структурой.

## ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Воробьева Е.О., Ахвледиани М.В., Эмухвари М.Г., Шарашидзе Н.А., Гзиршвили Л.М.

*Научно-исследовательский институт клинической медицины, Тбилиси*

Доказано, что химиотерапия повышает риск развития тромботических осложнений при распространенном процессе [4,9,10]. Однако, механизм возникновения тромботических осложнений при химиотерапевтическом лечении до настоящего времени не ясен. Известно, что цитотоксические препараты могут приводить к повреждению сосудистой стенки или активации эндотелия, обуславливающих ускорение процессов гемостатических реакций [7,8,10]. Показано, что, как и любое повреждение клетки, попадание в нее через клеточную мембрану химиопрепарата, наряду с нарушением клетки, должно вызывать высвобождение из опухолевых клеток тромбопластических веществ, и, как следствие, тромбогеморрагические осложнения, тем самым резко ухудшая общее состояние больного [3]. Предполагается также, что лечение противоопухолевыми препаратами сопровождается угнетением всех ростков кроветворения, более всего миелопоэза и поступлением в гемоциркуляцию тромбопластиновых и антигепариновых веществ из разрушающихся клеток крови [1,2,11].

Целью данного исследования явилась оценка показателей системы гемостаза у больных раком легкого, получающих химиотерапевтическое лечение.

**Материал и методы.** Под наблюдением находился 61 больной (40 мужчин и 21 женщина) в возрасте от 32 до 75 лет. Диагноз был поставлен на основании данных компьютерной томографии грудной клетки. Обследование проводилось на многослойном компьютерном томографе Somatom Sensation cardiac-16. Химиотерапия назначена 52-м больным раком легкого, признанным неоперабельными и 9-и больным, отказавшимся от хирургического лечения. Показатели системы гемостаза изучались до начала лечения, в процессе лечения (спустя 8-10 дней), и после окончания лечения (спустя 16-20 дней).

Контрольную группу составили 16 больных раком легкого, которым по тем или иным причинам не было проведено химиотерапевтическое лечение.

Им проведено динамическое исследование тех же параметров системы гемостаза в аналогичные сроки. При исследовании учитывалось общее состояние больных, а также влияние проведенного курса цитостатической терапии на общую клиническую картину заболевания.

Курс химиотерапии проводился препаратами циклофосфан, адриабластин, фторурацил, по общепринятой схеме лечения. Сроки лечения составили в среднем 16-20 дней.

Показатели системы гемостаза изучались до начала лечения, в процессе лечения (спустя 8-10 дней) и после окончания лечения (спустя 16-20 дней).

Исследование тромбоцитарно-сосудистого компонента гемостаза проводилось по следующим показателям: количество кровяных пластинок в периферической крови, их функциональное состояние (способность к адгезии по методу Wrigth в модификации Балуды В.П. (1967), и агрегации по методике Howard M.A., в модификации Лычева В.Г. (1975), определение фактора Виллебранда по методике Evans и Osten, в модификации Архипова Б.Ф. (1982) [Цит. по 5].

Плазменный компонент гемостаза изучался по следующим показателям: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), по методу Соен J. (1968); протромбиновое время, представленное в виде INR (International Normalized Ratio), по методике, разработанной Quick A.J. (1935); тромбиновое время по методике Biggs R.M., Macfarlane R.G. (1962). Концентрация фибриногена определялась в плазме по методу Clauss [Цит. по 5].

Все вышеперечисленные тесты были произведены с помощью реактивов немецкой фирмы "Human".

Исследование активности физиологических антикоагулянтов проводилось по показателям активности антитромбина- III (АТ- III) и протеина -С

(ПР-С), методом с хромогенным субстратом с помощью реактивов, выпускаемых фирмой «Ренам» (Россия).

Исследование фибринолитической активности крови проводилось по показателям XIIa – зависимо фибринолиза и определению активности плазминогена с помощью реактивов фирмы «Ренам» (Россия).

Исследование маркеров внутрисосудистого свертывания крови и фибринолиза мы проводили, оценивая растворимые комплексы фибрин-мономеров (РФМК) орто-фенантроменовым тестом по Елыкомову В.А. и Момоту А.П. (1987) [Цит. по 5], используя реактивы фирмы «Технология-стандарт» (Россия), и продукты деградации фибрина (ПДФ) – Д-димеры, с помощью набора реактивов фирмы “Diagnostica Stago” (Roshe).

Все лабораторные исследования, основанные на клоттинговых методах, выполнялись на механическом коагулометре “Start-4” фирмы “Diagnostica

Stago” (Франция) с использованием контрольной плазмы, выпускаемой фирмой “Human” (Германия). Статистическая обработка полученных данных производилась с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверность различий подсчитывалась с точностью до 0,001. При этом достоверными считались различия при значении  $p < 0,05$ . Все результаты исследования представлены как  $M \pm m$ .

**Результаты и их обсуждение.** Со стороны тромбоцитарно-сосудистого гемостаза наблюдались выраженные изменения. Так, если среднее количество тромбоцитов до проведения лечения составляло  $308 \pm 31,44 \times 10^9$ , то уже к середине лечения наблюдалось существенное падение числа тромбоцитов до  $199 \pm 13,13 \times 10^9$ , что на 35,39% ниже, по сравнению с группой контроля ( $263,96 \pm 17,52 \times 10^9$ ).

К концу лечения эта разница увеличилась на 52,27%; среднее значение тромбоцитов составило к концу лечения  $147 \pm 10,66 \times 10^9$ .

Таблица 1. Тромбоцитарно-сосудистый гемостаз у больных раком легкого во время химиотерапевтического лечения

Больные раком легкого, получающие химиотерапевтическое лечение			Количество тромбоцитов	Адгезия	Агрегация		Фактор Виллебранда
					СИАТ (АДФ)	СИАТ (Ристоц)	
III стадия n=17	8-10 сутки	M±m	223±13,91	37±1,95	100±1,74	89±2,22	301±18,56
		p	>0,95	>0,9	<0,05	>0,8	<0,002
	15-20 сутки	M±m	194±14,35	41±2,00	92±1,53	71±4,53	319±19,35
		p	<0,05	<0,05	>0,7	<0,05	<0,001
	До лечения	M±m	318±14,62	40±1,96	94±2,12	85±2,25	204±12,81
		p	>0,95	<0,05	>0,7	>0,9	<0,05
IV стадия n=14	8-10 сутки	M±m	199±13,13	48±4,91	97±2,94	92±2,68	307±24,62
		p	<0,05	<0,05	<0,05	>0,8	<0,002
	15-20 сутки	M±m	147±10,66	47±4,16	79±3,96	80±4,90	332±22,65
		p	<0,05	<0,05	>0,9	>0,95	<0,001
	До лечения	M±m	308±31,44	52±5,52	84±4,25	87±3,07	217±30,38
		p	>0,95	<0,05	>0,8	>0,9	<0,05

Адгезивная активность тромбоцитов была ниже на 7,69%, по сравнению с контрольной группой к середине лечения ( $61,82 \pm 33,43$ ), а к концу лечения среднее значение составило  $47 \pm 4,16\%$ , что на 9,62% ниже, по сравнению с контрольной группой ( $52,04 \pm 7,32$ ). Агрегационная активность

тромбоцитов также претерпевала существенные изменения. Так, суммирующий индекс агрегации тромбоцитов (СИАТ), АДФ-индуцированный к 10-му дню химиотерапевтического лечения, был на 15,48% выше, по сравнению с группой контроля ( $77,9 \pm 8,32$ ), а к концу – среднее значение СИАТ

АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов составил  $79 \pm 3,96\%$ , что на  $5,95\%$  выше, чем в контрольной группе ( $83,59 \pm 0,34$ ). Аналогичные изменения были получены нами при изучении ристоцетин-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Показано, что проведение курса цитостатической терапии ведет к развитию тромботических осложнений, которые авторы связывают с резким повышением содержания фактора Виллебранда (фВ) в плазме крови вследствие повреждения эндотелиальных клеток использованными препаратами [3]. Таким образом, повышенный уровень фВ расценивается как фактор риска развития тромботических осложнений.

При исследовании плазмы крови у больных раком легкого, получавших лечение цитоста-

тическими препаратами, были установлены значительные различия в уровне фВ. В целом, у больных обеих групп он существенно превышал таковой в плазме крови здоровых лиц (среднее значение фВ у больных, проходивших химиотерапевтическое лечение, составило  $217 \pm 30,38\%$ ). К 10-му дню химиотерапевтического лечения эта цифра достоверно увеличилась на  $41,47\%$ , а к концу курса (на 20-ый день) произошло значительное увеличение уровня фВ до  $332 \pm 22,65\%$ , что на  $53\%$  выше, чем в группе контроля ( $216 \pm 7,52\%$ ).

Из таблицы 2 следует, что у наблюдаемых нами больных, получавших лечение цитостатическими препаратами, изменения АЧТВ, протромбинового времени INR, тромбинового времени и уровня фибриногена, по сравнению с контрольной группой, не были достоверными.

Таблица 2. Плазменный гемостаз у больных раком легкого во время химиотерапевтического лечения

Больные раком легкого, получающие химиотерапевтическое лечение			АЧТВ	Протромбин		Тромбиновое время	Концентрация фибриногена
				Время	INR		
III стадия n=17	8-10 сутки	M±m	$27 \pm 0,90$	$14,0 \pm 0,185$	$1,08 \pm 0,0185$	$16 \pm 0,33$	$6,23 \pm 0,3773$
		p	>0,95	>0,95	>0,95	>0,95	<0,05
	15-20 сутки	M±m	$28 \pm 1,15$	$13,9 \pm 0,172$	$1,07 \pm 0,0211$	$15 \pm 0,45$	$5,89 \pm 0,3684$
		p	>0,95	>0,95	>0,95	>0,95	<0,05
	До лечения	M±m	$29 \pm 0,99$	$13,8 \pm 0,208$	$1,06 \pm 0,0246$	$17 \pm 0,46$	$5,59 \pm 0,4128$
		p	>0,95	>0,95	>0,95	>0,95	<0,05
IV стадия n=14	8-10 сутки	M±m	$28 \pm 1,15$	$13,7 \pm 0,133$	$1,08 \pm 0,0238$	$16 \pm 0,66$	$6,07 \pm 0,3561$
		p	>0,95	>0,95	>0,95	>0,95	<0,05
	15-20 сутки	M±m	$29 \pm 1,89$	$13,9 \pm 0,182$	$1,07 \pm 0,0293$	$17 \pm 0,77$	$5,46 \pm 0,2941$
		p	>0,95	>0,95	>0,95	>0,95	<0,05
	До лечения	M±m	$29 \pm 1,67$	$13,5 \pm 0,114$	$1,04 \pm 0,0233$	$16 \pm 0,42$	$5,79 \pm 0,3928$
		p	>0,95	>0,95	>0,95	>0,95	<0,05

Доказано, что применение химиотерапевтических средств вызывает дефицит физиологических антикоагулянтов [2,8,9]. В своей работе, изучая влияние цитостатических препаратов на антикоагулянтную активность АТ-III и ПР-С, мы получили следующие результаты: у больных I и II групп уровень АТ-III был соответственно на  $22,92\%$  и  $20,21\%$  ниже нормальных показателей. К 10-му дню ле-

чения уровень АТ-III понизился на  $6,76\%$  по сравнению с группой контроля -  $85,56 \pm 1,23$ , а к 20-му дню – на  $21,62\%$ .

Аналогичная динамика была получена нами при исследовании уровня ПР-С: к 10-му дню уровень ПР-С понизился на  $12,00\%$ , а к 20-му дню мы наблюдали его достоверное снижение на  $13,33\%$  (таблица 3).

Таблица 3. Физиологические антикоагулянты у больных раком легкого во время химиотерапевтического лечения

Больные раком легкого, получающие химиотерапевтическое лечение			Антитромбин III	Протротенин-с
III стадия n=17	8-10 сутки	M±m	64 ±2,01	70±1,92
		p	<0,05	<0,05
	15-20 сутки	M±m	56±1,81	61±2,44
		p	<0,05	>0,9
	До лечения	M±m	72±1,91	78±1,83
		p	<0,05	>0,95
IV стадия n=14	8-10 сутки	M±m	69±3,34	66±5,26
		p	<0,05	<0,05
	15-20 сутки	M±m	58±2,77	65±6,20
		p	<0,05	<0,05
	До лечения	M±m	74±3,66	75±4,18
		p	<0,05	>0,95

По нашему мнению, снижение уровня естественных антикоагулянтов ПР-С и АТ- III у больных раком легкого можно объяснить токсическим влиянием цитостатических препаратов, а также потреблением их в процессе внутрисосудистого свертывания.

Фибринолитическая активность крови в процессе химиотерапии снижалась к 10-му дню. Наблюдалось угнетение ХIIа- зависимого фибринолиза до 20±2,42 мин, что на 17,65% ниже, чем в группе контроля (24,52±1,52), а к 20-му дню наблюдалось

дальнейшее угнетение ХIIа- зависимого фибринолиза до 22±2,42 мин. (таблица 4).

Активность плазминогена также претерпевала существенные изменения: к 10-му дню наблюдалось падение уровня плазминогена до 65±5,20%, а по окончании курса химиотерапии продолжающееся падение активности плазминогена привело к достоверным отличиям между описываемыми группами - активность плазминогена составила 56±5,10, что на 26,32% ниже, чем в группе контроля (76,02±4,34).

Таблица 4. Фибринолитическая способность у больных раком легкого во время химиотерапевтического лечения

Больные раком легкого, получающие химиотерапевтическое лечение			ХIIа зависимый фибринолиз	Плазминоген
III стадия n=17	8-10 сутки	M±m	15±1,09	72±3,20
		p	<0,05	<0,05
	15-20 сутки	M±m	17±1,36	63±3,28
		p	<0,05	<0,05
	До лечения	M±m	13±1,04	87±3,99
		p	<0,05	<0,05
IV стадия n=14	8-10 сутки	M±m	20±2,42	65±5,20
		p	<0,05	<0,05
	15-20 сутки	M±m	22±2,42	56±5,10
		p	<0,05	<0,05
	До лечения	M±m	17±2,18	76±5,28
		p	<0,05	<0,05

Содержание растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) у больных обеих групп

было повышено на 113,51%, что указывает на внутрисосудистую активацию. К 10-му дню ле-

чения уровень РФМК был повышен на 7,59%, а к окончанию курса химиотерапии наблюдалось его достоверное увеличение до  $10,0 \pm 1,040$  мг%, что на 26,58% выше по сравнению с контрольной группой ( $7,35 \pm 1,45$ ).

Уровень Д-димеров также претерпевал существенные изменения. Так, изначально, у больных обеих групп наблюдалось резкое повышение уровня

Д-димеров по сравнению с нормальными величинами; среднее содержание уровня Д-димеров до проведения курса химиотерапии составляло  $225 \pm 99,69$  нг/мл. К 10-му дню лечения цитостатическими препаратами уровень Д-димеров возрос на 19,46%, по сравнению с контрольной группой и достиг  $2656 \pm 97,77$  нг/мл, а к 20-му дню наблюдалось его достоверное повышение на 10,47% ( $2934 \pm 83,97$  нг/мл) (рис. 1).

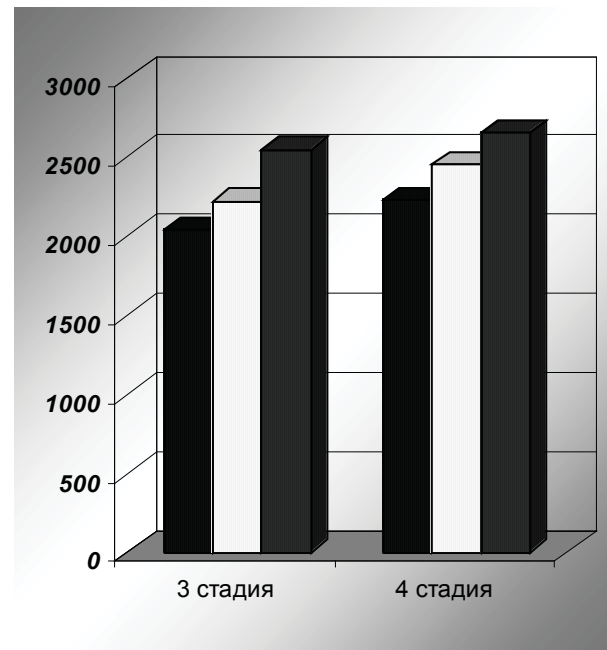
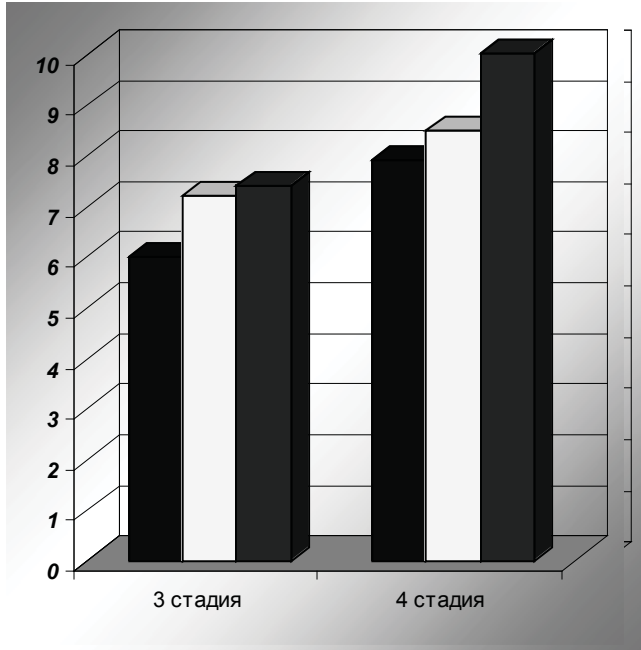


Рис. 1. Маркеры внутрисосудистого свертывания и фибринолиза (РФМК и Д-димер) у больных раком легкого во время химиотерапевтического лечения

По нашим наблюдениям, у неоперабельных больных раком легкого  $T_4N_{0-3}M_{0-1}$  отмечалась тенденция к нарастанию гиперкоагуляции, на фоне которой происходило снижение агрегационной активности тромбоцитов, повышение активности фВ. Концентрации Д-димеров и РФМК за время наблюдения значительно повышались. Активность пламиногена, XIIIa-зависимого фибринолиза в процессе лечения снижалась к 10 дню химиотерапии, хотя к окончанию курса лечения цитостатическими препаратами показатели их приближались к данным до начала лечения.

Анализируя полученные результаты, а также данные литературы, мы пришли к выводу, что рост злокачественной опухоли сопровождается высоким риском возникновения тромбоэмболических осложнений, истощением компенсаторных возможностей всех звеньев системы гемостаза у неоперабельных больных раком легкого.

Достоверное падение числа тромбоцитов, происходящее одновременно со снижением активности физиологических антикоагулянтов - АТ-III, ПР-С, и фибринолитической активности, по всей вероятности, следует объяснить не только токсическим влиянием на костный мозг химиопрепаратов и поступлением в кровяной ток биологически активных веществ из разрушающихся клеток крови, но и некоторым потреблением внутрисосудистых факторов свертывающей системы в процессе хронически текущего диссеминированного внутрисосудистого свертывания, прогрессирующего в ходе лечения.

Выявленный тип реакции указывает на угнетающее действие химиопрепаратов на систему гемостаза, что повышает риск развития тромбоэмболических осложнений у данной группы больных.

На основании вышеизложенного, мы предлагаем



включить в комплекс обследования гемостазиологические маркеры, по изменению которых можно наиболее точно оценить степень нарушения в системе гемостаза у больных раком легкого, подлежащих химиотерапевтическому лечению. На наш взгляд, к ним можно отнести изучение функциональной способности тромбоцитов (адгезивная и агрегационная), уровень фВ в крови, концентрацию фибриногена, концентрацию в крови РФМК и Д-димера, изучение уровня антикоагулянтов АТ-III и ПР-С, а также фибринолитического звена системы гемостаза – XIIa-зависимого фибринолиза, и уровень плазминогена.

Мы считаем, что определение этих показателей следует проводить больным, подлежащим лечению цитотоксическими препаратами в обязательном порядке с целью диагностики расстройств и их своевременной коррекции.

Исходя из этого, больным раком легкого рекомендовано, наряду с активной базисной цитотоксической терапией, включать в программу лечения дезагреганты и антикоагулянты, улучшающие реологические свойства крови и микроциркуляцию.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В.П., Любина Л.В., Зяблицкий В.М. и др. Повышение противоопухолевого эффекта доксорубина комплексной коррекцией состояния системы гемостаза. Бюллетень эксперим. биол. медицины 1995; 2: 204-207
2. Балуда М.В. Пятый вид оружия в онкологии. Паллиативная медицина и реабилитация 2001; 1: 35-39.
3. Германович М.Л. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. М.: Медицина 1997; 224.
4. Жуковская Е.С. Влияние противоопухолевых препаратов на систему гемостаза онкологических больных. Вопр.онкологии. 1990; 9: 22-27.
5. Маджуга А.В., Сомонова О.В., Елизарова А.Л., Астахова В.М. и др. ДВС- синдром в онкологии. Materia Medica 1997; 1: 41-42.
6. Макацария А.Д., Сдвинесов А.М. Нарушение гемостаза и тромбозы у больных злокачественными новообразованиями. Докл. на 466-м заседании ассоциации онкологов России. М.: 2000.
7. Navarro I., Marugan I., Espana F., Ruiz M., Alberola V., Aznar J., Garcia Conde J. Protein C in neo-

plastic disease. Effect of chemotherapy on the protein C levels in patients with inoperable lung neoplasms. Blood 1997; 69 (5): 1481-1484.

8. Nomura S., Yasunaga K. Influence of platelet-derived microparticles on coagulation in a lung cancer patient receiving chemotherapy. Chest 1993; 103 (3): 979-980.
9. Prandoni P. Antithrombotic strategies in patients with cancer. Thromb. Haemost. 1997; 78: 141-144.
10. Weitz I.C., Israel V.K., Waisman J.R., Presant C.A., Rochanda L., Liebman H.A. Chemotherapy-induced activation of hemostasis: effect of a low molecular weight heparin (dalteparin sodium) on plasma markers of hemostatic activation. Thromb Haemost. 2002; 88 (2): 213-220.

## SUMMARY

### THE EFFECT OF CHEMOTHERAPY TREATMENT ON HEMOSTASIS OF PATIENTS WITH LUNG CANCER

**Vorobyova E., Akhvlediani M., Emukhvari M., Sharashidze N., Gzirishvili L.**

*Reaserch Institute of Clinical Medicine, Tbilisi, Gerorgia*

Chemotherapy is known to raise the risk of developing thrombotic complications. The aim of our work is to study the system of hemostasis in patients with the lung cancer under chemotherapy treatment. 61 patients were examined (40 men, 21 women) between the ages of 32 and 75 years (the principal group). Chemotherapy was prescribed to 52 patients with the lung cancer considered as non-operable ones, and to 9 patients who refused surgical treatment. Chemotherapy applied to the patients was done by the conventional scheme. The treatment has been conducted from 16 to 20 days. Trombocytic-vascular hemostasis, plasmatic hemostasis, physiological anticoagulant activity, the blood fibrinolytic activity, markers of intravascular coagulation of the blood and those of fibrinolysis, were studied.

The depletion of compensatory mechanisms at all segments of hemostasis in non-operable patients was revealed. The type of reaction points at an oppressive effect of chemodrugs on the hemostasis system and the increase of the risk of development thrombotic complications in those patients.

**Key words:** lung cancer, hemostasis, chemotherapy.

**РЕЗЮМЕ****ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО****Воробьева Е.О., Ахвледиани М.В., Эмухвари М.Г., Шарашидзе Н.А., Гзиришвили Л.М.***Научно-исследовательский институт клинической медицины, Тбилиси*

Известно, что химиотерапия повышает риск развития тромботических осложнений. Целью данного исследования явилось изучение системы гемостаза у больных раком легкого, получающих химиотерапевтическое лечение.

Под наблюдением находился 61 больной (40 мужчин и 21 женщина) в возрасте 32-75 лет (основная группа). Химиотерапия назначена 52-м больным

раком легкого, признанным неоперабельными, и 9-и больным, отказавшимся от хирургического лечения. Курс химиотерапии проводился по общепринятой схеме лечения. Продолжительность лечения составила, в среднем, 16-20 дней. Всем больным было проведено исследование системы гемостаза по следующим параметрам: тромбоцитарно-сосудистый гемостаз, плазменный компонент гемостаза, активность физиологических антикоагулянтов, фибринолитическая активность крови, изучение маркеров внутрисосудистого свертывания крови и фибринолиза.

Анализ результатов свидетельствует об истощении компенсаторных возможностей всех звеньев системы гемостаза у неоперабельных больных раком легкого. Выявленный тип реакции указывает на угнетающее действие химиопрепаратов на систему гемостаза и повышение риска развития тромботических осложнений у данной группы больных.

---

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БЕРЕМЕННЫХ, НОСИТЕЛЕЙ НАСЛЕДСТВЕННЫХ АНОМАЛИЙ-МУТАЦИЙ Ф-V-ЛЕЙДЕН И ТРОМБОТИЧЕСКИХ G20210A**

**Шахбазов Ш.К., Рустамов Р.Ш.**

*Азербайджанский медицинский университет, кафедра акушерства и гинекологии – I;  
Азербайджанский НИИ гематологии и трансфузиологии, Баку*

Тромбозы представляют собой одну из актуальных глобальных медико-социальных проблем, являясь главной причиной смертности и инвалидности в экономически развитых и развивающихся странах мира. Повышенное внимание к этой проблеме в акушерстве вызвано высокой частотой возникновения венозных тромбозов во время беременности и при родах (0,13-1,5%), а также сложностью диагностики ввиду многообразия развивающихся клинических симптомов.

Большинство больных умирает, не получая адекватного лечения [6].

В современной концепции патогенеза венозной тромбоэмболии основное место отводится понятию «фактор риска» [3,6]. За последние годы установлен целый ряд наследственно обусловленных факторов риска, предрасполагающих к развитию венозных тромбозов, среди которых наиболее значимыми в клиническом отношении являются

мутации в генах факторов V (Ф-V-Лейден) и II (Ф-II-20210 G-A) свертывания крови [1,4]. Показано также, что гетерозиготное носительство мутации Ф-V-Лейден ассоциировано 4-7-кратным, а гомозиготное носительство 50-кратным повышением риска тромбозов у беременных. Мутация G20210A в гене протромбина у гетерозигот повышает риск развития тромбозов у беременных в 15 раз, а при сочетании с Ф-V-Л - до 100 раз [5].

Открытие генетически детерминированных тромбогенных факторов риска, предрасполагающих к гиперкоагуляции и увеличивающих вероятность развития повторных тромбозов, диктует необходимость разработки новых методов профилактического лечения беременных. В современной литературе обсуждаются вопросы проведения длительных курсов антикоагулянтной терапии беременных с наследственными тромбогенными аномалиями Ф-V-Л и Ф-II-20210 G-A. В то же время, необходимость проведения коротких профилактических курсов антикоагулянтной терапии бессимптомным беременным с носительством указанных аномалий, остаётся на уровне обсуждения. Между тем, целенаправленное профилактическое лечение вдвое дешевле лечения уже развившегося тромбоза [1]. Поиск эффективных методов профилактики и лечения тромботических осложнений у беременных по-прежнему чрезвычайно актуален.

Целью настоящего исследования является определение эффективности низкомолекулярного гепарина для профилактики и лечения тромбозомических осложнений у беременных, носителей мутаций Ф-V-Л и Ф-II-20210 G-A.

**Материал и методы.** Под наблюдением находились 27 беременных с тромботическими осложнениями в возрасте от 19 до 39 лет. Среди беременных с тромботическими осложнениями у 16-и был диагностирован тромбоз поверхностных и глубоких нижних конечностей, у 8-и - повторный тромбоз нижних конечностей, у 3-х - острый тромбофлебит.

Средний срок беременности в группе беременных с тромбозами вен нижних конечностей составил  $30,4 \pm 0,5$  недель, а в контрольной группе -  $32,2 \pm 0,6$  недель.

Тромбозы вен нижних конечностей диагностировали с помощью дуплекс ультрасонографии. Методом полимеразной цепной реакции определяли мутации Ф-V-Л, Ф-II-20210 G-A и мутации метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR C 677T) [2].

Для изучения показателей гемостаза кровь забирали из локтевой вены между 9-10 часами утра иглой диаметром 0,9 мм в условиях минимальной компрессии. Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновый индекс (ПИ), продукты деградации фибриногена и фибрина (ПДФФ) определяли с помощью наборов «Chromogenix АВ». Определение активности плазминогена, протеина С и антитромбина-III (АТ-III) проводили с помощью хромогенных субстратов набора фирмы «Behringwerke». Определение агрегации тромбоцитов проводили на агреметре «Elvi-840» по Born. В качестве стимуляторов агрегации использовали раствор АДФ, адреналина и ристомицина.

Все обследуемые беременные были разделены на 2 группы. Первую группу составили беременные с тромбозами. Среди беременных этой группы у 8-и женщин выявлено носительство мутации Ф-V-Л, у 5-и - гомозиготное состояние по Ф-V-Л, у 4-х - двойное гетерозиготное состояние по мутациям Ф-V-Л и Ф-II-20210 G-A, у 8-и - двойное гетерозиготное состояние по мутациям Ф-V-Л и MTHFR C 677T и у 2-х - сочетание гетерозиготного носительства Ф-II-20210 G-A с мутацией MTHFR C677T.

Вторую группу составили 6 беременных, носители мутации Ф-V-Л без признаков тромбозов. Бессимптомные носители мутации Ф-V-Л были выявлены при обследовании беременных с физиологическим течением беременности.

Беременные с гетеро- и гомозиготной формами мутаций Ф-V-Л и сочетанием гетерозиготных форм мутаций Ф-V-Л, Ф-II-20210 G-A и MTHFR C 677T были отнесены к группе высокого риска. Беременные с гетерозиготной формой мутации Ф-V-Л без признаков тромбозов составили группу умеренного риска.

В качестве антитромботической терапии применяли низкомолекулярный гепарин - надропарин (фраксипарин), который использовали у беременных в дозе по 0,3 мл в сутки (профилактическая доза), и в дозе по 0,3 мл 2 раза в сутки (лечебная доза), подкожно.

Всем беременным назначали витамины группы В, при наличии МТНFR дополнительно назначали фолиевую кислоту по 4 мг в сутки. Фраксипарин применяли на протяжении всей беременности, от-

меняя за сутки до родов и кесарева сечения. Прием возобновляли спустя 8 ч после родов. Контроль эффективности антитромботической терапии проводился в динамике.

**Результаты и их обсуждение.** Показатели гемостаза у беременных с тромбозом и носительством мутаций Ф-V-Л, Ф-II-20210 G-A и МТНFR С 677Т (I группа) и беременных без признаков тромбозов и с носительством Ф-V-Л (II группа) представлены в таблице 1.

*Таблица 1. Показатели гемостаза у беременных с тромбозом и носительством мутаций Ф-V-Л, Ф-II-20210 G-A и МТНFR С 677Т (I группа) и у беременных без признаков тромбозов и с носительством мутации Ф-V-Л (II группа)*

Показатели	Группы беременных		
	I группа (n=27)	II группа (n=6)	Контрольная группа (n=70)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	228,3 $\pm$ 5,4	262,0 $\pm$ 6,1	240,5 $\pm$ 5,4
АЧТВ, сек	20,1 $\pm$ 2,4	23,2 $\pm$ 2,0	26,8 $\pm$ 2,6
ПИ, %	102,4 $\pm$ 2,0	100,1 $\pm$ 2,4	98,0 $\pm$ 1,5
Фибринин, г/л	4,6 $\pm$ 1,5	4,0 $\pm$ 1,6	3,5 $\pm$ 1,7
ПДФФ, мкг/мл	19,0 $\pm$ 4,0	18,0 $\pm$ 3,9	14,5 $\pm$ 4,9
Агрегация тромбоцитов:			
- АДФ, %	61,0 $\pm$ 3,8*	64,1 $\pm$ 3,5*	49,5 $\pm$ 3,0
- Адреналин, %	70,4 $\pm$ 3,9*	70,4 $\pm$ 3,8*	45,8 $\pm$ 3,5
- Ристомицин, %	55,5 $\pm$ 2,0*	51,5 $\pm$ 1,9	45,0 $\pm$ 3,0
Плазминоген, %	101,5 $\pm$ 1,5	98,4 $\pm$ 1,7	100,2 $\pm$ 1,5
АТ- III, %	101,3 $\pm$ 1,4*	84,2 $\pm$ 2,9*	114,9 $\pm$ 2,6
Протеин С, %	89,1 $\pm$ 3,1*	90,2 $\pm$ 3,2*	120,0 $\pm$ 6,8

*примечание:  $p_k^* < 0,005$  – показатели, достоверно отличающиеся от контроля*

Как видно из данных этой таблицы, у беременных с тромбозами и носительством тромбогенных аномалий отмечается внутрисосудистая активация свертывания крови, характеризующаяся укорочением времени АЧТВ, повышением содержания фибриногена и ПИ, а также и ПДФФ. Кроме того, у обследованных беременных этой группы наблюдалось угнетение антикоагулянтного и фибринолитического звеньев гемостаза.

У беременных без признаков тромбоза и с носительством мутации Ф-V-Л также наблюдается повышение коагуляционного потенциала крови, однако интенсивность гиперкоагуляции несколько ниже, чем у беременных I группы.

Показатели агрегации тромбоцитов в обеих группах характеризуются повышением агрегационной активности тромбоцитов. Оценка пока-

зателей гемостаза у обследованных беременных позволяет сделать заключение о значительном повышении коагуляционного потенциала крови у беременных I группы. Результаты обследования беременных этой группы дают основание для начала специфической противотромботической терапии.

В таблице 2 представлена динамика показателей гемостаза у беременных с тромбозом и носительством наследственных тромбогенных аномалий на фоне лечения фраксипарином. Фраксипарин всем беременным назначался в лечебном режиме, т.е. дважды в день. Критерием перехода с лечебной дозы на профилактическую дозу служила оценка клинических данных и лабораторных показателей гемостаза. Как видно из таблицы 2, на 15-ый день лечения наблюдается тенденция к снижению признаков гиперкоагуляции. Однако содержания

фибриногена и ПДФФ остаются повышенными, что указывает на наличие риска развития тромбоза.

Клинически у всех больных к концу 3-й недели отмечалось обратное развитие симптомов тромбоза.

Таблица 2. Динамика изменений показателей гемостаза у беременных с тромбозом и носительством наследственных тромбогенных аномалий на фоне лечения фраксипарином

Показатели	До лечения 1 день	После лечения	
		15-й день	30-й день
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	228,3 $\pm$ 5,4	238,5 $\pm$ 3,8	232,2 $\pm$ 3,8
АЧТВ, сек	20,1 $\pm$ 0,4*	37,5 $\pm$ 0,7	38,9 $\pm$ 0,9
ПИ, %	102,4 $\pm$ 2,0*	100,0 $\pm$ 2,5	98,0 $\pm$ 1,5
Фибринин, г/л	4,6 $\pm$ 1,1	3,2 $\pm$ 1,4	3,2 $\pm$ 1,5
ПДФФ, мкг/мл	19,0 $\pm$ 4,0	18,2 $\pm$ 3,8	13,5 $\pm$ 5,0
Агрегация тромбоцитов:			
- АДФ, %	61,0 $\pm$ 3,8*	64,2 $\pm$ 3,6	48,5 $\pm$ 3,2
- Адреналин, %	70,4 $\pm$ 3,9*	70,0 $\pm$ 3,8	44,5 $\pm$ 3,5
- Ристомицин, %	55,5 $\pm$ 2,0*	53,0 $\pm$ 1,9	43,8 $\pm$ 2,7
Плазминоген, %	101,5 $\pm$ 1,5	98,7 $\pm$ 1,7	100,9 $\pm$ 1,6
АТ- III, %	101,3 $\pm$ 1,4	98,8 $\pm$ 1,6	101,8 $\pm$ 1,5
Протеин С, %	89,1 $\pm$ 3,1	90,1 $\pm$ 3,0	120,4 $\pm$ 6,2

примечание:  $p^* < 0,005$  – достоверное отличие от показателей после лечения

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать заключение, что у беременных с тромботическими осложнениями и носительством Ф-V-Л, Ф-II-20210 G-A и МТНFR С 677Т применение фраксипарина является эффективным методом лечения тромбозов.

Высокая эффективность фраксипарина подтверждается изменением показателей различных звеньев гемостаза и обратным развитием признаков тромбоза.

Следует отметить, что при наличии мутации Ф-V-Л у беременных без признаков тромбозов изменения показателей гемостаза хотя и характеризуется гиперкоагуляцией, однако степень повышения коагуляционного потенциала крови незначительно отличается от беременных контрольной группы. Поэтому в этой группе обследованных фраксипарин применялся только в профилактической дозе до родов и в течение 10-и дней послеродового периода. Изучение показателей гемостаза после 10-дневного курса фраксипарином особых изменений в различных звеньях гемостаза в этой группе беременных без признаков тромбоза и с носительством Ф-V-Л не наблюдалось.

Подводя итог оценки полученных результатов можно отметить, что применение фраксипарина

во время беременности и в послеродовом периоде является безопасным и высокоэффективным в профилактике тромбоэмболии у беременных с носительством наследственных тромбогенных аномалий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bates Sh.M., Greer I.A., Hirsh J., Ginsberg J.S. Use of antithrombotic agents during pregnancy. Chest, 2004; 126: 6275-6445.
2. Bertina R.M., Koeleman B.P., Koster T. et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature. 1994; 369: 64-67.
3. Lindqvist P.G., Olofsson P., Dahlback B. Use of selective factor V Leiden screening in pregnancy to identify candidates for anticoagulants. Obstet. Gynecol. 2002; 100: 332-336.
4. Lockwood Ch.J. Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm. Obstet. Gynecol. 2002; 99: 333-341.
5. Press R.D., Baner R.A., Kujovich J.L., Heit J.A. Clinical utility of factor V Leiden (R 506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders. Arch. Pathol.Lab.Med. 2002; 126 (11):1304-1308.
6. Rosendaal F.R. Venous thrombosis: a multicausal disease. Lancet 1999; 353: 1167-1173.

## SUMMARY

## MODERN APPROACHES TO TREATMENT OF THROMBOSIS IN PREGNANT WOMEN, CARRIERS OF HEREDITARY ANOMALIES - F-V- LEIDEN AND G20210A MUTATION

Shahbazov Sh., Rustamov R.

*Azerbaijan Medical University, Department of Obstetrics and Gynecology-I, Azerbaijan Scientifically Research Institute of Hematology and Transfuziology, Baku*

Aim of investigation: studying of efficiency low-molecular heparin for preventive maintenance and treatment of thromboembolic disorders in pregnant women, carriers of F-V- L and F-II-20210 G-A mutation.

Under supervision, there were 27 women with thrombosis during pregnancy from 19 to 39 years old.

The lower extremities veins thromboses was diagnosed by duplex sonography. F-V- Leiden, F-II-20210 G-A and MTHFR C 677T gene mutation was defined by PCR-PELP method. To all pregnant women Fraxiparin and vitamins of B group was appointed during pregnancy period; at presence of MTHFR a folic acid was appointed in addition.

It is concluded that application of Fraxiparin is an effective method of treatment of thrombosis during pregnancy and women - carriers F-V- Leiden, F-II-20210 G-A and MTHFR C 677T gene mutation. High efficiency of Fraxiparin confirms with change of parameters of various parts of a hemostasis and return development of thrombosis evidence.

**Key words:** fraxiparin, thrombosis, pregnancy, gene mutation.

## РЕЗЮМЕ

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ТРОМБОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БЕРЕМЕННЫХ, НОСИТЕЛЕЙ НАСЛЕДСТВЕННЫХ АНОМАЛИЙ-МУТАЦИЙ Ф-V-ЛЕЙДЕН И ТРОМБОТИЧЕСКИХ G20210A

Шахбазов Ш.К., Рустамов Р.Ш.

*Азербайджанский медицинский университет, кафедра акушерства и гинекологии – I; Азербайджанский НИИ гематологии и трансфузиологии, Баку*

Целью настоящего исследования явилось определение эффективности низкомолекулярного гепарина для профилактики и лечения тромбоемболических осложнений у беременных, носителей мутаций Ф-V-Л и Ф-II-20210 G-A. Под наблюдением находились 27 беременных с тромботическими осложнениями в возрасте от 19 до 39 лет. У 16-и из них был диагностирован тромбоз поверхностных и глубоких нижних конечностей, у 8-и - повторный тромбоз нижних конечностей, у 3-х - острый тромбофлебит.

Средний срок беременности в группе беременных с тромбозами вен нижних конечностей составил 30,4±0,5 недель, а в контрольной группе - 32,2±0,6 недель.

В качестве антитромботической терапии применяли низкомолекулярный гепарин - надропарин (фраксипарин), который использовали у беременных в дозе по 0,3 мл в сутки (профилактическая доза), и в дозе по 0,3 мл 2 раза в сутки (лечебная доза), подкожно.

Установлено, что применение фраксипарина во время беременности и в послеродовом периоде является безопасным и высокоэффективным в профилактике тромбоемболии у беременных с носительством наследственных тромбогенных аномалий.

## TREATMENT OF PATIENTS WITH CARDIOGENIC SHOCK IN THE SETTING OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

### Case Reports

Gogorishvili<sup>1</sup> I., Archvadze<sup>1</sup>, A. Kipiani<sup>1</sup> V., Kipshidze<sup>1,2</sup> N.

<sup>1</sup>N. Kipshidze Central University Hospital, Tbilisi, Georgia;

<sup>2</sup>Lenox Hill Heart and Vascular Institute, New York, NY, USA

Here we want to represent three cases of treatment of patients with ST Elevation Acute Myocardial Infarction complicated with cardiogenic shock.

#### Case 1.

66 y.o. male with non Insulin dependant Diabetes Mellitus was admitted to ER with complete A-V block and palpitations. EKG didn't show any acute ischemic changes.

Transvenous temporary pacing was established and condition improved. But after 4 hours patient developed LBBB and lung oedema, with dramatic fall of global contractility down to EF of 10-15% and shock.

In less then half an hour patient was transferred to Cathlab. where coronary angiography revealed: chronic total occlusion of RCA and CX, and proximal 90% stenosis of LAD, which also provided collaterals to PDA.

LAD was directly stented with 3.5/19mm stent. As patient remained in shock, IABP was placed. During next couple of hours slight improvement was observed. After 3 days EF increased to 25%, CI to 2.0L/min/m and gave us chance to wean from IABP. Normal sinus rhythm was also restored, but because of aggravated chronic renal failure patient needed 3 procedures of haemodialysis.

Two weeks later patient was discharged with EF of 35%, mild symptoms of CHF, on Aspirin, Clopidogrel and Carvedilol.

#### Case 2.

50 y.o. male with shock was admitted to our hospital after 5 hours from onset of severe chest pain.

On EKG -anterior STEMI. Echo- total anterior, inferior and apical akinesia. EF-15%.

In 45 minutes patient was in Cathlab. Coronary angiography revealed proximally occluded RCA, and new ostial occlusion of LAD (Fig. 1). After recanalization of LAD 4.0/24mm stent was deployed (Fig. 2). The flow was restored in whole vessel, but despite our active pharmacologic measures in distal third of LAD, contrast flow remained slightly reduced (TIMI II).



Fig. 1. Coronary angiography revealed proximal occlusion of LAD



Fig. 2. Coronary angiography after recanalization and stenting of LAD

This patient also received IABP for 3 days. At that time CI increased to 2.3L/min/m<sup>2</sup> and EF became 32% with global hypokinesia, and apical akinesia.

After one week patient was discharged with mild symptoms of CHF, on Aspirin, Clopidogrel, Enalapril, Hydrochlorthizide and Carvedilol.

After 8 months of follow up, both patients are angina free, and have HF of NYHA 1-2.

### Case 3

74 y.o. NIDDM female patient was admitted in our hospital with STEMI and cardiogenic shock. In ambulance she was intubated, and at admission developed two episodes of VF which were converted to sinus by electric shock. Patient was brought to cathlab with BP of 60/30mm.

On angiography there was (75% stenosis of LM, chronic occlusion of mid LAD, and subocclusion of dominant CX .

CX and LM were promptly stented, but insertion of IAB during procedure was impossible due to total occlusion of left Iliac artery. Despite restored coronary flow, patient continued to deteriorate, needed CPR and after 30 minutes expired.

Cardiogenic Shock remains unsolved problem in modern Cardiology. Despite some achievements, in-hospital mortality rate still varies between 52-70% [2,4,5,7]. The most powerful predictors of hospital survival among shock patients are percutaneous revascularization with stenting and use of Intra-Aortic Balloon Counterpulsation (IABP) [1,4,6].

Above presented cases are examples of this. As we have experienced: inability to establish circulatory assistance can be fatal even with “open coronaries”.

In era of new developments in the field of circulatory assist devices IABP still remains the main supportive method for patients with shock [2,4-7].

Efficacy, relative easiness and short time for IABP establishment makes the latter a preferable way of support for these highest risk patients [2,4].

## REFERENCES

1. Dunkman W.B., Leinbach R.C., Buckley M.J., et al. Clinical and hemodynamic results of intraaortic ballonpumping and surgery for cardiogenic shock. *Circulation* 1972;46:465-477.
2. Dzavik V., Sleeper L.A., Cocke T.P. et al. Early revascularization is associated with improved survival in elderly patients with acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: a report from Shock trial registry. *Eur Heart J* 2003; 24:828-837.
3. Ellis G., Holmes D.R. Cardiogenic shock in the setting of acute myocardial infarction. Strategic approaches in coronary intervention. *Hypertension* 2008; 52(3):522-8.
4. Hasdai D., Topol E.J., Califf R.M. et al. Cardiogenic shock complicating acute coronary syndromes. *Lancet* 2000;35:136-143.
5. Hochman J.S. cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: expanding the paradigm. *Circulation* 2003;107: 2998-3002.
6. Hudson M.P., Ganger C.B., Stebbins A.L. et al. Cardiogenic shock survival and use of intraaortic balloon counterpulsation: results from the GUSTO I and III trials. *Circulation* 1999;100 (Suppl I): I370.
7. Webb J.G., Lowe A.M., Sanborn T.A. et al. Percutaneous coronary intervention for cardiogenic shock in the SHOCK trial. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1373-1379.

## SUMMARY

### TREATMENT OF PATIENTS WITH CARDIOGENIC SHOCK IN THE SETTING OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

#### Case Reports

**Gogorishvili<sup>1</sup> I., Archvadze<sup>1</sup>A., Kipiani<sup>1</sup> V., Kipshidze<sup>1,2</sup>N.**

<sup>1</sup>N. Kipshidze Central University Hospital, Tbilisi, Georgia; <sup>2</sup>Lenox Hill Heart and Vascular Institute, New York, NY, USA

Cardiogenic shock remains unsolved problem in modern Cardiology. Despite some achievements, in-hospital mortality rate still varies between 52-70%. In era of new developments in the field of circulatory assist devices IABP still remains the main supportive method for patients with shock. The most powerful predictors of hospital survival among shock patients



are percutaneous revascularization with stenting and use of Intra-Aortic Balloon Counterpulsation (IABP). As we have experienced: inability to establish circulatory assistance can be fatal even with “open coronaries”. Here we want to represent three cases of treat-

ment of patients with ST Elevation Acute Myocardial Infarction complicated with cardiogenic shock.

**Key words:** Acute myocardial infarction, cardiogenic shock.

## РЕЗЮМЕ

### ЛЕЧЕНИЕ КАРДИОГЕННОГО ШОКА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Гогришвили<sup>1</sup> И.Р., Арчвадзе<sup>1</sup> А.Т., Кипиани<sup>1</sup> В.К., Кипшидзе<sup>1,2</sup> Н.Н.

<sup>1</sup>Центральная университетская клиника им. Н.Кипшидзе, Тбилиси, Грузия;

<sup>2</sup>Институт сердца и сосудов, Ленокс Хилл, Нью-Йорк, США

Кардиогенный шок является нерешенной проблемой в современной кардиологии. Несмотря на некоторые достижения, госпитальная летальность варьирует в пределах 52-70% случаев. Для снижения летальности при кардиогенном шоке наиболее эффективны перкутанная коронарная реваскуляризация со стентированием и внутриаортальная контрпульсация. По нашему опыту невозможность проведения циркуляторной поддержки может оказаться фатальной даже при «открытых» коронарных артериях.

В эру применения устройств поддержки циркуляции кровообращения внутриаортальная

контрпульсация остается основным методом лечения больных кардиогенным шоком.

Целью исследования явилось доказать эффективность применения транслюминальной коронарной реваскуляризации со стентированием в сочетании с внутриаортальной контрпульсацией.

Эффективность, легкость применения и малое время для проведения внутриаортальной контрпульсации дают нам право рекомендовать указанный метод для широкого применения в кардиологической практике.

## ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ БЛОКАТОРОВ РЕЦЕПТОРОВ АНГИОТЕНЗИНА НА ТЕЧЕНИЕ МИКРОСОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Цуцкиридзе<sup>1</sup> Л.Р., Курашвили<sup>1</sup> Р.Б., Цибадзе<sup>2</sup> А.Д., Курашвили<sup>1</sup> Г.Р., Шелестова<sup>1</sup> Е.Л.

<sup>1</sup>Центр диабета Грузии; <sup>2</sup>Тбилисский государственный медицинский университет

Сахарный диабет представляет серьезную медицинскую и социальную проблему. Количество свежих случаев диабета ежегодно растет и предполагается, что к 2025 году достигнет 385 млн.

Кроме того, статистические данные о частоте осложнений диабета внушают особое опасение. Абнормальные уровни глюкозы в крови вызывают патологические изменения, практически, во всех органах и системах организма человека (глазное дно, почки, сосудистая система, сердце и головной мозг). При вновь выявленном сахарном диабете типа 2 процентное соотношение поражений различных тканей организма выглядит следующим образом: альбуминурия – 4%, исчезновение рефлексов в нижних конечностях – 12%, поражение сердечно-сосудистой системы (ССС) – 13%, ретинопатия – 18% [8].

Диабетическая ретинопатия (ДР) является ведущей причиной потери зрения. Важнейшую роль в развитии ретинопатии играет недостаточность инсулина, которая вызывает накопление сорбитола и фруктозамина внутри клетки, тем самым способствуя повышению осмотического давления, развитию внутриклеточного отека, утолщению эндотелиального слоя капилляров и, соответственно, сужению их просвета. Повышение уровня протеинов в плазме влечет за собой повышение агрегации форменных элементов крови и отрицательно влияет на фибринолиз, что, в свою очередь, является причиной образования микротромбов, гибели перicyтов и эндотелиальных клеток в капиллярах сетчатки глаз, нарушения проницаемости стенок кровеносных сосудов и приводит к межклеточному отеку в тканях сетчатки [2-4,11].

Нарушение перфузии парафовеальных сосудов вызывает развитие экссудативной макулопатии. Стимуляция и облитерация капилляров сетчатки является причиной ишемии сетчатки, которой сопутствует формирование новых вазоформативных факторов, а впоследствии – неоваскуляризация [6,7].

Во избежание развития вышеперечисленных нежелательных процессов, необходимо выявлять их по возможности на более ранней стадии, проводить их регулярный скрининг и мониторинг, поддерживать диабет в компенсированной форме и добиться нормализации уровней артериального давления [1].

На сегодняшний день эталонным методом скрининга и контроля состояния глазного дна считается его фотографирование; наиболее распространенным и повсеместно принятым методом оценки диабетической ретинопатии является стереоскопическое изображение сетчатки в стандартных зонах с углом охвата в 30° – ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study).

Целью данного исследования явилось изучение некоторых клинических и гемодинамических показателей у больных сахарным диабетом типа 1 и 2, выявление диабетической ретинопатии на ранней стадии и ее коррекция с помощью блокаторов ангиотензина (ангиотензин II type 1 receptor blockers, AT I).

**Материал и методы.** Блокаторы рецепторов являются селективными блокаторами AT I и непосредственно не влияют на кининовую систему. Блокада AT I сопровождается понижением артериального давления (АД), что происходит за счет вазоконстрикции, высвобождения альдостерона и катехоламинов и реабсорбции натрия и воды. Блокаторы ангиотензиновых рецепторов не только эффективно снижают артериальное давление, но и улучшают функции почек, состояние глазного дна, понижают гипертрофию левого желудочка и нормализуют показатели гемодинамики [5,8,9,12].

Нами обследованы 250 больных сахарным диабетом, которые наблюдались в Центре диабета Грузии. Из них у 115-и не отмечалось отдаленных микрососудистых осложнений диабета. Они составили контрольную группу (I группа). У оставшихся 135-и пациентов были выявлены изменения

на глазном дне. Эти пациенты были подразделены на 2 группы – 43 пациента с СДТ1 (II группа) и 92 пациента – с СДТ2 (III группа).

У больных I (контрольной) группы степень фотографических изображений глазного дна по ETDRS составила 10/10, уровни АД  $\leq 130$  мм.рт.ст (систолическое) и  $\leq 85$  мм.рт.ст (диастолическое), антигипертензивная терапия (АГТ) не проводилась.

II группа – больные СДТ1, степень фотографирования глазного дна по ETDRS находилась в пределах от  $\geq 20/10$  до  $\leq 47/47$ , уровни АД -  $\leq 130$  мм.рт.ст (систолическое) и  $\leq 85$  мм.рт.ст (диастолическое), АГТ не проводилась.

III группа – больные СДТ2, степень фотографирования глазного дна по ETDRS находилась в пределах  $\geq 20/10$  -  $\leq 47/47$ , АД -  $\leq 160$  мм.рт.ст (систолическое) и  $\leq 90$  мм.рт.ст (диастолическое), АГТ не проводилась или использовались различные препараты, за исключением АКФ-ингибиторов. На фоне АГТ уровни АД -  $\leq 130$  мм.рт.ст (систолическое) и  $\leq 85$  мм.рт.ст (диастолическое).

Критериями исключения пациента из исследования являлись:

катаракта, глаукома, отек макулы в анамнезе; окклюзия вен сетчатки; беременность и лактация; гемодинамически значительный стеноз аорты или митральных клапанов; стеноз артерий почек или трансплантация почек в анамнезе; ИМ, коронарная ангиопластика, стентирование, транзиторная ишемия в анамнезе.

Пациенты проходили физикальное обследование, определялся их клинический статус, показатели липидного спектра, микроальбуминурии (экскреция альбумина/ЭА 20-200  $\mu$ гр/мин, измеренная в двух стерильных, 24-часовых пробах мочи) и концентрация креатинина плазмы.

Кроме изучаемого препарата (кандесартан 16, 32 мг или плацебо), назначались и другие антигипертензивные средства (диуретики, бета-блокаторы, блокаторы каналов кальция, альфа-блокаторы). На протяжении 3-х лет лечения кандесартаном проводилось регулярное обследование глазного дна - фотографирование и оценка 7-и стереоскопических изображений сетчатки в стандартных зонах с углом охвата в  $30^\circ$  (ETDRS).

Таблица. Клинико-лабораторные показатели исследуемых пациентов

Показатели	I группа	II группа	III группа
Длительность диабета (годы)	7 $\pm$ 2	11 $\pm$ 3	9 $\pm$ 4
HbA1c (%)	7,8 $\pm$ 1,6	6,6 $\pm$ 1,9	8,3 $\pm$ 2,4
Общий холестерин (ммоль/л)	5,6 $\pm$ 1,4	5,2 $\pm$ 0,8	6,7 $\pm$ 1,7
X-ЛПВП (ммоль/л)	1,3 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,3
X-ЛПНП (ммоль/л)	4,3 $\pm$ 1,2	3,9 $\pm$ 1,1	4,6 $\pm$ 1,0
Триглицериды (ммоль/л)	2,1 $\pm$ 1,3	1,4 $\pm$ 1,2	2,1 $\pm$ 1,4
Систолическое АД (мм рт.ст)	130 $\pm$ 5	138 $\pm$ 10	144 $\pm$ 21
Диастолическое АД (мм рт.ст)	81 $\pm$ 5	84 $\pm$ 9	82 $\pm$ 11
ИМТ (кг/м <sup>2</sup> )	25,6 $\pm$ 3,2	25,9 $\pm$ 3,3	28,8 $\pm$ 5,1

**Результаты и их обсуждение.** В результате проведенных исследований установлено, что у пациентов, у которых на начальном этапе изменения на глазном дне не отмечались (I группа, n=115/46%), поддержание нормальных уровней АД и глюкозы крови (ГК) позволило сохранить первоначальное состояние сетчатки. У пациентов, у которых в момент включения в исследование была обнаружена легкая форма непролифера-

тивной ретинопатии (60 пациентов, 44,4%), на фоне применения кандесартана в течение 3-х лет наблюдалось улучшение состояния глазного дна – при повторном фотографировании патологические изменения на глазном дне уже не фиксировались. У пациентов на начальном этапе с изменениями различной тяжести на глазном дне (препролиферативная ДР, фаза васкуляризации; микроаневризмы в макулярных и парамаккулярных зонах; экскуда-

тивная фаза препролиферативной ДР; отложение твердых экссудатов; незначительные геморрагии), в основном, ситуация не изменилась (96% из 72), а в оставшихся 3-х случаях (4%) наблюдалось ухудшение состояния (пролиферативная ДР, фаза неоваскуляризации, преретинальные кровоизлияния в центральной зоне глазного дна), причиной чего явились повышенные уровни ГК и АД.

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что для оценки уровня микроангиопатии на фоне сахарного диабета необходимо проводить скрининг глазного дна в динамике, что позволяет выявить патологические изменения на сетчатке на ранних стадиях и приостановить их прогрессирование. Применение кандесартана у больных СД улучшает состояние глазного дна, снижает уровни артериального давления и экскреции альбумина в моче.

Исходя из вышеизложенного, рекомендуем включить кандесартан в стандартную схему лечения больных СД, т.к. он оказывает выраженный положительный эффект на течение микроангиопатии, независимо от пола пациента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Астахов Ю.С., Лисочкина А.Б., Щадричев Ф.Е. Современные направления медикаментозного лечения непролиферативной диабетической ретинопатии (обзор данных литературы). Клиническая офтальмология 2003; 4 (3): 96–101.
2. Ильенков С.С., Вайник Д.Е., Ланин С.Н., Леонова Л.Л., Лазаренко В.И. Эффективность ксантинола

никотината при диабетической ретинопатии. Вопросы офтальмоэндокринологии и сосудистой патологии глаз. Материалы науч.–практ. конф. офтальмологов и эндокринологов. Красноярск: 1999; 32–38.

3. Кацнельсон Л.А., Форофонова Т.И., Бунин А.Я. Сосудистые заболевания глаз. - М.: Медицина, 1990; 272.
4. Aiello L.P. The potential role of PKC beta in diabetic retinopathy and macular edema. 2002.
5. Adler AI., Stratton I.M., Neil H.A.W., Yudkin J.S., Matthews D.R., Cull C.A. et al. On behalf of the UK Prospective Diabetes Study Group, Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. BMJ 2000; 321:412-419.
6. Chaturvedi N., Sjolie A-K., Stephenson J.M et al, Effect of Lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. 1998.
7. Lang G.E. Diabetic Retinopathy, 2007.
8. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1994.
9. European Arterial Risk Policy Group on behalf of the International Diabetes Federation (European Region). A strategy for arterial risk management in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetic. Med. 1997; 14:611-621.
10. UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. BMJ 1998; 317:703-713.
11. White W.B. How well does ambulatory blood pressure predict target-organ disease and clinical outcome in patients with hypertension? Blood Press Monit 1999; (Suppl 2): S17-21.

## SUMMARY

### POSITIVE EFFECTS OF ANGIOTENSIN RECEPTOR BLOCKERS ON THE COURSE OF MICROVASCULAR COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS

Tsutskiridze<sup>1</sup> L., Kurashvili<sup>1</sup> R., Tsbadze<sup>2</sup> A., Kurashvili<sup>1</sup> G., Shelestova<sup>1</sup> E.

<sup>1</sup>Georgian Diabetes Center; <sup>2</sup>Tbilisi State Medical University

The aim of the research was to evaluate some clinical and hemodynamic characteristics in patients with diabetes mellitus type 1 and type 2 (DM type 1 and DM type 2), to diagnose diabetic retinopathy (DR) on early stage of its development for the correction of the disease by treating with angiotensin II type 1 receptor blocker (AT I) – Candесartan.

Totally 250 patients (pts) with DM type 1 and DM type 2 were studied; they were divided into 3 groups (Gr.): Gr.1 (n=115) – pts with DM and without DR; Gr. 2 (n=43) – pts with DM type 1 and DR; Gr.3 (n=92) - pts with DM type 2 and DR.

A comprehensive physical examination was conducted to obtain baseline information about the patient: clinical status, lipid profile, microalbuminuria and urine creatinine, as well as glycemia levels. Patients were treated with Candesartan (16 or 32 mg) or placebo. When necessary, other antihypertensive agents (except ACE-inhibitors) were initiated. Eye fundus monitoring was performed with evaluation of 7, 30<sup>0</sup> standard zone stereoscopic pictures of the retina according to ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study).

The results of three year observation revealed no pathologic changes on the retina in normotensive and normoglycemic pts; pts with mild diabetic retinopathy at baseline demonstrated normal levels of ABP and blood glucose which resulted

in the regression of the changes. The changes of various severity demonstrated no positive shifts in 96% of cases; DR deterioration (proliferative DR, neovascularisation stage) was observed in 4% of cases.

Results of the study showed that Candesartan treatment of pts with DM resulted in positive shifts in the pathologic changes, registered on the retina and decrease in urine albumin excretion rate. Thus, we recommend to include Candesartan in the standard treatment, as the have positive effect on the course microvascular complications of diabetes mellitus both in males and females.

**Key words:** diabetes mellitus type 1, diabetes mellitus type 2, diabetic retinopathy, candesartan.

## РЕЗЮМЕ

### ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ БЛОКАТОРОВ РЕЦЕПТОРОВ АНГИОТЕНЗИНА НА ТЕЧЕНИЕ МИКРОСОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Цуцкиридзе<sup>1</sup> Л.Р., Курашвили<sup>1</sup> Р.Б., Цибадзе<sup>2</sup> А.Д., Курашвили<sup>1</sup> Г.Р., Шелестова<sup>1</sup> Е.Л.

*<sup>1</sup>Центр диабета Грузии; <sup>2</sup>Тбилисский государственный медицинский университет*

Целью данного исследования явилось изучение некоторых клинических и гемодинамических показателей у больных сахарным диабетом тип 1 и 2, выявление диабетической ретинопатии на ранней стадии и ее коррекция с помощью блокаторов ангиотензина (ангиотензин II type 1 receptor blockers, AT I).

Нами обследованы 250 больных сахарным диабетом, которые наблюдались в Центре диабета Грузии. Они были разделены на 3 группы: I группа – 115 пациентов без диабетической ретинопатии (ДР); II группа – 43 пациента с сахарным диабетом (СД) тип 1 и ДР; III группа – 92 пациента с СД 2 и ДР. У больных определялся клинический статус, показатели липидного спектра, микроальбуминурии. Кроме изучаемого препарата (кандесартан 16, 32 мг или плацебо), назначались и другие антигипертензивные средства. Для регулярного обследования глазного дна применяли фотографиярование и оценку 7-и стереоскопических изо-

бражений сетчатки в стандартных зонах с углом охвата в 30<sup>0</sup> (ETDRS).

В результате 3-летнего наблюдения нами установлено, что у пациентов, у которых на начальном этапе изменений на глазном дне не было, поддержание нормальных уровней артериального давления (АД) и глюкозы крови позволило сохранить первоначальное состояние сетчатки глаз. У пациентов, у которых на начальном этапе отмечались изменения на глазном дне различной тяжести, в основном, ситуация не изменилась (96% из 72-х), а в оставшихся 3-х случаях (4%) наблюдалось ухудшение состояния, причиной чего явились повышенные уровни глюкозы крови и АД.

Исходя из вышеизложенного, рекомендуем включить кандесартан в стандартную схему лечения пациентов с СД, т.к. он оказывает выраженный положительный эффект на течение микроангиопатии, независимо от пола пациента.

## RESTORING MOVEMENT TO PARALYZED LIMBS BY TREATING NERVE ROOT AVULSION: A SEVEN YEAR RETROSPECTIVE

Dididze M.

*Department of Neurology, Tbilisi State Medical University;  
The Miami Project to Cure Paralysis, University of Miami*

Traumatic injury of major nerve root of upper and lower extremities paralyzes the limb and causes the high degree of disability [1-3]. In addition to motor and sensory deficit severe trophic disturbances significantly worsens the condition of the patient and in some cases may result in amputation [4-5]. In last decade the number of nerve trauma increased in Georgia. Although there has been increasing enthusiasm in various nerve transfer methods to restore the limb function in recent years, the treatment strategies and the outcomes are still questionable [6].

The aim of the study was to evaluate outcomes of surgical treatment of upper and lower limb nerve root avulsion using various microsurgical techniques to reconstruct the function of the extremity.

**Material and methods.** 31 contralateral nerve transfer surgeries were performed on 17 patients (a mean age of 22 years) with upper and lower extremities nerve root avulsion: 15 with brachial plexus and 2 with lumbosacral plexus traumas. The patients were treated by nerve transfers: partial ulnar to median (n=2), thoracodorsal to musculocutaneous (n=14), spinal accessory to suprascapular (n=7), spinal accessory to axillary (n=5) and partial ulnar to femoral (n=3) with or without interposition

nerve grafting. The surgical outcomes were evaluated by neurological and electromyographic (EMG) examinations at an average follow-up of 7 years [5-9]. To assess return of hand function Medical Research Council (MRC) grading systems were used [7]; to evaluate the leg's functional recovery we used our own system developed previously, based on motor, sensory, trophic grading assessments and gait function [8-11]. All cases with >M3 were considered as excellent results. EMG examination was performed before and after surgery in dynamics to study motor and sensory nerve conduction velocity, amplitude of compound muscle and sensory nerve action potentials.

**Results and their discussion.** Transfer of thoracodorsal to musculocutaneous nerve provided excellent recovery of elbow flexion in 12 patients and good in 2; excellent restoration of shoulder external rotation was obtained in 2 cases of spinal accessory to suprascapular transfer, good in 3 and satisfactory in 1; while spinal accessory to axillary transfer revealed 3 good, 1 satisfactory and 1 poor recovery in abduction. When partial ulnar transfer was used functional restoration of the recipient area reached 2 good, 1 satisfactory result in cases of recipient femoral nerve and 1 satisfactory, 1 poor in cases of recipient median nerve (Table).

*Table. Treatment outcomes in relation to performed nerve transfer*

Nerve transfer	Number	Results			
		Excellent	Good	Satisfactory	Poor
Thoracodorsal to musculocutaneous	14	12	2	-	-
Spinal accessory to axillar	5	-	3	1	1
Spinal accessory to suprascapular	7	2	3	2	-
Partial ulnar to median	2	-		1	1
Partial ulnar to femoral	3	-	2	1	-
Total	31	14	10	5	2

Interpositional grafting was used in all nerve transfer cases except partial ulnar to median transfer. In long term outcome there was no impairment of donor limb

function. EMG examination revealed increased motor and sensory nerve conduction velocity, amplitude of compound muscle and sensory nerve action potentials.

Traumatic injury with nerve root avulsion or intraforaminal nerve root rupture result in denying a proximal source of motor axons for nerve graft reconstruction. The extreme proximal location of these injuries indicates on a long distance from the distal motor end-plate. Thus any technique to decrease the regeneration distance between viable proximal motor axons and the distal motor end-plate will hasten the speed of reinnervation and the quality of clinical result [12].

Donor nerve selection to restore paralyzed limb function depends of anatomy and human ingenuity. The selection of the ideal donor nerve should consider: The donor nerve should be of sufficient length for coaptation to the recipient nerve; the functional loss resulting from transfer of the donor nerve should be relatively much less than the expected function of the recipient nerve; the diameter of the donor and recipient nerves should be similar [13-14].

The current study is based on the results of our previous work that proved the contralateral nerve transfer capability to restore paralyzed limb function after nerve root avulsion in experiment [5,15-19]. Higher excellent and good outcomes received after thoracodorsal to musculocutaneous, spinal accessory to suprascapular or axillary in comparison to ulnar to median or femoral transfer could be explained by: the shorter distance, the differences in diameter and the fact that connecting motor axons to a pure motor recipient nerve is more likely to result in desired function compared with coapting a mixed motor-sensory nerve to a mixed motor-sensory recipient nerve [12]. Spinal accessory to suprascapular nerve transfer revealed better shoulder abduction than in case of spinal accessory to axillary transfer, that are shown also in previous studies [20-21]. Cases of paraplegia in spinal cord injury are the subject of current research at the Miami Project to Cure Paralysis.

Contralateral nerve transfer represents a reliable and potent neurotizer that allows restoration of paralyzed limb function in surgical treatment of nerve root avulsion. The selection of the donor nerve should be based on availability, technical simplicity and timing after surgery. Early surgeries reveal the better outcome.

## REFERENCES

1. Terzis J.K., Kostopoulos V.K. The surgical treatment of brachial plexus injuries in adults. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 119(4):73e-92e.

2. Narakas A.O., Hentz V.R. Neurotization in brachial plexus injuries. Indication and results. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 237: 43-56.
3. Millesi H. Surgery of post-traumatic brachial plexus lesions (personal approach in 2003). *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2004 36(1):29-36. German.
4. Brunelli G.A., Brunelli G.R. Restoration of walking in paraplegia by transferring the ulnar nerve to the hip: A report on the first patient. *Microsurgery.* 1999; 19(5):223-6.
5. Dididze M.N. Clinical and electrophysiological (EMG) correlations in sciatic, tibial and peroneal nerves injury. Ph.D. thesis. 2001:137.
6. Bertelli J.A., Ghizoni M.F. Concepts of nerve regeneration and repair applied to brachial plexus reconstruction. *Microsurgery* 2006; 26(4):230-44.
7. Omer G.E.Jr. Report of the committee for evaluation of the clinical result in peripheral nerve injury. *J Hand Surg Am.* 1983; 8(part 2):754-758.
8. Dididze M., Kuzanov I., Kutubidze A., Ioseliani G. Outcomes of surgical treatment of traumatic injury of peripheral nerves. *Annals of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 2005; 3:69-70 (in Russian).
9. Dididze M. Clinical-electrophysiological assessment of surgical treatment of the lower limb peripheral nerves injuries. *Georgian Medical News* 2000; 1(58):41-3 (in Russian).
10. Dididze M., Kuzanov I., Kutubidze A. Neurophysiologic and clinical outcome following sciatic, tibial and peroneal nerve reconstruction. Abstract book of 10<sup>th</sup> Congress of the European Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Vienna, Austria: 2005:179.
11. Dididze M. Sciatic, tibial and peroneal nerves injury: postoperative assessment of limb function. *Journal of the Neurological Sciences* 2001;187(1):S170.
12. Wood M.B., Murray P.M. Heterotopic nerve transfers: recent trends with expanding indication. *J Hand Surg (Am.)* 2007; 32(3): 397-408.
13. Midha R. Nerve transfers for severe brachial plexus injuries: a review. *Neurosurg Focus.* 2004; 16(5): E5.1-10.
14. Frey M. Avulsion injuries to the brachial plexus and the value of motor reinnervation by ipsilateral nerve transfer. *J Hand Surg (Br).* 2000; 25(4):323-4.
15. Dididze M. New approach in limb function restoration at a root avulsion from spinal cord in experiment. *Georgian Medical News.* 2000;4(61):14-7 (in Russian).
16. Dididze M. Experimental research of reinnervation paths at a root avulsion from spinal cord. BSEC II International Conference, Trabzon, Turkey. Proceedings:2000:24-6.

17. Dididze M., Kuzanov I., Kutubidze A., Jikidze J., Ioseliani G. Patient outcome following traumatic brachial plexus reconstruction. Abstract book of 10<sup>th</sup> Congress of the European Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Vienna, Austria: 2005:181.

18. Dididze M., Kuzanov I., Kutubidze A. Experimental restoration of avulsion injuries: emg assessment. Abstract book of 10<sup>th</sup> Congress of the European Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Vienna, Austria: 2005:114.

19. Dididze M. Indications of lower extremity nerve grafting. European Journal of Neurology 2002; 9(2): 77.

20. Bertelli J.A., Ghizoni M.F. Reconstruction of C5 and C6 brachial plexus avulsion injury by multiple nerve transfers: spinal accessory to suprascapular, ulnar fascicles to biceps branch, and triceps long or lateral head branch to axillary nerve. J Hand Surg (Am). 2004; 29(1):131-9.

21. Terzis J.K., Kostas I. Suprascapular nerve reconstruction in 118 cases of adult posttraumatic brachial plexus. Plast Reconstr Surg. 2006; 117(2):613-29.

## SUMMARY

### RESTORING MOVEMENT TO PARALYZED LIMBS BY TREATING NERVE ROOT AVULSION: A SEVEN YEAR RETROSPECTIVE

**Dididze M.**

*Department of Neurology, Tbilisi State Medical University; The Miami Project to Cure Paralysis, University of Miami*

Traumatic injury of major nerve roots of extremities paralyzes the limb and causes high degree of disability. The aim of the study was to evaluate outcomes of surgical treatment of upper and lower limb nerve root avulsion using various microsurgical techniques to reconstruct the function of the extremity.

31 contralateral nerve transfer surgeries were performed on 17 patients with upper and lower extremities nerve root avulsion. Neurological and EMG examinations were carried out. To assess the return

of function in the patient's hand Medical Research Council grading systems were used; to evaluate the return of function in the patient's leg we developed special microsurgical techniques. Excellent and good outcomes were received after thoracodorsal to musculocutaneous, spinal accessory to suprascapular or axillar in comparison to ulnar to median or femoral transfer. Spinal accessory to suprascapular nerve transfer revealed better shoulder abduction than in case of spinal accessory to axillary transfer.

It is concluded that contralateral nerve transfer represents a reliable and potent neurotizer that allows restoration of paralyzed limb function in surgical treatment of nerve root avulsion. Early reveal the better outcome.

**Key words:** nerve root avulsion; paralyzed limbs, contralateral nerve transfer.

## РЕЗЮМЕ

### ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИЖЕНИЙ ПАРАЛИЗОВАННЫХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ ОТРЫВЕ КОРЕШКОВ НЕРВОВ: РЕТРОСПЕКТИВА СЕМИ ЛЕТ НАБЛЮДЕНИЙ

**Дидидзе М.Н.**

*Тбилисский государственный медицинский университет, кафедра нервных болезней; Майямский проект лечения паралича, Университет Майями*

Несмотря на значительный прогресс в области хирургической реконструкции конечностей, проблема оптимального варианта метода реконструкции парализованной функции остается актуальной.

В работе представлены результаты пересадки у 17-и пациентов с разрывом нервных сплетений, травмой нервных корешков верхних и нижних конечностей. Пересадка позволила реставрировать функцию парализованной конечности. Наилучшие результаты получены при реинервации поврежденного моторного ствола донорским моторным нервом.