

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«ФГБНУ общей патологии и патофизиологии»

Редакция журнала
«Патологическая физиология
и экспериментальная терапия».
Home page: www.jpptet.net
E-mail: path.physiol@yandex.ru

Зав. редакцией
Н.Р.Соболь
+7 906 793 5467
Техническая редакция
А.С.Акопов

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: Иришкин Дмитрий
E-mail: genius-media@mail.ru

Входит в Перечень ведущих рецензируе-
мых научных журналов и изданий,
рекомендованных ВАК России для пуб-
ликации значимых результатов диссертаци-
он на соискание ученой степени докто-
ра и кандидата наук.

5-летний ИФ РИНЦ 2015 0,690

Журнал включен в базу данных Scopus

Журнал «Патологическая физиология и
экспериментальная терапия» индексиру-
ется в следующих иностранных изданиях:
PubMed; medline; Excerpta Medica;
Apicultural Abstracts; Biological Abstracts;
Biotechnology Research Abstracts;
Chemical Abstracts; Index to Dental Literature;
International Aerospace Abstracts;
Nutrition Abstracts and Reviews;
Ulrich's International Periodicals Directory

Подписной индекс по каталогу
агентства «Роспечать»: **71456**

Сдано в набор 17.02.2016 г.
Подписано в печать 20.02.2017 г.

ISSN 0031-2991
Пат. физиол. и Экспер. тер.
2017. Том 61. № 3. 1—

Перепечатка материалов и использование их в
любой форме, в том числе и в электронных СМИ,
возможны только с письменного разрешения из-
дателя.
За содержание рекламных публикаций
ответственность несет рекламодатель.

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2017.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НИИ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»**

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

*Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
Основан в 1957 г.*

ТОМ 61, № 3, 2017

июль—сентябрь

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,
И.С. Гушин (зам. главного редактора), А.В. Ефремов,
В.Б. Кошелев, Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев,
П.Ф. Литвицкий, В.В. Новицкий,
Ю.А. Петрович, Г.В. Порядин,
В.К. Решетняк (зам. главного редактора)

Редакционный совет

Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
Ф. Дауни (США), В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),
Д.А. Еникеев (Уфа), В.П. Куликов (Барнаул),
В.П. Михайлов (Ярославль), В.Г. Овсянников (Ростов-на-Дону),
С.Н. Орлов (Москва), Н.Н. Петрищев (Санкт-Петербург),
Л.А. Северьянова (Курск), В. Шварц (Германия),
А.П. Ястребов (Екатеринбург)

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

Home page: www.jppet.net
E-mail: path.physiol@yandex.ru

ЛР №010215 от 29.04.97.

E-mail: genius-media@mail.ru

ИФ РИНЦ 2015 0,690

ISSN 0031-2991
Pathological
physiology
and experimental
therapy
2017. Vol. 61. № 3. 1–

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

Pathological physiology and experimental therapy

*Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol. 61, № 3, 2017

July—September

Editor in chief B.B. Moroz

Assistant editors in chief:

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

Executive editor, scientific editor: N.S. Gourko

Members of editorial board:

Yu.V. Archipenko, E.I. Astashkin, S.V. Grachev,
T.A. Guskova, A.V. Efremov, V.B. Koshelev,
N.A. Krupina, A.A. Kubatiev, P.F. Litvitskiy,
V.V. Novitskiy, Yu.A. Petrovich,
G.V. Poryadin

Staff

Yu.V. Balyakin (Moskva), Yu.Yu. Byalovskiy (Ryazan),
F. Downey (USA), V.T. Dolgikh (Omsk), A.M. Dygay (Tomsk),
D.A. Enikeev (Ufa), V.P. Kulikov (Barnaul),
V.P. Mikhailov (Yaroslavl),
V.G. Ovsyannikov (Rostov-na-Donu), S.N. Orlov (Moskva),
N.N. Petrishchev (Sankt-Peterburg),
L.A. Severyanova (Kursk), V. Shvarz (Germany),
A.P. Yastrebov (Ekaterinburg)

Moscow

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2017.

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Богданенко Е.В., Жданов Р.И.** Перенос *in vivo* гена β-галактозидазы с помощью амфифильных и комбинированных липосом 4
- Перцов С.С., Беляева Е.В., Абрамова А.Ю.** Динамика ноцицептивной чувствительности крыс после введения мелатонина в норме и при длительном стрессорном воздействии 10
- Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н.** Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты при введении кормящим крысам модулируют поведение крысят, перенесших стрессирование путем многократного введения физиологического раствора в неонатальном периоде 17
- Ветрилэ Л.А., Невидимова Т.И., Мастерова Е.И., Бохан Н.А., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Фомина В.Г., Давыдова Т.В.** Антитела к нейромедиаторам — нейроиммунные маркеры в персонализированной профилактике болезней зависимости 31
- Ветлугина Т.П., Матафонова Е.В., Бохан Н.А., Никитина В.Б., Мандель А.И., Лобачева О.А.** Параметры иммунитета и уровень кортизола у больных опиоидной наркоманией при синдроме отмены 38
- Черешнев В.А., Самоделькин Е.И., Косарева П.В., Сивакова Л.В., Шилов Е.Ю., Федык О.В., Хоринко В.П.** Морфологические изменения в центральных и периферических органах иммуногенеза при моделировании токсической гемолитической анемии на фоне острого холодового стресса 46
- Хобракова В.Б., Цыренова Д.З., Оленников Д.Н.** Иммуномодулирующая активность форситозида В при экспериментальной иммуносупрессии 52
- Герасимова-Мейгал Л.И., Сиренев И.М.** Холод-индуцированная реактивность у пациентов с рассеянным склерозом 57
- Березовская Г.А., Лазовская Т.В., Петрищев Н.Н.** Вариабельность показателей тромбogramма теста генерации тромбина 64
- Фоменко О.Ю., Шельгин Ю.А., Порядин Г.В., Титов А.Ю., Берсенева Е.А., Мудров А.А., Белоусова С.В.** Утомляемость мышц наружного анального сфинктера у пациентов с анальной инконтиненцией 70
- Долгих В.Т., Пянова Л.Г., Долгих Т.И., Лихолобов В.А., Корпачева О.В., Седанова А.В., Золотов А.Н., Таран Н.И.** Антибактериальная активность гранулированных углеродных сорбентов 77
- Гордиенко А.И., Кубышкин А.В., Гордиенко А.И., Кубышкин В.А.** Нарушения антиэндоксиновой защиты у больных лейкоемией и миелодиспластическим синдромом 84
- Маркелова М.М., Рюмина И.И., Салахов И.М., Яковлев М.Ю.** Системная эндотоксинемия и показатели жирового обмена у новорожденных детей: одномоментное исследование 92
- Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Срубиллин Д.В., Репина Э.Ф., Гимадиева А.Р., Габдрахманова И.Д.** Защита печени оксиметилурацилом и производными янтарной кислоты при воздействии тетрахлорметана в эксперименте 98
- Венгерович Н.Г., Юдин М.А., Чепур С.В., Иванов И.М., Строкина Е.И., Колесников А.М.** Исследование функции дыхания при применении тримеперидина в составе комбинированной рецептуры на модели экспериментальной взрывной травмы 104

ОБЗОРЫ

- Пальцын А.А.** Матриксные протеиназы при инсульте 111
- Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О.А.** Функциональные грани дофаминергической системы и рак (часть 1) 119
- Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О.А.** Функциональные грани дофаминергической системы и рак (часть 2) 130

ИНФОРМАЦИЯ

- Требования к рукописям, направляемым в журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» 137

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Bogdanenko E.V., Zhdanov R.I.** Delivery of β-galactosidase gene *in vivo* with amphiphilic and combined liposomes 4
- Pertsov S.S., Belyaeva E.V., Abramova A.Yu.** Dynamics of nociceptive sensitivity in rats after melatonin treatment under normal conditions and during long-term stress exposure 10
- Krupina N.A., Khlebnikova N.N.** Omega-3 polyunsaturated fatty acids when administered to lactating rats modulate the behavior in rat pups exposed to neonatal stress induced by repeated saline administration 17
- Vetrlie L.A., Nevidimova T.I., Masterova E.I., Bokhan N.A., Zakharova I.A., Savochkina D.N., Fomina V.G., Davydova T.V.** Antibodies to neurotransmitters — neuroimmune markers in individual prevention of addiction 31
- Vetlugina T.P., Nikitina V.B., Mandel A.I., Matafonova E.V., Lobacheva O.A., Bokhan N.A.** Immune parameters and level of cortisol in patients with opiate addiction during withdrawal syndrome 38
- Chereshnev V.A., Samodelkin E.I., Kosareva P.V., Sivakova L.V., Shilov Yu.I., Fedyk O.V., Khorinko V.P.** Morphologic changes in the central and peripheral organs of immunogenesis in modeling of toxic hemolytic anemia associated with an acute cold stress 46
- Khobrakova V.B., Tsyrenova D.Z., Olennikov D.N.** Immune modulating activity of forsythoside B at experimental immune suppression 52
- Gerasimova-Meigal L.I., Sirenev I.M.** Cold-induced reactivity in multiple sclerosis patients 57
- Berezovskaya G.A., Lazovskaya T.V., Petrishchev N.N.** Variability trombogram test thrombin generation 64
- Fomenko O.Yu., Shelygin Yu.A., Poryadin G.V., Titov A.Yu., Berseneva E.A., Mudrov A.A., Belousova S.V.** The muscle fatigue of external anal sphincter in patients with anal incontinence 70
- Dolgikh V.T., Pjanova L.G., Dolgikh T.I., Licholobov V.A., Korpacheva O.V., Sedanova A.V., Zolotov A.N., Taran N.I.** Antibacterial activity of granulated carbon sorbents 77
- Gordienko An.I., Kubyshkin V.A., Gordienko Al.I., Kubyshkin V.A.** The humoral immune response to endotoxin in patients with leukemia and myelodysplastic syndrome 84
- Markelova M.M., Ryumina I.I., Salakhov I.M., Yakovlev M.Yu.** Systemic endotoxemia and fat metabolism in newborns: a cross-sectional study 92
- Myshkin V.A., Enikeev D.A., Srubilin D.V., Repina E.F., Gimadieva A.R., Gabdrakhmanova I.D.** Protection of the liver by oxymethyluracil and derivatives of succinic acid at influence of tetrachlormethane in the experiment 98
- Vengerovich N.G., Judin M.A., Chepur S.V., Ivanov I.M., Strokina E.I., Kolesnikov A.M.** The study of respiration function under trimeperidine treatment in composition of combined formulation in a model of experimental blast injury 104

REVIEWS

- Paltsyn A.A.** Matrix metalloproteinases in stroke 111
- Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Bocharova O.A.** Functional facets of dopaminergic system and cancer. Part 1 119
- Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Bocharova O.A.** Functional facets of dopaminergic system and cancer. Part 2 130

INFORMATION

- Guidelines for authors 137

© Коллектив авторов, 2017
УДК 577.126:615.272.6+543.645.4

Богданенко Е.В.¹, Жданов Р.И.^{2,3}

Перенос *in vivo* гена β -галактозидазы с помощью амфифильных и комбинированных липосом

¹ ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² Институт фундаментальной медицины и биологии и Общеуниверситетская кафедра физического воспитания и спорта, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань, Россия, ул. Кремлевская, д. 18

³ Институт перспективных исследований, Московский педагогический государственный университет, 119571, г. Москва, Россия, пр. Вернадского, д. 88

Цель исследования. Получение безопасного и эффективного вектора в целях генной терапии остается актуальной и нерешенной задачей, несмотря на усилия многих лабораторий в мире. Синтез веществ, имеющих сродство к ДНК и стабилизирующих ее спираль, а также обладающих группировками, опознаваемыми клетками нужных органов, является одним из перспективных направлений в таких исследованиях. Целью данной работы было изучение эффективности переноса в различные органы мышей репортерного гена бактериальной β -галактозидазы липосомами, содержащими синтетические холестериновые производные олигоэтиленпропиленмина (дихоленим и трихоленим), а также лактозилированный диглициерид (лактозолипид, LacS). **Методика.** Предварительно электронномикроскопически была подтверждена способность холенимов образовывать комплексы с ДНК оптимальных для трансфекции размеров (100—200 нм). Проверка холенимов на токсичность *in vivo* и введение липосом (фосфатидилхолин (ФХ)/дихоленим, ФХ/трихоленим и ФХ/лактозолипид/дихоленим в комплексе с плазмидой pCMV-SPORT- β -gal) в воротную вену печени проводились на самцах мышей ICR массой 30—40 г. Контролем служили интактные животные. **Результаты.** Способность холенимов образовывать комплексы с ДНК была подтверждена электронными микрофотографиями. Размеры комплексов (100—200 нм) оказались оптимальными для трансфекции *in vivo*, а холенимы — нетоксичными. Через 2 сут. после введения комплексов гистохимически на криосрезях внутренних органов животных с X-Gal (субстрат) обнаружена отчетливо выраженная трансфекция органов, в том числе печени — главного объекта генной терапии. **Заключение.** Лактозилированный липид LacS и производные олигоэтиленпропиленмина холенимы являются безопасными, не менее и эффективными для достижения экспрессии функционального гена *in vivo*, чем коммерческие препараты, и перспективными для эффективной адресной доставки генов.

Ключевые слова: мыши, производные олигоэтиленпропиленмина; лактозилированные липосомы; генный перенос; адресная доставка; воротная вена; гистохимическая реакция; холеним

Для цитирования: Богданенко Е.В., Жданов Р.И. Перенос *in vivo* гена β -галактозидазы с помощью амфифильных и комбинированных липосом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 4—9.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.4-9

Для корреспонденции: Жданов Ренат Ибрагимович, доктор хим. наук, проф., e-mail: zrenad@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ К(П)ФУ, в сфере научной деятельности 2015—2017 гг., бюджет № 19.9777.2017/БЧ г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарны академику В.В. Власову (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск) за предоставление веществ холеним и профессору Ю.Л. Себякину (МИТХТ, Москва) за предоставление гликолипида, А.Г. Погорелову за электронные микрофотографии липосом.

Поступила 18.12.2016

Bogdanenko E.V.¹, Zhdanov R.I.^{2,3}

Delivery of β -galactosidase gene *in vivo* with amphiphilic and combined liposomes

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiiskaya St., Moscow 125315

² Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga region) Federal University, 18, Kremlin St., Kazan 420008

³ Russian Institute of Advanced Study, Moscow Pedagogical State University, 88, Vernadsky Pr., Moscow, 119571

The purpose of the work. Receipt of safe and effective vector for the purpose of genetic therapy remains the topical and unsolved problem inspite of many laboratories efforts in the world. Synthesis of substances which have affinity to DNA and stabilize its helix and also have the moieties recognized with the cells of the desired organs is one of the perspective ways in these investigations. Study of the effectivity of β -galactosidase bacterial reporter gene transfer with liposomes containing syn-

thetic cholesteroyl derivatives of the oligoethylen/propylen/imine dicholenim and tricholenim and also lactosylated diglycerid (lactosolipid, LacS) to mouse organs was the purpose of this work. **Methods.** Previously ability of cholenims to form complexes with DNA of the optimal for transfection size (100—200 nm) was confirmed by electron microscopy technique. Testing the non-toxicity of cholenims *in vivo* and injections of phosphatidylcholine(Ph)/dicholenim, Ph/tricholenim and Ph/lactosolipid/dicholenim liposomes complexed with the pCMV-SPORT- β -gal plasmid to the liver portal vein were carried out on the mouse males of the ICR strain of 30—40 g of weight. The intact animals were as a control. **Results.** The ability of cholenims to form complexes with DNA was confirmed with electron micrographs. Complex sizes (100—200 nm) were optimal for *in vivo* transfection, and hollenims were found non-toxic ones. The well-marked transfection of the animal's inner organs including liver which is the main target of the genetic therapy was detected in two days after injection of the complexes by histochemical reaction of the cryosections with X-Gal and the consequent light microscopy of the sections. **Conclusion.** It is concluded that the lactosylated lipid LacS and the oligoethylen/propylen/imine derivatives cholenims are not less safe and effective for achieving expression of the functional gene *in vivo* than the commercial ones and are promising for the effective targeted gene delivery.

Keywords: mice; derivatives of oligoethylen/propylene/imine; lactosylated liposomes; gene delivery; targeting; portal vein; histochemical reaction; cholenims.

For citation: E.V. Bogdanenko, R.I. Zhdanov. Delivery of β -galactosidase gene *in vivo* with amphiphilic and combined liposomes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 4—9. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.4-9

For correspondence: Renad I. Zdanov, Doctor of Chemical Sciences, Chief Scientist of Chair of Biochemistry and Biotechnology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga region) Federal University, 18, Kremlin St., Kazan 420008; Russian Federation; e-mail: zrenad@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation to Kazan Federal University in the field of scientific activity, 2015—2017, theme № 19.9777.2017/БЧ.

Acknowledgements. Author is grateful to Prof. Dr. N. Duzgunes for gift of plasmid pCMV-SPORT- β -gal, to Prof. Dr. V.V. Vlassov (Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, the author of CHOLENIM's synthesis), to Prof. Dr. G.A. Serebrennikova and Dr. Yu.L. Sebyakin (MITHT) for gift of glycolipid and Dr. A.G. Pogorelov for nanoparticle images.

Information about authors: Bogdanenko E.V., <http://orcid.org/0000-0002-3351-3316>

Received 18.12.2016

Введение

Проблема лечения наследственных и приобретенных заболеваний методами генной терапии по-прежнему остается нерешенной, во многом из-за отсутствия необходимых переносчиков генов (векторов). К векторам предъявляются требования образовывать небольшие по размерам комплексы с ДНК (<100 нм) и направленно переносить терапевтические гены в нужные органы [1]. Вирусные векторы более эффективны, чем невирусные, но они небезопасны — могут вызвать инсерционный мутагенез и даже смерть больного вследствие иммунной реакции на их введение [2]. Невирусные векторы пока малоэффективны и в лечении людей не применяются [3, 4]. Первоначальная цель генной терапии — коррекция наследственных дефектов — в последнее время отошла на второй план, и усилия исследователей сосредоточились на поиске векторов, способных доставлять ДНК терапевтических генов, малые интерферционные РНК и микроРНК к различным раковым опухолям [4, 5]. Однако доставка генов в недоступные опухоли и

метастазы, а не просто в ложе удаленной опухоли, пока остается нерешенной проблемой, несмотря на создание различных вирусных и синтетических векторных систем.

При подборе невирусных средств генного переноса должна быть учтена их способность в комплексе с ДНК легко проникать через мембрану клетки, защищать ДНК при транспорте ее в организме, а также от нуклеаз и нежелательного связывания с другими макромолекулами в цитоплазме клетки, когда может произойти утилизация ДНК до того, как станет возможной ее экспрессия.

При применении катионных (фосфо)липидных везикул или липосом для переноса генов ДНК спонтанно связывается с внешней поверхностью катионных липосом, нейтрализуя свой отрицательный заряд, а образующиеся при этом комплексы — липоплексы — взаимодействуют с клеточной мембраной. Таким способом — липофекцией — могут быть трансфицированы более 90% клеточных линий *in vitro* [1]. Однако большинство комплексов ДНК с катионными липидами при использовании *in vivo* оседает в легких,

не попадая в орган-мишень, которым чаще всего является печень. Это явление назвали «эффектом первого прохода» [6]. В настоящее время продолжается поиск веществ, не имеющих этого недостатка. Используемые нами для генного переноса вещества дихоленим и трихоленим содержат группировки, характерные для полиэтиленimina (ПЭИ), показавшего себя активным в генном переносе в ряде работ. Лактозилированный диглицерид, кроме того, содержит лактозную группировку, имеющую сродство к клеткам печени [7, 8]. Эти 3 препарата были исследованы нами как кандидаты в переносчики терапевтических генов посредством электронной микроскопии и введений полученных из них липосом в комплексе с плазмидой, несущей репортерный ген бактериальной β -галактозидазы, в воротную вену печени мышей. Интересно было сравнить результаты, полученные *in vivo* при переносе отдельно дихоленимом и трихоленимом и комбинированными липосомами, которые должны были «унаследовать» полезные свойства оказавшегося более активным при трансфекции *in vitro* дихоленима [7].

Методика

В экспериментах использовались холестериновые производные олигоэтиленпропиленimina — дихоленим и трихоленим, и лактозилированный диглицерид — дигексадецил-2- β -D-тиолактозил-сукцинат (LacS) [7, 8]. Холестерин (Fluka) применялся как липид-помощник для формирования липосом. Холенимы сначала соединяли с водно-глицериново-спиртовой смесью (в объемных отношениях 41:34:25) при ультразвуковой 10-минутной обработке (УЗДН-4 — макс. мощность 35 кГц, периоды 1 мин работы/30 с пауза). Липосомы из них были получены по методу упаривания из обращенной фазы [9]. Раствор липида и липида-помощника по каплям вливали в подогретую в круглодонной колбе на водяной бане до 50—60°C стерилизованную (автоклавируемую) деионизованную воду (Milli-Q, Millipore, USA) при интенсивном помешивании на «Vortex» (средняя скорость добавления — 1 мл/мин). Процесс сопровождается вскипанием раствора. Операцию повторяли до исчезновения раздела фаз и получения жидкости, имеющей однородный опалесцирующий вид.

При получении сложной композиции ФХ/лактолипид/дихоленим таким же образом в воду добавляли растворы гликолипида, ФХ и дихоленима в хлористом метиле. Процесс повторяли до прекращения испарения остатков растворителя и приобретения эмульсией соответствующего вида. Сначала все растворы, содержащие липосомы, упаривали с помощью вакуумного роторного испарителя примерно до объе-

ма 1 мл, а затем их объем доводили деионизованной водой до необходимой концентрации. Липосомы продували азотом в течение 10 мин. и хранили в герметично закрытой посуде при 4°C.

Для получения электронных микрофотографий липоплексов холеним/ДНК использовались плазмидная ДНК (плазида pCMV-SPORT- β -gal, 7,2 kb) и электронный микроскоп JEM 100B при ускоряющем напряжении 80 кВ. С этой целью аликвоту липоплекса помещали на медную сетку, покрывтую пленкой коллодия, и высушивали. Его избыток удаляли, а остаток контрастировали 4% водным раствором уранил нитрата. После удаления красителя пленку просушивали при комнатной температуре. Электронные микрофотографии получали на фотопластинках фирмы «Kodak».

Плазида pCMV-SPORT- β -gal (7,2 kb) получена от проф. Н. Дюзгюнеша (Dr. N. Duzgunes, San Francisco, USA) и наработана в необходимых количествах по соответствующим методикам как описано ранее [10]. Для формирования комплексов аликвоту раствора плазмидной ДНК смешивали с липосомами, осторожно встряхивали смесь и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. В эксперименте использовались мыши линии ICR 10—12-недельного возраста, массой 30—40 г, которые содержались при конвенциональных условиях по 5 животных в клетке.

Введение комплексов в воротную вену печени мышам проводилось по описанной ранее методике под общим наркозом (введение препарата «Авертин») [10]. Контролем служили интактные животные. Животных выводили из опыта через 2 сут. после введения комплексов дислокацией шейных позвонков, в соответствии с инструкцией American Physiological Society (1995 г.).

Для гистохимического исследования сразу после вскрытия органы мышей замораживали при -80°C. Криостатные срезы органов толщиной 25 мкм монтировали на предметном стекле. На них наносили 200 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с pH 7,5, содержавшего X-Gal (6 мг/мл), MgSO₄ (1 мМ/л), 4 мМ K₄[Fe(CN)₆] и 4 мМ K₃[Fe(CN)₆]. Срезы органов инкубировали с субстратом X-Gal [1]. Стекла во влажной камере помещали в термостат на 37°C и фиксировали время развития окрашивания (30—50 мин). После этого стекла со срезами погружали в 2,5% глутаровый альдегид на 2 ч при +4°C. Для визуализации клеточных структур (главным образом ядер) срезы докрашивали гематоксилином. Далее после обезвоживания и просветления в о-ксилоле срезы заключали в канадский бальзам. Микрофотографии получали с помощью Axioskop 20 Carl Zeiss.

Результаты и обсуждение

Перед использованием холенимов для генного переноса были охарактеризованы их физико-химические свойства, для чего применялась спектрофотометрия (УФ-плавление ДНК) и спектрофлуориметрия с пиреном как флуоресцентным зондом. Оказалось, что холенимы образуют компактные и стабильные комплексы с геномной ДНК. Стабилизирующий эффект у дихоленима был несколько выше, чем у трихоленима, что связано с величиной заряда молекул — +1 у дихоленима и 0 у трихоленима [7]. Образование комплексов при смешивании этих веществ с плазмидной ДНК должно подтвердить контрастирование уранил-нитратом образующихся при этом частиц, так как это вещество связывается с ДНК и делает его видимым на электронных микрофотографиях. Действительно, как ди-, так и трихоленим по данным электронной микроскопии оказались способными образовывать комплексы с ДНК. Они имели форму, близкую к сферической, и средний диаметр 100—200 нм (рис. 1, А и Б соответственно), хотя некоторые частицы достигали размеров 300 нм. Этот результат подтвердил предположение, что при нейтральных рН положительно заряженные части молекул холенимов (аминогруппы) должны вступать в электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, то есть участвовать в комплексообразовании с ДНК и ее стабилизации. Оба холенима не проявляли сколько-нибудь существенной цитотоксичности *in vitro* [10]. Для оценки их токсичности *in vivo* липосомы ФХ/дихоленим и ФХ/трихоленим вводились мышам внутривенно в дозах 50, 100 и 150 мг. В первых двух случаях не наблюдалось каких-либо видимых повреждений внутренних органов и ухудшения состояния животных. Доза 150 мг вызывала появление кровоизлияний на поверхности печени, увеличение размеров почек и селезенки (не могла быть использована из-за слишком большого объема).

Амфифильные липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и дихоленима (1:1 по массе), а также фосфатидилхолина и трихоленима (1:1 по массе), использовали для переноса гена β -галактозидазы при соотношении липид/ДНК 1,6:1 (по массе). Доза плазмидной ДНК составляла 50 мкг на мышь, объем вводимого комплекса ДНК/липосомы — 100 мкл. Через 2 сут. после введения липокомплексов в воротную вену печени подопытных животных умерщвляли. Экспрессия модельного гена β -галактозидазы в их органах была обнаружена гистохимически при ее тестировании предварительно растворенным в диметилсульфоксиде субстратом X-Gal (6 мг на 200 мкл). После инкубации срезов органов с этим субстратом, который под действием β -галактозидазы разлагается с выделением ярко-синего красителя индиго, появилось синее окрашивание во всех исследуемых внутренних органах мышей — легких, печени, селезенке и почках. На гистологических пре-

паратах экспрессия наблюдалась преимущественно в клетках эндотелия сосудов и ближайших к ним клетках, что свидетельствует о проницаемости эндотелия для комплексов. Наиболее выразительные микрофотографии для легких были получены после использования липосом ФХ/дихоленим. При использовании комплексов с липосомами ФХ/трихоленим значительная экспрессия модельного гена в печени выражалась в интенсивном окрашивании с помощью X-Gal пучков сосудов, максимальном среди всех препаратов (рис. 2). Интересно, что биораспределение комплексов [^{14}C]-ДНК/трихоленим (1:1 w/w) после их введения в воротную вену печени также обнаруживало их тропизм к этому органу, и максимум ^{14}C -ДНК был обнаружен в печени (25% от всей метки) [11]. Вследствие присутствия в молекуле трихоленима 3 холестеринных остатков возможно его сильное взаимодействие с мембранами эритроцитов с нарушением их структуры. Так как в печени осуществляется утилизация материала разрушенных эритроцитов, это может быть причиной повышенного включения метки и плазмиды в этот орган. Срезы легких, печени и селезенки контрольных животных давали незначительное равномерное окрашивание при их инкубации с X-Gal (рис. 3). Почки обнаруживали эндо-

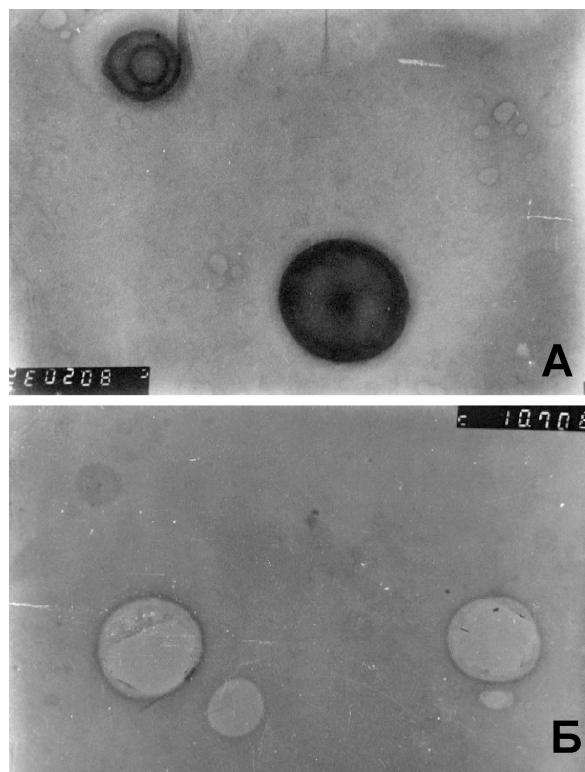


Рис. 1. Электронные микрофотографии комплексов ХОЛЕНИМов с плазмидой:

А — дихоленим/pCMV-SPORT- β -Gal; Б — трихоленим/pCMV-SPORT- β -Gal. Контрастирование 4% водным раствором уранил нитрата. Электронный микроскоп JEM 100В, ускоряющее напряжение 80 кВ.

генную активность β-галактозидазы, затрудняющую оценку эффективности экзогенного фермента, т.е. давали интенсивную окраску срезов как в опыте, так и в контроле, особенно при увеличении времени экспонирования с X-Gal.

Поскольку лактозолипиды достаточно эффективно и специфично связываются с галактозосвязывающим лектином из *Ricinus communis* (RCA₁), являющимся аналогом специфического лектина гепатоцитов печени человека и животных, липосомы с экспонированными на поверхности остатками D-галактозы можно применять для повышения уровня захвата клетками печени их комплексов с ДНК [8]. Использованный нами модифицированный лактозолипид LacS содержит лактозную группировку в качестве углеводного маркера, которая должна была распознаваться рецепторами гепатоцитов и усилить экспрессию переносимого гена в печени. Он был включен в состав комбиниру-

ванных полибислоидных липосом фосфатидилхолин/лактозолипид/дихоленим. Они были сформированы из ФХ (70 mol %), LacS (20 mol %) и дихоленима (10 mol %) и использовались в соотношении с плазмидой 1,6:1 по массе. Доза плазмидной ДНК составляла 50 мкг на мышшь, объем вводимого комплекса ДНК/липосомы — 100 мкл.

Значительным уровнем экспрессии гена Lac Z был выявлен в селезенке и легких, что соответствовало данным по количественному определению активности фермента в разных органах спектрофотометрически [8]. Однако того уровня экспрессии в печени, которого мы ожидали, достигнуть не удалось, возможно, из-за недостаточной проницаемости тканей для таких комплексов (большой плотности паренхимы). При 30—50-мин инкубировании срезов экспрессия проявлялась слабо, а при длительной экспозиции наблюдалось образование индиго в виде очень мелких ярко-голубых гранул не только на опытных, но и на контрольных срезах. Возможно, так проявляет себя эндогенный фермент в цитоплазме клеток печени.

Размер большинства полученных комплексов холенимов с плазмидной ДНК (100—200 нм) является оптимальным для генного переноса *in vivo* [6]. Как большой размер некоторых частиц (около 300 нм), так и фактическая независимость их размеров от молекулярной массы ДНК достаточно необычны. Возможно, что наблюдаемые структуры являются результатом агрегации маленьких мицеллярных частиц при приготовлении препаратов для электронной микроскопии. Похожую картину описывают Chisholm et al. для полипропиленовых дендримеров [12]. Поскольку по строению молекулы холенимов сходны с молекулами этих веществ, хорошо зарекомендовавшими себя в качестве переносчиков генов в исследованиях различных лабораторий, то вполне вероятно, что как ди-, так и трихоленим были бы более эффективными при их использовании в других соотношениях с ДНК или при другом способе введения. Так, после введения мышам в хвостовую вену комплексов с полипропиленовыми дендримерами для экспериментальной генной терапии у них наблюдалась регрессия ксенографтов опухолей эпидермоидной карциномы A431, рака шейки матки, С33а и колоректальной аденокарциномы LS174Т; выживало до 100% подопытных животных [13]. При этом полипропиленовые дендримеры были способны образовывать стабильные комплексы с ДНК и доставлять репортерный ген в печень, а не в легкие при внутривенном введении комплексов [14], как и холенимы, что также подтверждает наше предположение о большей эффективности холенимов при их использовании в других соотношениях с ДНК или другом способе введения.

Холенимы образовывали компактные полиплексы с ДНК (100—200 нм), так же, как сходные с ними по строению полипропиленимины, модифицированные разветвленными олигоэтиленимины, которые оказались не менее и даже более трансфекционно-активными, чем

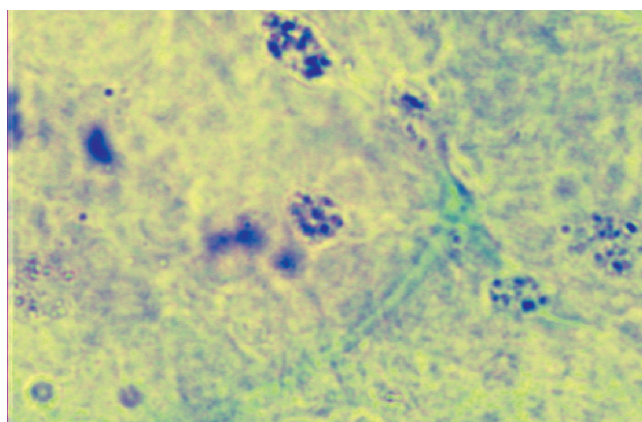


Рис. 2. Срез печени мыши после введения в воротную вену липоплекса из плазмиды и амфифильных липосом ФХ/трихоленим (1:1). Окрашивание X-Gal, докрасивание гематоксилином. Увеличение ×200. AXIOSKOP 20 Carl Zeiss.



Рис. 3. Контрольный срез печени мыши. Окрашивание X-Gal, докрасивание гематоксилином. Увеличение ×200. AXIOSKOP 20 Carl Zeiss.

стандартные полиэтиленимины (как линейные, так и разветвленные), не давали «эффекта первого прохода» и не вызывали агрегации эритроцитов [15]. Эти свойства необходимы для успешной трансфекции *in vivo*.

Что касается использования векторов с углеводными остатками, то получены данные, что полиамидаминозные дендримеры, конъюгированные с полиэтиленгликолем (ПЭГ), лактозой и циклодекстрином, имели высокую трансфекционную активность на клетках HepG2, экспрессирующих асиалогликопротеиновый рецептор. Однако те дендримеры, где было более низкое содержание ПЭГ, имели и более низкую трансфекционную активность в присутствии 20% сыворотки [3]. Таким образом, невысокая эффективность трансфекции нашими комплексами с липосомами фосфатидилхолин/лактозолипид/дихоленом может объясняться их связыванием с белками плазмы крови мышей *in vivo*. Кроме того, некоторые эксперименты со специально помеченными комплексами из плазмидной ДНК и лактозировавшего ПЭИ показывают, что уже через 8 ч после введения *in vivo* они диссоциировали в легких на свои составляющие. Вопреки общепринятому представлению, плазида в основном локализовывалась в лизосомах, а лак-ПЭИ — в ядре, т.е. плазида не была способной преодолевать ядерную мембрану [16]. Возможно, именно этим объясняется, почему почти за 20 лет работы множества лабораторий так и не был создан высокоэффективный невирусный вектор. Этот неожиданный результат показывает необходимость создания плазмиды, способной самостоятельно преодолевать ядерный барьер для дальнейшего продвижения в экспериментах *in vivo*.

Тем не менее, предложенные нами липосомы ФХ/дихоленом, ФХ/трихоленом и ФХ/лактозолипид/дихоленом определяли иную тропность липоплексов к тканям, чем катионные липосомы из коммерческих препаратов (например, Липофектина), дающие «эффект первого прохода». В исследованиях *in vitro* эффективность трансфекции с помощью холенимов и лактозолипида также была на уровне коммерческих препаратов, а иногда выше [11]. Поэтому эти вещества представляются нам перспективными в создании невирусных векторов для направленного транспорта генов в ткани организма.

References

1. Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tasi Y.J., Border R. et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(4): 2550-61.
2. Marshall E. Biomedicine: gene therapy on trial. *Science*. 2000; .288: 951-57.
3. Hayashi Y., Higashi T., Motoyama K., Mori Y., Jono H., Ando Y., Arima H. Design and evaluation of polyami-

doamine dendrimer conjugate with PEG, α -cyclodextrin and lactose as a novel hepatocyte-selective gene carrier *in vitro* and *in vivo*. *J. Drug Target*. 2013; 21(5): 487-96.

4. Yang Y.P., Chien Y., Chiou G.Y., Wang M., Tsai C., Lu K. et al. Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI. *Biomaterials*. 2012; 33(5):1462-76.

5. Abbasi S., Paul A., Prakash S. Investigation of siRNA-Loaded Polyethylenimine-Coated Human Serum Albumin Nanoparticle Complexes for the Treatment of Breast Cancer. *Cell. Biochem. Biophys*. 2011; 61(2): 277-87.

6. Lasic D.D. Liposomes in Gene Delivery. New York: CRC Press; Boca Raton; 1997. 295 P.

7. Zhdanov R.I., Bogdanenko E.V., Podobed O.V., Petrov A.I., Konevets D.N., Vlasov V.V. Lipoplexes based on cholesterol derivatives of oligo(ethylene propylene imines) in gene transfer *in vitro* and *in vivo*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2005; 401(1-6):131-5. (in Russian)

8. Bogdanenko E.V., Zhdanov R.I., Zarubina T.V., Sebyakin Yu.L., Vlasov V.V. A glycolipid containing a lactose residue: a novel agent for targeted DNA delivery for the purpose of genetic therapy. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2005; 401(1-6): 145-49. (in Russian)

9. Duzgunes N., Wilschut J., Hong K., Fraley R., Perry C., Friend D.S. et al. Physicochemical characterization of large unilamellar phospholipid vesicles prepared by reverse-phase evaporation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1983; 732(1): 289-99.

10. Zhdanov R., Bogdanenko E., Moskovtsev A., Podobed O., Duzgunes N. Liposome-mediated gene delivery: dependence on lipid structure, glycolipid mediated targeting, and immunological properties. In: N. Duzgunesh, ed. *Methods in Enzymology Liposomes, Part C: Gene transfer and therapy*. Academic; 2003; 373: 433-65

11. Bogdanenko E.V., Ibragimova M.Ya., Zinnatullina E.T., Shakirova R.I., Khranova A.Y. R.I. Zhdanov. Gene transfer to mice organs using non-viral systems for targeted delivery with different hydrophobicity and with lactose addressing group. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2012; 7; 3: 1-6 (in Russian).

12. Chisholm E.J., Vassaux G., Martin-Duque P., Chevre R, Lambert O, Pitard B. et al. Cancer-specific transgene expression mediated by systemic injection of nanoparticles. *Cancer Res*. 2009; 69(6): 2655-62.

13. Dufes C., Keith W.N., Bilslan A. Proutski I., Uchegbu I.F., Schatzlein A.G. Synthetic anticancer gene medicine exploits intrinsic antitumor activity of cationic vector to cure established tumors. *Cancer Res*. 2005; 65(18): 8079-84.

14. Schatzlein A.G., Zinselmeyer B.H., Elouzi A., Dufes C., Chim Y.T., Roberts C.J. et al. Preferential liver gene expression with polypropylenimine dendrimers. *J. Control Release*. 2005; 101(1-3): 247-58.

15. Russ V., Gunther M., Halama A., Ogris M., Wagner E. Oligoethylenimine-grafted polypropylenimine dendrimers as degradable and biocompatible synthetic vectors for gene delivery. *J. Control Release*. 2008; 132(2): 131-40.

16. Grosse S., Thevenot G., Aron Y., Duverger E., Abdelkarim M., Roche A.C. et al. *In vivo* gene delivery in the mouse lung with lactosylated polyethylenimine, questioning the relevance of *in vitro* experiments. *J. Control Release*. 2008; 132(2): 105-12.

Сведения об авторах:

Богданенко Елена Валентиновна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных основ болезней зависимости, e-mail: lenabogdval@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Перцов С.С.^{1,2}, Беляева Е.В.¹, Абрамова А.Ю.^{1,2}

Динамика ноцицептивной чувствительности крыс после введения мелатонина в норме и при длительном стрессорном воздействии

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² ФГБОУ высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, г. Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

Цель — изучение динамики ноцицептивной чувствительности крыс в разные временные периоды после внутривентрального введения мелатонина (10 мг/кг) в условиях нормы и при однократной длительной стрессорной нагрузке на модели 24-ч иммобилизации. **Результаты.** Установлено, что введение мелатонина приводит к усилению перцептуального компонента ноцицепции животных, выраженность которого возрастает на протяжении 8 сут. наблюдений. На 3-и — 5-е сут. у этих особей выявлено возрастание порога вокализации в ответ на электрокожное раздражение, что иллюстрирует ослабление эмоционального компонента болевой чувствительности. Стрессорное воздействие сопровождалось снижением латентного периода реакции отведения хвоста при светотермальном раздражении, что наблюдалось сразу, а также через 1, 2 и 3 сут. после окончания стрессорного воздействия. В этих условиях увеличение порога вокализации крыс при электрокожной стимуляции обнаружено сразу после стрессорной нагрузки. Указанные изменения характеризуют усиление перцептуального компонента ноцицепции — формирование гипералгезии, но подавление эмоционального восприятия болевого раздражения на ранних стадиях постстрессорного периода. Показано, что экзогенный мелатонин не предупреждает развитие гипералгезии после 24-ч иммобилизации, однако подавляет эмоциональный компонент ноцицептивной чувствительности животных в отдаленный период после длительного стрессорного воздействия (4-е и 7-е сут.). **Заключение.** Применение мелатонина в целях коррекции измененной болевой чувствительности, при отрицательных эмоциогенных нагрузках, необходимо проводить с учетом временной стадии постстрессорного периода, а также принимая во внимание необходимость воздействия на перцептуальный или эмоциональный компонент ноцицепции.

Ключевые слова: боль; перцептуальный и эмоциональный компоненты ноцицепции; мелатонин; длительная стрессорная нагрузка; крысы.

Для цитирования: Перцов С.С., Беляева Е.В., Абрамова А.Ю. Динамика ноцицептивной чувствительности крыс после введения мелатонина в норме и при длительном стрессорном воздействии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 10—16. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.10-16

Для корреспонденции: Перцов Сергей Сергеевич, доктор мед. наук, член-корр. РАН, проф., зам. директора по научной работе, зав. лаб. системных механизмов эмоционального стресса ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина»; зав. каф. нормальной физиологии и медицинской физики ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.Е. Евдокимова Минздрава России, 119017, г. Москва, Старомонетный переулок, д. 5, e-mail: s.pertsov@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.01.2017

Pertsov S.S.^{1,2}, Belyaeva E.V.¹, Abramova A.Yu.^{1,2}

Dynamics of nociceptive sensitivity in rats after melatonin treatment under normal conditions and during long-term stress exposure

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology», Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Delegatskaya St. 20-1, Moscow, 127473, Russia

The dynamics of nociceptive sensitivity in rats was studied in various periods after intraperitoneal injection of melatonin (10 mg/kg) under normal conditions and during long-term stress exposure on the model of 24-h immobilization. Administration of melatonin was shown to enhance the perceptual component of nociception, whose degree progressively increased over 8 days of observations. The vocalization threshold of these specimens in response to electrocutaneous stimulation was elevated on days 3—5, which illustrates suppression of the emotional component of nociceptive sensitivity. Stress exposure in animals was accompanied by a decrease in the tail-flick latency during light-heat stimulation. It was observed immediately

and 1, 2, and 3 days after termination of the stress procedure. An increase in the vocalization threshold of rats was found immediately after stress. These changes illustrate an enhancement of the perceptual component of nociception (hyperalgesia), but suppression of the emotional evaluation of pain stimulation at the early stage of the post-stress period. Exogenous melatonin did not prevent the development of hyperalgesia after 24-h restraint stress. However, melatonin inhibited the emotional component of nociceptive sensitivity in animals during the late period after long-term stress exposure (days 4 and 7). We conclude that the use of melatonin for correction of changes in nociceptive sensitivity due to negative emotogenic factors should be performed taking into account the stage of the post-stress period and necessity to affect the perceptual or emotional component of nociception.

Keywords: pain; perceptual and emotional components of nociception; melatonin; long-term stress exposure; rats.

For citation: Pertsov S.S., Belyaeva E.V., Abramova A.Yu. Dynamics of nociceptive sensitivity in rats after melatonin treatment under normal conditions and during long-term stress exposure. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (3): 10–16. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.10-16

For correspondence: Sergey S. Pertsov, Doctor of Medical Science, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor. Deputy Director, Head of the Laboratory for Systemic Mechanisms of Emotional Stress, Federal State Budgetary Scientific Institution «P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology»; 8, Baltiyskaya ul., Moscow, 125315, Russia, e-mail: s.pertsov@mail.ru

Information about authors: Pertsov S.S. <http://orcid.org/0000-0001-5530-4990>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 15.01.2017

Введение

В настоящее время большинство исследователей сходятся во мнении об анальгетических эффектах кратковременного острого стресса [1], но гипералгетическом действии повторных или хронических стрессорных нагрузок [2]. Актуальным является поиск эндогенных биологически активных веществ, обладающих антистрессорной активностью и способных повышать порог ноцицептивной чувствительности.

Имеющиеся научные данные позволяют предположить, что одним из таких соединений является эпифизарный нейрогормон мелатонин, обладающий широким спектром физиологических свойств, в частности — антистрессорной активностью [3]. В недавно опубликованных обзорных статьях обобщены сведения, иллюстрирующие антиоксидантное [4], хронобиотическое [5], анксиолитическое [6] и иммуномодулирующее действие мелатонина [7]. Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют также о наличии у мелатонина анальгетических свойств, которые во многом зависят от дозы и времени введения этого гормона [8]. В клинических наблюдениях продемонстрирована высокая эффективность мелатонина при лечении пациентов с хроническими болевыми синдромами — мигренью, фибромиалгией, синдромом раздраженной кишки, ревматоидным артритом [9]. Однако в доступной научной литературе практически отсутствуют данные об изменениях различных «составляющих» болевой чувствительности млекопитающих, в частности, эмоционального и перцептуального компонентов ноцицепции, на разных стадиях после

введения мелатонина. Кроме этого, не изучен характер влияния этого нейрогормона на ноцицептивные показатели после однократных, но продолжительных отрицательных эмоциогенных воздействий.

Цель исследования — изучение динамики ноцицептивной чувствительности крыс в разные временные периоды после введения мелатонина в условиях физиологической нормы и при острой стрессорной нагрузке.

Методика

Эксперименты выполнены в светлое время суток (9.00—16.00) в осенне-зимний период на 40 крысах-самцах Вистар с массой тела $340,0 \pm 2,3$ г. При проведении опытов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными на заседании этической комиссии НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина (протокол № 1 от 3.09.2005), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Животных содержали в клетках (по 5 особей в каждой) в помещениях с искусственным освещением (9.00—21.00 — свет, 21.00—9.00 — темнота) при $20—22^{\circ}\text{C}$ в условиях свободного доступа к воде и пище. После доставки в лабораторию крысы проходили адаптацию к лабораторным условиям в течение 10 сут. Животных ежедневно подвергали процедуре хэндлинга — неоднократному взятию в руки на протяжении 15 мин — с целью предотвращения стрессорной реакции на взятие в руки экспериментатора.

Выделено 2 группы крыс, состоящие из 20 особей каждая. В работе применяли физиологический раствор (ФР) для инфузий (*Красфарма*, Россия) и мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин; 98% *Sigma-Aldrich*, США). Мелатонин в дозе 10 мг/кг массы крысы разводили в 1 мл стерильного ФР. Физиологический раствор (группа 1-я) и мелатонин (группа 2-я) вводили животным внутривенно в объеме 1 мл с помощью одноразовых пластиковых шприцов. Указанная доза экзогенного мелатонина была выбрана, исходя из результатов наших предыдущих исследований [10] и опубликованных ранее данных о дозозависимом анальгетическом действии нейрого르몬а на разных экспериментальных моделях боли. Установлено, в частности, что внутривенное введение мелатонина в дозе 10 мг/кг сопровождается развитием выраженного антиноцицептивного эффекта у животных [8].

Учитывая тот факт, что болевые пороги у грызунов подвержены циркадным колебаниям, оценку ноцицепции проводили в одно и то же время в светлую фазу суток. В качестве болевого ноцицептивного раздражителя использовали светотермальное воздействие. Перцептуальный компонент ноцицепции у крыс оценивали по латентному периоду реакции отведения хвоста (ЛПРОХ) в ответ на светотермальное раздражение («tail-flick» метод) [11]. Измерения проводили на приборе Tail-Flick Analgesia Meter 0104-301M (*Columbus Instruments*, США). Животных помещали в специальные пластиковые пеналы. Осуществляли 3 предъявления ноцицептивного раздражителя с интервалом 3—5 мин; рассчитывали среднее значение ЛПРОХ в секундах. Эмоциональный компонент ноцицепции определяли по порогу вокализации крыс (ПВ, мА) в ответ на электрокожное раздражение хвоста. Для этого применяли металлические кольцевые электроды, фиксируемые на хвосте, и электростимулятор SEN-3201 (*Nihon Kohden*, Япония). Параметры электростимуляции: частота — 10 Гц, длительность импульса — 0,5 мс. Силу тока постепенно увеличивали до появления реакции вокализации, или писка, у крыс (от 0,25 до 2 мА).

Показатели перцептуального и эмоционального компонентов ноцицепции у всех крыс изучали в исходном состоянии, а затем ежедневно в течение 8 сут. после 1-го введения веществ. На 9-е сут. опыта, сразу после определения ноцицептивных порогов животные вновь получали инъекцию ФР (1-я гр.) или мелатонина (2-я гр.), а затем были подвергнуты однократной длительной стрессорной нагрузке на модели 24-ч иммобилизации в индивидуальных пластиковых пеналах. Ноцицептивную чувствительность крыс оценивали ежедневно в динамике сразу после окончания экспериментального стресса и в течение 7 сут. постстрессорного периода.

Результаты опытов обрабатывали с помощью соответствующих статистических и аналитических методов с использованием пакетов программ Statistica StatSoft 6.1 и Microsoft Office Excel 2007. Выборки количественных данных не удовлетворяли критериям нормального распределения ($p < 0,05$ по критерию Шапиро—Уилка). В связи с этим для проведения сравнительного статистического анализа и оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрический Т-критерий Вилкоксона. Различия между группами считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У нестрессированных крыс введение ФР оказывало незначительное влияние на перцептуальный компонент ноцицепции (табл. 1). Изменения указанного показателя выявлены лишь на 7-е и 9-е сут. наблюдений, что проявлялось в статистически значимом снижении ЛПРОХ на 21,8 и 19,8% соответственно по сравнению с исходным. Значимого эффекта ФР на эмоциональный компонент ноцицепции при электрокожном раздражении хвоста животных в разные сроки исследования не обнаружено. Выявлены лишь волнообразные колебания ПВ, которые не были статистически значимы.

Следовательно, продолжительный экспериментальный стресс у животных, вызванный 24-ч иммобилизацией, приводит к усилению перцептуального компонента ноцицепции на ранних стадиях постстрессорного периода. Выявленные изменения сопровождаются подавлением эмоционального восприятия болевого раздражения сразу после окончания стрессорной нагрузки. Полученные данные согласуются и дополняют результаты недавних клинических наблюдений в области изучения боли. Например, продемонстрирована важная роль психологических факторов в формировании болевых синдромов при ревматоидных заболеваниях [12]. Установлено, что отрицательные эмоциональные воздействия, особенно в ранние периоды жизни, являются одним из факторов риска дальнейшего развития хронических болевых синдромов, в том числе висцеральной боли [13]. Результаты экспериментальных и клинических наблюдений указывают на то, что изменения функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса и ряда структур мозга (миндалины, префронтальной коры, гиппокампа), вовлеченных в регуляцию стрессорных реакций, во многом определяют переход острых болей в хронические [14].

У стрессированных крыс с повторным введением мелатонина ЛПРОХ был статистически значимо ниже фонового значения сразу после инъекций (на

27,1%), через 1 сут. (на 26,5%), 2 сут. (на 19,7%), 3 сут. (на 25,0%), 5 (на 19,9%) и 6 сут. (на 11,9%) после окончания действия стрессорного фактора (табл. 2). В последние сутки наблюдений ЛПРОХ увеличивался и, таким образом, не отличался от исходного показателя. ПВ этих животных статистически значимо превышал контрольный уровень через 4 и 7 сут. после стрессорного воздействия (на 20,0 и 11,9% соответственно). В остальные периоды после 24-ч иммобилизации значимых отличий ПВ от фонового уровня не выявлено.

Введение мелатонина контрольным крысам сопровождалось прогрессивным уменьшением ЛПРОХ в ответ на светотермальное раздражение по сравнению с исходным уровнем (табл. 2): 1-е сут. — на 13,9%; 2-е сут. — на 17,7%; 3-и сут. — на 23,2%, 4-е сут. — на 22,4%, 5-е сут. — на 30,8%, 6-е сут. — на 27,9%, 7-е сут. — на 38,1%, 8-е сут. — на 30,1%, 9-е сут. — на 27,4%. Следует отметить, что ПВ животных статистически значимо снижался (на 18,1%) в 1-е сут. после инъекции мелатонина, но существенно превышал исходный показатель на 3-и (29,2%), 4-е (9,7%) и 5-е сут. наблюдений

(22,2%). В отдаленные сроки после инъекции (6—9-е сут) ПВ практически не отличался от контроля.

Таким образом, воздействие экзогенного мелатонина в дозе 10 мг/кг сопровождается усилением перцептуального компонента ноцицепции у интактных животных. Существенно, что выраженность этого эффекта возрастает с удлинением периода с момента инъекции нейроромона — с 1-х по 8-е сут. наблюдений. Следует отметить, что вызванные мелатонином изменения эмоционального компонента болевой чувствительности под влиянием мелатонина были разнонаправлены на разных стадиях опыта: усиление — через 1 сут., ослабление — на 3-и, 4-е и 5-е сут. после инъекции.

Обсуждая полученные данные, необходимо указать, что в наших предыдущих работах введение мелатонина крысам в аналогичной дозе оказывало противоположные эффекты: подавление перцептуального, но усиление эмоционального компонента ноцицепции [10]. Данное противоречие может быть связано с тем, что ранее оценка болевой чувствительности животных проводилась через меньший интервал вре-

Таблица 1

Показатели ноцицепции у крыс после внутрибрюшинного введения физиологического раствора ($n = 20$, $M \pm m$)

Сутки	Экспериментальные процедуры	ЛПРОХ, с	ПВ, мА
0	Регистрация ноцицептивных показателей в исходном состоянии	4,35 ± 0,35	0,83 ± 0,14
	Инъекция ФР		
1	Регистрация ноцицептивных показателей после однократной инъекции ФР	4,06 ± 0,16	0,93 ± 0,06
2		3,84 ± 0,09	0,87 ± 0,07
3		3,91 ± 0,09	0,67 ± 0,52
4		3,95 ± 0,27	0,81 ± 0,08
5		4,12 ± 0,11	0,69 ± 0,05
6		4,22 ± 0,09	0,88 ± 0,03
7		3,39 ± 0,09**	0,63 ± 0,07
8		3,89 ± 0,09	0,63 ± 0,06
9	Регистрация ноцицептивных показателей	3,49 ± 0,12*	0,86 ± 0,04
	Повторная инъекция ФР → 24-ч иммобилизация		
10	Регистрация ноцицептивных показателей сразу после иммобилизации	2,83 ± 0,10***	1,19 ± 0,11*
11	Регистрация ноцицептивных показателей на 1-е сут. постстрессорного периода	2,99 ± 0,08***	0,73 ± 0,04
12	Регистрация ноцицептивных показателей на 2-е сут. постстрессорного периода	2,80 ± 0,11***	1,02 ± 0,08
13	Регистрация ноцицептивных показателей на 3-и сут. постстрессорного периода	2,94 ± 0,11**	0,70 ± 0,04
14	Регистрация ноцицептивных показателей на 4-е сут. постстрессорного периода	3,74 ± 0,12	0,71 ± 0,04
15	Регистрация ноцицептивных показателей на 5-е сут. постстрессорного периода	3,83 ± 0,08	0,70 ± 0,06
16	Регистрация ноцицептивных показателей на 6-е сут. постстрессорного периода	3,81 ± 0,14	0,91 ± 0,05
17	Регистрация ноцицептивных показателей на 7-е сут. постстрессорного периода	3,85 ± 0,15	0,81 ± 0,07

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с исходным показателем

мени после инъекции нейрогормона — 12 ч. По-видимому, в условиях нормы экзогенный мелатонин вызывает фазные изменения различных компонентов ноцицепции, которые могут быть разнонаправленными в динамике после инъекции этого соединения.

В дальнейшем был изучен характер изменений ноцицептивной чувствительности крыс после длительной стрессорной нагрузки на фоне повторного введения исследуемых веществ. У животных, получавших ФР, ЛПРОХ сразу, а также через 1, 2 и 3 сут. после 24-ч иммобилизации был статистически значимо ниже исходного уровня на 34,9, 31,3, 35,6 и 32,4% соответственно (табл. 1). На 4-е сутки после экспериментального стресса ЛПРОХ у особей этой группы несколько возрастал (по сравнению с таковым в предыдущий период) и практически не изменялся до окончания наблюдений, оставаясь ниже контрольного значения. ПВ крыс, получавших ФР, существенно (на 43,4%) превышал исходный показатель сразу после стрессорного воздействия, но снижался через 1 сут. На 2-е сут. после иммобилизации выявлено повторное, хотя и статистически незначимое увеличение ПВ в ответ на электрокожное раздражение

хвоста, затем ПВ уменьшался и практически не отличался от фонового уровня до окончания наблюдений.

Таким образом, внутрибрюшинное введение крысам мелатонина в дозе 10 мг/кг непосредственно до однократного 24-ч иммобилизационного стресса сопровождается усилением перцепции боли, степень которого постепенно уменьшается в динамике наблюдений. Через 7 сут. после окончания стрессорной нагрузки данный показатель не отличается от исходного уровня. Кроме этого, экзогенный нейрогормон снижает эмоциональный компонент ноцицептивной чувствительности животных через 4 и 7 сут. после экспериментального стресса. Следовательно, направленность вызванных мелатонином изменений перцептуального и эмоционального компонентов ноцицепции сходна у нестрессированных особей и крыс, подвергнутых длительному стрессорному воздействию. Однако временные периоды развития эффектов мелатонина отличаются у животных указанных групп.

Вовлечение мелатонина в регуляцию ноцицепции у млекопитающих может, в частности, объясняться его действием на состояние кожи и подкожных структур. Методом микротонкослойной хроматографии по-

Таблица 2

Показатели ноцицепции у крыс после внутрибрюшинного введения мелатонина (n=20, M ± m)

Сутки	Экспериментальные процедуры	ЛПРОХ, с	ПВ, мА
0	Регистрация ноцицептивных показателей в исходном состоянии	4,52 ± 0,16	0,72 ± 0,04
	Инъекция мелатонина		
1	Регистрация ноцицептивных показателей после однократной инъекции мелатонина	4,31 ± 0,14	0,59 ± 0,04*
2		3,89 ± 0,14*	0,68 ± 0,04
3		3,72 ± 0,24**	0,93 ± 0,06**
4		3,47 ± 0,12***	0,79 ± 0,05*
5		3,51 ± 0,19***	0,88 ± 0,04**
6		3,13 ± 0,10***	0,69 ± 0,04
7		3,26 ± 0,08***	0,68 ± 0,04
8		2,80 ± 0,12***	0,70 ± 0,03
9	Регистрация ноцицептивных показателей	3,16 ± 0,07***	0,77 ± 0,03
	Повторная инъекция мелатонина → 24-ч иммобилизация		
10	Регистрация ноцицептивных показателей сразу после иммобилизации	3,17 ± 0,07***	0,78 ± 0,02
11	Регистрация ноцицептивных показателей на 1-е сут. постстрессорного периода	3,32 ± 0,08***	0,75 ± 0,03
12	Регистрация ноцицептивных показателей на 2-е сут. постстрессорного периода	3,63 ± 0,11***	0,78 ± 0,02
13	Регистрация ноцицептивных показателей на 3-и сут. постстрессорного периода	3,39 ± 0,11***	0,81 ± 0,02
14	Регистрация ноцицептивных показателей на 4-е сут. постстрессорного периода	4,09 ± 0,21	1,06 ± 0,07***
15	Регистрация ноцицептивных показателей на 5-е сут. постстрессорного периода	3,62 ± 0,24**	0,79 ± 0,02
16	Регистрация ноцицептивных показателей на 6-е сут. постстрессорного периода	3,98 ± 0,16*	0,76 ± 0,03
17	Регистрация ноцицептивных показателей на 7-е сут. постстрессорного периода	4,79 ± 0,18	0,88 ± 0,02**

Примечание. *p<0,05, **p<0,01 и ***p<0,001 по сравнению с исходным показателем

казано, что мелатонин оказывает выраженное влияние на биохимический статус тканей, в частности, на липидные показатели кожи [15]. При этом реакция липидов кожи на экзогенный мелатонин тесно связана с метаболизмом этих соединений в других тканях — крови и подкожной жировой клетчатке. Следует подчеркнуть, что эпифизарный нейрого르몬 обладает протективными свойствами в отношении липидов кожи при острых стрессорных воздействиях. Это проявляется в восстановлении под влиянием мелатонина уровня общих липидов и абсолютного содержания большинства липидных фракций у крыс, измененных после водно-иммерсионного стресса [16]. Кроме этого, мелатонин оказывает модулирующее воздействие и на основные компоненты соединительной ткани. Установлено, что введение мелатонина приводит к увеличению содержания урсоловых кислот и гексозаминов в коже интактных животных, а также предупреждает снижение уровня гликозаминогликанов при стрессорной нагрузке [17].

Представленные данные об особенностях изменений различных компонентов ноцицепции под влиянием мелатонина, обладающего, в частности, выраженными иммуномодулирующими свойствами, дополняют имеющиеся сведения о вовлечении иммуноактивных соединений в системную организацию физиологических функций [18]. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что применение мелатонина в целях коррекции нарушений болевой чувствительности, вызванных отрицательными эмоциональными нагрузками, следует проводить с учетом временной стадии постстрессорного периода, а также принимая во внимание необходимость воздействия на перцептуальный или эмоциональный компонент ноцицепции.

Заключение

Проведенные исследования показали, что введение мелатонина приводит к усилению перцептуального компонента ноцицепции интактных крыс, выраженность которого возрастает в течение 8 сут. наблюдений. На 3-и — 5-е сут. исследования у этих особей выявлено возрастание ПВ в ответ на электрокожное раздражение хвоста, что иллюстрирует ослабление эмоционального компонента болевой чувствительности под влиянием изучаемого нейрого르몬а.

Однократное длительное стрессорное воздействие у животных на модели 24-ч иммобилизации сопровождается выраженным снижением ЛПРОХ хвоста при светотермальном раздражении, что наблюдается сразу, а также через 1, 2 и 3 сут. после окончания стрессорного воздействия. В этих экспериментальных условиях увеличение ПВ крыс при электрокожном

раздражении обнаружено сразу и через 2 сут. после стрессорной нагрузки. Указанные изменения характеризуют усиление перцептуального компонента ноцицепции — формирование гипералгии, но подавление эмоционального восприятия болевого раздражения на ранних стадиях постстрессорного периода.

Экзогенный мелатонин не предупреждает развитие гипералгии после 24-ч иммобилизации. Однако мелатонин вызывает подавление эмоционального компонента ноцицептивной чувствительности животных в отдаленный период после длительного стрессорного воздействия (4-е и 7-е сут.).

References

1. Porro C.A., Carli G. Immobilization and restraint effects on pain reactions in animals. *Pain*. 1988; 32(3): 289-307.
2. Kim S.H., Moon I.S., Park I.S. Unique hippocampal changes and allodynia in a model of chronic stress. *J. Korean Med. Sci.* 2013; 28(6): 946-50.
3. Pertsov S.S. *Melatonin in systemic mechanisms of emotional stress*. Moscow: Publ. RAMS; 2011. (in Russian)
4. Reiter R.J., Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M., Alatorre-Jimenez M., Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* 2016; 61(3): 253-78.
5. Emens J.S., Burgess H.J. Effect of light and melatonin and other melatonin receptor agonists on human circadian physiology. *Sleep Med. Clin.* 2015; 10(4): 435-53.
6. Marseglia L., D'Angelo G., Manti S., Aversa S., Arriago T., Reiter R.J., Gitto E. Analgesic, anxiolytic and anaesthetic effects of melatonin: new potential uses in pediatrics. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(1): 1209-20.
7. Carrillo-Vico A., Lardone P.J., Alvarez-Sanchez N., Rodriguez-Rodriguez A., Guerrero J.M. Melatonin: buffering the immune system. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(4): 8638-83.
8. Laurido C., Pelissie T., Soto-Moyano R., Valladares L., Flores F., Hernandez A. Effect of melatonin on rat spinal cord nociceptive transmission. *Neuroreport*. 2002; 13(1): 89-91.
9. Danilov A., Kurganova J. Melatonin in Chronic Pain Syndromes. *Pain Ther.* 2016; 5(1): 1-17.
10. Kozlov A.Yu., Abramova A.Yu., Tsatryan V.V., Pertsov S.S. Effect of melatonin on nociceptive sensitivity in rats during a lipopolysaccharide-induced change in the immune status. *Rossiyskiy Zhurnal Boli*. 2013; 4: 8-11. (in Russian)
11. Daniel le Bars., Gozariu M., Cadden S.W. Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews*. 2001; 53(4): 597-652.
12. van Middendorp H., Evers A.W. The role of psychological factors in inflammatory rheumatic diseases: From burden to tailored treatment. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2016; 30(5): 932-45.
13. Prusator D.K., Andrews A., Greenwood-Van Meerfeld B. Neurobiology of early life stress and visceral pain: translational relevance from animal models to patient care. *Neurogastroenterol. Motil.* 2016; 28(9): 1290-305.
14. Li X., Hu L. The role of stress regulation on neural plasticity in pain chronification. *Neural Plast.* 2016; 2016:6402942. doi: 10.1155/2016/6402942.

15. Gribanov G.A., Kostyuk N.V., Abramov Yu.V., Rebrov L.B., Bykov V.A., Volodina T.V., Pertsov S.S. Skin lipids in rats administered with melatonin. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 1999; 127(4): 463-5. (in Russian)

16. Gribanov G.A., Kostyuk N.V., Abramov Yu.V., Rebrov L.B., Bykov V.A., Volodina T.V., Pertsov S.S. Dynamics of changes in the rat skin lipids during stress: effects of exogenous melatonin. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 1999; 127(5): 519-22. (in Russian)

17. Pertsov S.S., Abramov Yu.V., Volodina T.V., Rebrov L.B. Biochemical indexes of the skin and blood melatonin concentration in rats during acute stress and treatment with exogenous melatonin. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2004; 137(4): 369-73. (in Russian)

18. Sudakov K.V., Ivanova E.A., Koplík E.V., Kotov A.V., Kravtsov A.N., Meshcheryakov A.F., Pertsov S.S., Sotnikov S.V., Umryukhin A.E., Umryukhin P.E. Immune links in the system organization of behavior. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk*. 2011; 42(3): 81-96. (in Russian)

Сведения об авторах:

Беляева Екатерина Викторовна, лаборант-исследователь лаб. системных механизмов эмоционального стресса ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», e-mail: kate.belyaeva@gmail.com

Абрамова Анастасия Юрьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. системных механизмов эмоционального стресса ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина»; ст. преподаватель каф. нормальной физиологии и медицинской физики ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.Е. Евдокимова» Минздрава России, 119017, г. Москва, Старомонетный переулок, д. 5, e-mail: nansy71@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092.9

Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н.

Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты при введении кормящим крысам модулируют поведение крысят, перенесших стрессирование путем многократного введения физиологического раствора в неонатальном периоде

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

Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) могут оказывать антидепрессивное, анксиолитическое и антистрессорное действие, однако данные противоречивы. Недавно на модели тревожно-депрессивного состояния, индуцированного неонатальным действием ингибитора дипептидилпептидазы IV дипротина А, мы показали, что омега-3 ПНЖК наряду с антидепрессивным действием также повышают тревожность у крысят опытной группы и нарушают эмоциональное поведение контрольных животных, подвергнутых многократному введению физиологического раствора (ФР). **Цель** работы — изучение влияния омега-3 ПНЖК при их введении кормящим крысам Вистар, на эмоционально-мотивационное поведение крысят, подвергнутых стрессогенной процедуре многократного введения ФР на 2-й — 3-й неделях постнатального развития, и интактных животных в динамике взросления. **Методика.** Омега-3 ПНЖК вводили крысам в период лактации перорально в дозе 0,3 г/кг в течение 28 дней. ФР вводили внутривентриально в период с 5-го по 18-й дни постнатального развития. Эмоционально-мотивационное поведение крыс оценивали с помощью общепринятых методов. **Результаты.** Омега-3 ПНЖК предотвращали появление признаков депрессивноподобного поведения и оказывали психостимулирующее действие на животных, перенесших стрессирование в раннем неонатальном периоде. Омега-3 ПНЖК также нормализовали вызванные стрессом нарушения социального взаимодействия неагрессивного характера у крыс подросткового возраста и взрослых животных, однако способствовали повышению агрессивности у взрослых интактных крыс. Независимо от факта стрессирования, омега-3 ПНЖК по разным показателям тревожности оказывали как анксиолитическое, так и анксиогенное действие на крыс-подростков, тогда как у взрослых животных обнаружено только их анксиогенное влияние. У стрессированных и интактных взрослых крыс омега-3 ПНЖК вызывали снижение ориентировочно-исследовательской активности. **Заключение.** Омега-3 ПНЖК в условиях их приема кормящими самками, оказывают как позитивное, так и негативное влияние на эмоционально-мотивационное поведение потомства, перенесшего в неонатальном периоде стрессирование путем многократного введения ФР. Эффекты омега-3 ПНЖК различаются у животных подросткового и взрослого возраста. Угнетающее действие на психомоторную активность и анксиогенное влияние омега-3 ПНЖК проявляется как у стрессированных, так и у интактных крыс, что следует учитывать при разработке подходов к терапии психоневрологических расстройств с использованием омега-3 ПНЖК.

Ключевые слова: омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты; стресс; многократное введение физиологического раствора; крысы.

Для цитирования: Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты при введении кормящим крысам модулируют поведение крысят, перенесших стрессирование путем многократного введения физиологического раствора в неонатальном периоде. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 17–30. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.17-30

Для корреспонденции: Крупина Наталья Александровна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: krupina-nf@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Благодарность. Авторы выражают благодарность ведущему инженеру ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» В.М. Комкову за техническую поддержку исследования.

Поступила 13.02.2017

Krupina N.A., Khlebnikova N.N.

Omega-3 polyunsaturated fatty acids when administered to lactating rats modulate the behavior in rat pups exposed to neonatal stress induced by repeated saline administration

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315 Moscow, Russia

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) may exert antidepressant, anxiolytic and anti-stress effects, but the data are contradictory. Recently, using the model of experimental anxiety-depressive disorder caused by the neonatal action of an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV diprotin A, we have shown that omega-3 PUFAs along with an antidepressant effect also increase anxiety in the rat pups in the experimental group and disrupt emotional behavior in control animals subjected to repeated administration of saline. **The purpose** of this work was to study the effects of omega-3 PUFAs when administered to the lactating Wistar rats, on the emotional and motivational behavior of the rat pups exposed to the procedure of the repeated saline administration on second — third weeks of postnatal development and intact rats in the dynamics of growing up. **Methods.** Omega-3 PUFAs were administered to lactating rats at a dose 0.3 g/kg, per os, for 28 days. Saline was administered intraperitoneally on postnatal days 5-18. We assessed emotional and motivational behavior using conventional methods. **Results.** Omega-3 PUFAs prevented the appearance of the symptoms of depressive-like behavior and exerted a psycho stimulative effect on the animals that underwent stress in the early neonatal period. Omega-3 PUFAs also normalized stress-related impairment of social non-aggressive interaction in adolescent and adult rats but promoted increased aggression in adult intact rats. Regardless of whether the stress, omega-3 PUFAs exhibited both anxiolytic and anxiogenic effects for different anxiety indicators in adolescent rats, whereas in adult animals only anxiogenic effect was detected. In adult stressed and intact rats, omega-3 PUFAs caused a decrease in exploratory activity. **Conclusion.** Omega-3 PUFAs when administered to the lactating females, exert both positive and negative effects on the emotional and motivational behavior of the offspring, which underwent stress by repeated saline administration in the neonatal period. Omega-3 PUFAs action differs in adolescent and adult rats. The inhibitory effect on psychomotor activity and anxiogenic effects of omega-3 PUFAs appear in both stressed and intact rats that should be taken into account when developing approaches to the treatment of psycho-neurological disorders using omega-3 PUFAs.

Keywords: omega-3 polyunsaturated fatty acids; stress; repeated saline administration; rats.

For citation: Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Omega-3 polyunsaturated fatty acids when administered to lactating rats modulate the behavior in rat pups exposed to neonatal stress induced by repeated saline administration. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (3): 17—30 (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.17-30

For correspondence: Nataliya N. Krupina, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: krupina-na@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Acknowledgments. We thank Mr. V.M. Komkov, a lead engineer from the «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia, for technical support of the research.

Information about authors: Krupina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-2462-899X>

Received 13.02.2017

Введение

По данным клинических исследований считается, что изменение активности сериновой пролинспецифической пептидазы — пролилэндопептидазы (ПЭП, E.C. 3.4.21.26) в сыворотке крови может быть одним из патофизиологических механизмов развития тревожности, депрессивного состояния и стресса [1]. В эксперименте у мышей, нокаутных по гену, кодирующему ПЭП, выявлена повышенная тревожность в сочетании с гиперактивностью [2].

В наших исследованиях показано, что активность пролинспецифических пептидаз ПЭП и дипептидил-

пептидазы-IV (ДПП-IV) повышена в структурах мозга крыс с экспериментальным депрессивным синдромом, с экспериментально индуцированным «поведенческим отчаянием» и тревожно-депрессивным состоянием с повышенной агрессивностью, вызванным действием синтетического ингибитора ДПП-IV метионил-2(S)-диано-пирролидина в постнатальные дни (ПНД) 5—18, а синтетические ингибиторы ПЭП проявляют на этих моделях свойства антидепрессантов, нормализуя активность ПЭП и ДПП-IV [3—5].

Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) также являются ингибиторами ПЭП [6].

Недавно на разработанной в наших исследованиях новой модели тревожно-депрессивного состояния с повышенной агрессивностью, индуцированного неонатальным действием ингибитора ДПП-IV трипептида дипротина А [7], мы показали, что омега-3 ПНЖК в условиях их перорального введения кормящим самкам оказывают психостимулирующее действие на крысят как опытной (неонатальное введение дипротина А), так и контрольной групп (неонатальное введение физиологического раствора, ФР) и способствуют формированию у них антидепрессивного фенотипа [8], что принципиально согласуется с данными зарубежных авторов о наличии антидепрессантных свойств у омега-3 ПНЖК [9—10]. Однако мы также обнаружили, что омега-3 ПНЖК, не снижая агрессивность крысят опытной группы со смешанными эмоционально-мотивационными нарушениями, уменьшали неагрессивное социальное взаимодействие и увеличивали агрессивность и тревожность у крысят контрольной группы подросткового возраста (1 мес.), которым в 5—18-й ПНД вводили ФР [8]. В подавляющем большинстве работ в качестве патогенного фактора, приводящего к росту поведенческих индексов тревоги, депрессии и агрессии, рассматривается дефицит ПНЖК в период раннего онтогенеза [см. обзор 11]. Наши исследования на модели тревожно-депрессивного состояния с повышенной агрессивностью, индуцированного неонатальным действием ингибитора ДПП-IV, были проведены в условиях, когда дефицит ПНЖК был исключен. Напротив, самки получали ПНЖК в период лактации, а известно, что прием ПНЖК беременными и кормящими самками крыс сопровождается увеличением уровня этих кислот в развивающемся мозге крысят [12].

Полученные в наших исследованиях противоречивые данные о том, что включение омега-3 ПНЖК в диету кормящих самок может иметь негативные последствия, проявляющиеся нарушениями эмоционально-мотивационного поведения детенышей, представляли особый интерес в связи с тем, что омега-3 ПНЖК, как показано в многочисленных исследованиях, играют важную роль в функционировании организма на протяжении всей жизни — от младенчества до старости [13, 14] и, помимо антидепрессивного, могут оказывать также анксиолитическое действие [9, 15].

Дефицит омега-3 ПНЖК в пище приводит к развитию состояния хронического стресса, что проявляется нарушением сигнального пути, опосредуемого глюкокортикоидными рецепторами, и гиперактивацией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (ГГА-оси) [10]. В условиях стрессирования омега-3 ПНЖК предотвращают эмоционально-мотивационные нарушения у крыс, вызванные разными типами стресса, например, стрессом ограничения [16], «пси-

хологическим» стрессом в приподнятом крестообразном лабиринте и стрессом условного страха при помешении животных в камеру, в которой ранее они подвергались удару электрического тока [17], стрессом социальной угрозы [10]. Однако в ряде исследований стресс-протективное действие омега-3 ПНЖК на поведение не подтверждается. Например, на модели градуального физиологического стресса, вызванного действием синтетического препарата дезоксикортикостерона ацетата — агониста минералокортикоидов, обладающего свойствами естественного гормона надпочечников, обнаружена неэффективность омега-3 ПНЖК в предотвращении стресс-индуцированной тревожности [18]. По мнению авторов, полученные ими данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что стресс-протективный эффект омега-3 ПНЖК выражен в случае более тяжелого стресса.

В наших исследованиях на модели тревожно-депрессивного состояния с повышенной агрессивностью, индуцированного неонатальным действием ингибитора ДПП-IV трипептида дипротина А, были обнаружены признаки нарушения эмоционального поведения у крыс контрольной группы, которым в раннем постнатальном периоде многократно вводили ФР [8]. Такое воздействие является стрессогенным, так как показано, что даже однократное введение ФР приводит к высвобождению серотонина в медиальном ядре шва, подобно действию других известных стрессоров, хотя при каждом из них паттерн структур мозга, в которых происходит стрессогенное высвобождение серотонина, различен [19]. Многократное введение ФР вызывает нейропластические изменения в параганглионарной клеточной популяции в верхнем шейном ганглии крыс, отражающие действие стрессогенной процедуры повторного инъектирования [20]. Инъекция ФР служила стрессором для крысят, на 1 сут. отлученных от матери, и вызывала повышение уровня кортикостерона в плазме крови [21].

Цель исследования — изучение эффектов омега-3 ПНЖК в условиях их приема кормящими крысами-самками на эмоционально-мотивационное поведение крысят, подвергнутых в раннем онтогенезе стрессогенной процедуре многократного введения ФР, и интактных животных в динамике взросления.

Методика

Работа проведена на 43 крысах-самцах, рожденных от 8 крыс-самок популяции Вистар, выращенных в питомнике ФГБНУ «НИИОПП». Все процедуры проводили в соответствии с Директивой ЕС о защите животных, используемых в научных целях — EU Directive 2010/63/EU, принятой 22 сентября 2010 г. (DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the protection of animals used for scien-

tific purposes), «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г., и под контролем Этического комитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Крысам-самкам на следующий день после родов оставляли по 4—6 детенышей мужского пола, в число которых входили как собственные крысята, так и крысята из пометов двух-трех других самок. Крыс содержали в стандартных условиях вивария с естественной сменой освещенности при свободном доступе к пище и воде. День родов считали нулевым ПНД. Начиная со следующего дня, кормящие самки опытной группы в течение 28 сут., вдобавок к стандартному рациону, получали раствор омега-3 ПНЖК перорально, один раз в сутки, в дозе 0,3 г/кг (препарат ОМАКОР, производитель — Баннер Фармакапс Юроп Б.В., Нидерланды, выпускающий контроль качества — Abbott Products GmbH, Германия; содержит омега-3 ПНЖК: этиловый эфир эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) и этиловый эфир докозагексаеновой кислоты (ДГК) в соотношении 1,2:1, а также альфа-токоферол). Доза омега-3 ПНЖК, также как и в работе на модели тревожно-депрессивного состояния, индуцированного неонатальным действием дипротина А [8], соответствовала дозе 2,8 г для человека весом 60 кг, что входит в диапазон доз, рекомендованных для клинического применения в психиатрии [9]. Для достижения требуемого объема препарат разводили в подсолнечном масле (ПМ) марки «Олейна», в состав которого входят насыщенные жирные кислоты и витамин Е. Контрольные самки для поддержания состава и калорийности дневного рациона получали по той же схеме в том же объеме ПМ, обогащенное альфа-токоферолом для достижения дозы витамина Е, соответствовавшей дозе, которую получали самки опытной группы. Половине детенышей опытной и контрольной групп в период с 5-го по 18-й ПНД включительно внутрибрюшинно вводили ФР (стрессированные крысы), а оставшихся крысят не подвергали никаким дополнительным воздействиям (интактные крысы, ИНТ). На 29-й день после рождения крысят отделяли от матерей и помещали в клетки, сохраняя состав группы детенышей, выращенных каждой самкой. Были сформированы 4 группы крыс: «ПМ + ФР» (n = 12), «ПМ + ИНТ» (n = 11), «Омега-3 ПНЖК + ФР» (n = 10), «Омега-3 + ИНТ» (n = 10). Исследование поведения проводили у животных в возрасте 1 и 2 мес.

1.1. Оценка ориентировочно-исследовательской активности

Двигательную (горизонтальную) и исследовательскую (вертикальную) активность крыс оценивали в тесте автоматизированного «открытого поля» в сис-

теме «Opto-Varimex» («Columbus Instruments», США) по специализированной программе «Auto-Track» (принцип измерения — оценка изменений активности животных по пересечению ими лучей инфракрасных датчиков). Тестирование проводили в звукоизолированной комнате с уровнем освещенности 42 люкса в течение 10 мин. Оценивали двигательную активность по длине пройденного пути в см, исследовательскую — по числу стоек. После каждого тестирования клетки тщательно мыли и проводили дезодорацию раствором этилового спирта.

1.2. Оценка уровня тревожности

Исследование уровня тревожности крыс в поднятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) проводили с помощью системы видеотрекинга VideoMot2 для автоматической видеорегистрации и анализа поведения грызунов — VideoMot2 with Elevated Plus Maze с программным обеспечением для черно-белой версии и параллельной записью цифрового видео по каждому животному на жесткий диск ПК в ходе эксперимента (TSE Systems GmbH, Germany).

Лабиринт из черного непрозрачного поливинилхлорида расположен на высоте 70 см от пола, имеет 2 открытых (не имеющих стенок) рукава (42 x 14 см) (ОР) и 2 закрытых стенками рукава (42 x 14 x 22 см) (ЗР), перпендикулярных друг другу, площадка в центре (Ц) имеет размеры 14 x 14 см; ОР имеют низкие бортики (1 см) для предотвращения падения животного. Обследование проводили при приглушенном верхнем свете, освещенность в центре лабиринта составляла 29 лк, в ОР — 36 лк, в ЗР — 2 лк. Крысу сажали в центр лабиринта мордой в сторону ОР, длительность тестирования составляла 5 мин. В режиме автоматической видеорегистрации оценивали поведение животного по следующим параметрам для ОР и ЗР: время (мс), пробег (см), число посещений; также оценивали общий пробег в ПКЛ (ОР+ЗР) (см) и среднюю скорость перемещения (см/с); предпочтение ОР рассчитывали как долю посещений ОР от суммарного числа заходов в ОР и ЗР (%). Во время тестирования в ПКЛ, как описано ранее [8], дополнительно фиксировали число, длительность (мс) и латентность (мс) вертикальных стоек, свешиваний из ОР (характеристика тревожности: чем больше свешиваний, тем менее тревожно животное), а также эпизодов груминга.

Кроме того, оценивали число и длительность колебаний при переходе животного из темного закрытого отсека лабиринта в открытый, а также латентный период колебаний. Колебанием считали незавершенный выход в другой отсек, когда крыса высовывала голову, как минимум, до линии ушей, а затем быстро отступала назад.

1.3. Оценка депрессивноподобного поведения

Оценку поведения крыс в тесте принудительного плавания проводили по модифицированному методу Порсолта [8] путем однократного помещения животного в цилиндрический пластмассовый бак (высота 47 см, внутренний диаметр 35 см), заполненный водой на высоту 35 см, температура воды составляла 25—26°C. В течение 10 мин фиксировали число и длительность периодов активного плавания (энергичные движения всеми лапами с активным перемещением и/или попыткой выбраться), пассивного плавания (слабые гребки одной-двумя лапами, необходимые для поддержания тела на плаву) и иммобильности (отсутствие плавательных движений). Рассчитывали ритмологический индекс депрессивности (ИД), определяемый отношением числа самых коротких периодов иммобильности (до 6 с) к общему числу периодов активного плавания.

1.4. Оценка зоосоциального взаимодействия

Социальное взаимодействие оценивали в незнакомой крысам клетке из плексигласа (37,0 x 57,0 x 19,0 см) при красном свете; освещенность над центром клетки составляла 7 лк. По схеме эксперимента крысы в течение 2—3 дней до тестирования находились в клетках поодиночке. В течение 15 мин теста оценивали частоту и длительность активных неагрессивных и агрессивных социальных контактов. К активным неагрессивным социальным контактам относили обнюхивание, социальный груминг, залезание под или налезание на партнера, преследование, не заканчивавшееся проявлением агрессии. К агрессивным контактам относили преследование, переходящее в агрессивное взаимодействие, атаки/драки, укусы, агрессивный груминг (выкусывание/выгрызание шерсти партнера). Для характеристики взаимодействия использовали показатели латентности, суммарного числа и времени активных неагрессивных и агрессивных контактов.

Оценивали поведение в парах, состоявших из животных одной группы, не знакомых друг с другом. Различия в весе составляло не более 10—15%. После каждой пары клетку тщательно мыли и проводили дезодорацию этиловым спиртом.

1.5. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «STATISTICA For Windows 7.0». По результатам предварительной проверки гипотезы о нормальном характере распределения данных по тестам Колмогорова—Смирнова и Лиллиефорса в случае, если гипотезу не отклоняли, применяли параметрические методы анализа, если гипотезу отклоняли — не-

параметрические методы. В работе использовали параметрический непарный *t*-критерий Стьюдента и непараметрический непарный *U*-критерий Манна—Уитни для независимых переменных. Принятый уровень значимости составлял 5%. Если достигнутый уровень статистической значимости превышал критическое значение, принималась нулевая гипотеза. Данные представлены в виде $M \pm S.E.M$, где M — среднее, $S.E.M$ — стандартная ошибка среднего.

Результаты исследования

У стрессированных крысят в группе «ПМ+ФР» вес был ниже, чем в группе «ПМ+ИНТ» (рис. 1), то есть стрессирование в раннем постнатальном периоде приводило к задержке в наборе веса у крысят подросткового возраста. Омега-3 ПНЖК, напротив, увеличивали вес у ИНТ крысят: в группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» вес крысят в возрасте 1 мес. был выше, чем в группе «ПМ+ИНТ». Вес крысят в группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» не отличался от веса животных в группе «ПМ+ФР» и был ниже, чем в группе «Омега-3+ИНТ». Таким образом, омега-3 ПНЖК не предотвращали задержку в наборе веса, вызванную стрессированием. У крысят, достигших возраста двух месяцев, изменений в весе ни в одной из групп не наблюдали.

2.1. Ориентировочно-исследовательская активность

Омега-3 ПНЖК и стрессирование не оказывали влияния на двигательную и исследовательскую активность крысят в возрасте 1 мес. (рис. 2). У крысят, достигших двухмесячного возраста, не наблюдали заметных последствий раннего стрессирования по данным показателям, однако в группе «ПМ+ФР» была отмечена тен-

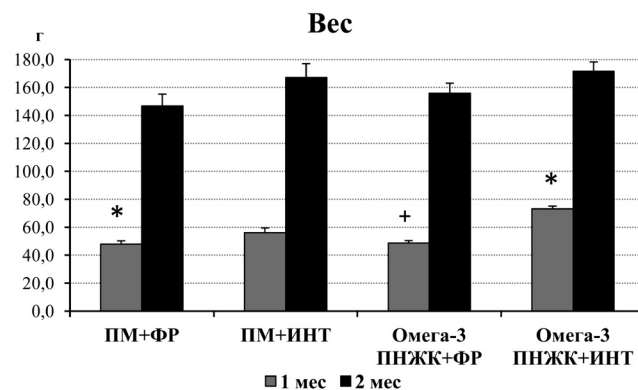


Рис. 1. Вес крыс, подвергнутых действию стрессирования многократным введением физиологического раствора (ФР) в период с 5 по 18 постнатальные дни, и интактных животных, вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или подсолнечное масло (ПМ) в период лактации. * по сравнению со значением показателя в группе «ПМ+ИНТ», $p < 0,05$; + по сравнению с группой «Омега-3 ПНЖК+ИНТ», $p < 0,05$. Сравнение по непарному параметрическому *t*-критерию Стьюдента.

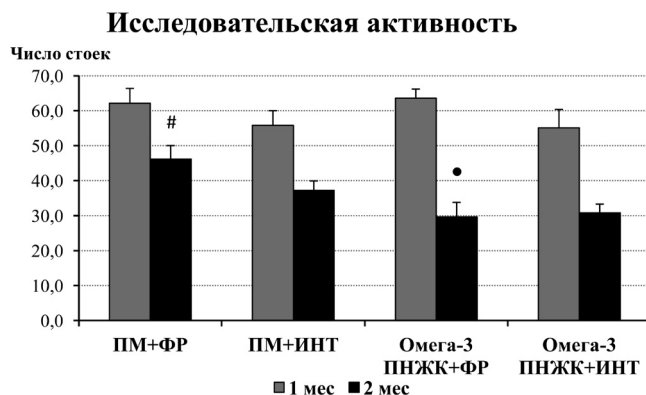
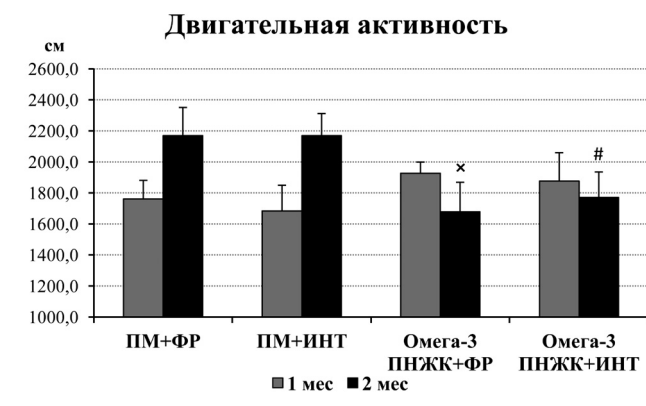


Рис. 2. Двигательная и исследовательская активность крыс, подвергнутых действию стрессирования многократным введением физиологического раствора (ФР) в период с 5 по 18 постнатальные дни, и интактных (ИНТ) животных, вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или подсолнечное масло (ПМ) в период лактации. # по сравнению с группой «ПМ+ИНТ», $p < 0,08$; • по сравнению с группой «ПМ+ФР», $p < 0,05$; x по сравнению с группой «ПМ+ФР», $p < 0,08$. Сравнение по непарному параметрическому t-критерию Стьюдента.

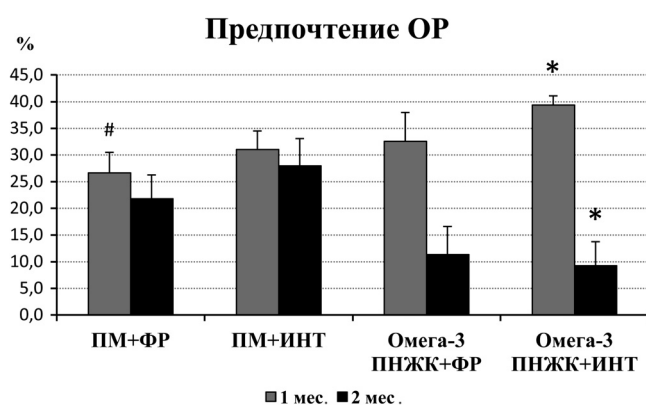


Рис. 3. Предпочтение открытых рукавов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, подвергнутых действию стрессирования многократным введением физиологического раствора (ФР) в период с 5 по 18 постнатальные дни, и интактных (ИНТ) животных, вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или подсолнечное масло (ПМ) в период лактации. * по сравнению со значением показателя в группе «ПМ+ИНТ», $p < 0,05$. Сравнение по непарному непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.

денция к увеличению числа стоек по сравнению с группой «ПМ+ИНТ». Действие омега-3 ПНЖК в период вскармливания проявлялось у взрослых ИНТ крыс выраженной тенденцией к снижению локомоций по сравнению с группой «ПМ+ИНТ», то есть, тенденцией к ухудшению показателей психомоторной активности. У стрессированных крыс в группе «Омега-3+ФР» по сравнению с группой «ПМ+ФР» были выявлены тенденция к уменьшению двигательной активности и статистически значимое снижение исследовательской активности, что подтверждает наличие у омега-3 ПНЖК, полученных с молоком матери, тормозящего влияния на ориентировочно-исследовательскую деятельность.

2.2. Уровень тревожности

Стрессирование само по себе несколько повышало тревожность у животных подросткового возраста: в группе «ПМ+ФР» по сравнению с группой «ПМ+ИНТ» была выявлена выраженная тенденция к снижению предпочтения ОР ($p < 0,08$) (рис. 3). На фоне приема омега-3 ПНЖК с молоком матери у стрессированных крысят не проявлялась тенденция к снижению предпочтения ОР, а в группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» статистически значимо возрастало предпочтение ОР по сравнению с группой «ПМ+ИНТ». Таким образом, по показателю предпочтения ОР омега-3 ПНЖК проявляли анксиолитическое действие и предотвращали негативное влияние раннего стрессирования на уровень тревожности у животных в возрасте 1 мес. Наряду с этим, в группе «Омега-3+ИНТ» увеличивалось число и длительность колебаний при переходах из темных отсеков лабиринта на открытые пространства (рис. 4), что может отражать анксиогенное действие омега-3 ПНЖК. У стрессированных животных подросткового возраста в группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» пробег в ЗР был больше, чем в группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» (табл. 1). У крысят группы «Омега-3 ПНЖК+ФР», подобно группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ», возрастало число колебаний при исследовании в ПКЛ и в тенденции возрастала их длительность (рис. 4). Также в группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» латентный период первого колебания был снижен по сравнению с группой «ПМ+ФР»: соответственно $76455,1 \pm 20471,0$ мс и $176390,2 \pm 32897,7$ мс, $p < 0,05$). У одномесячных крысят ни в одной из групп не выявлено отличий в величине общего пробега и средней скорости перемещения в ПКЛ (табл. 1).

Таким образом, у ИНТ крысят подросткового возраста, принимавших омега-3 ПНЖК с молоком матери, просматривалось анксиолитическое действие омега-3 ПНЖК по одним показателям (по увеличению предпочтения ОР) и анксиогенное — по другим (по увеличению выраженности колебаний), тогда как у стрессированных крысят, принимавших омега-3

ПНЖК, выявлялось их защитное антистрессорное (по сути, анксиолитическое) действие (по предотвращению вызванного стрессированием снижения предпочтения ОР) и так же, как в группе «Омега-3+ИНТ», анксиогенное действие (по увеличению выраженности колебаний).

По достижении двухмесячного возраста у крысят в группах «ПМ+ИНТ» и «ПМ+ФР» не было выявлено различий в ПКЛ, то есть не обнаружено по-

следствий действия раннего стрессирования длительным введением ФР. У ИНТ и стрессированных взрослых животных прием омега-3 ПНЖК с молоком матери приводил к возрастанию тревожности по всем показателям: в группах «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» и «Омега-3 ПНЖК+ФР» время пребывания в ОР, число выходов в ОР и пробег в ОР были снижены, а время пребывания в ЗР, напротив, увеличено по сравнению с величинами пока-

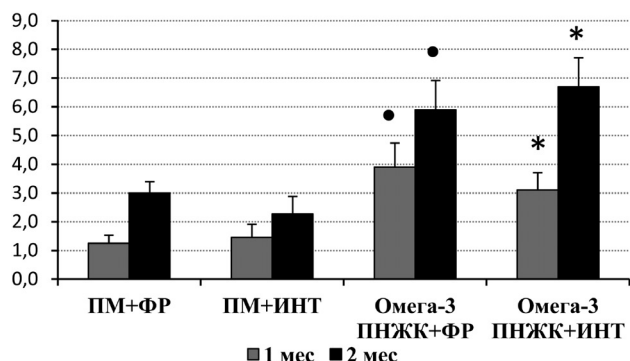
Таблица 1

Показатели тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, подвергнутых действию физиологического раствора (ФР) в период с 5 по 18 постнатальные дни, и интактных (ИНТ) животных, вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или подсолнечное масло (ПМ) в период лактации

Группа	Возраст (число крыс)	ОР, время (мс)	ОР, посещения (число)	ОР, пробег (см)	ЗР, время (мс)	ЗР, посещения (число)	ЗР, пробег (см)	Общий пробег (см)	Средняя скорость перемещения (см/с)
ПМ +ФР	1 мес. (n = 12)	39090,8 ± 7704,3	3,8 ± 0,6	282,7 ± 53,3 #	172751,7 ± 14044,1	10,0 ± 0,8	1196,2 ± 95,2	2070,2 ± 121,3	6,9 ± 0,4
	2 мес. (n = 12)	24591,3 ± 5367,4	2,8 ± 0,7	195,5 ± 44,7	210050,6 ± 12124,6	8,8 ± 1,1	993,8 ± 41,2	1726,5 ± 118,6	5,8 ± 0,4
ПМ + ИНТ	1 мес. (n = 11)	49222,6 ± 10741,3	4,5 ± 0,7	411,6 ± 80,0	181907,6 ± 15862,1	9,5 ± 0,9	1055,7 ± 56,5	2023,0 ± 138,7	6,7 ± 0,5
	2 мес. (n = 11)	31826,4 ± 8769,2	3,9 ± 1,1	294,1 ± 81,4	199074,2 ± 18976,1	8,1 ± 1,1	986,1 ± 44,9	1801,0 ± 167,2	6,0 ± 0,6
Оме-га-3 ПНЖК + ФР	1 мес. (n = 10)	60740,9 ± 11344,3	4,8 ± 1,0	478,5 ± 91,0 x	164549,2 ± 14556,8	8,4 ± 0,5	1245,2 ± 44,3 +	2248,7 ± 121,7	7,5 ± 0,4
	2 мес. (n = 10)	6028,2 ± 2725,6 •	0,8 ± 0,4 •	57,9 ± 29,0 •	258950,0 ± 7600,9 ••	5,8 ± 0,9 •	1076,6 ± 48,3	1428,0 ± 92,9 •	4,8 ± 0,3 •
Оме-га-3 ПНЖК + ИНТ	1 мес. (n = 10)	55793,7 ± 7094,8	6,1 ± 0,9	475,8 ± 75,2	157116,8 ± 14226,7	9,2 ± 0,9	1033,7 ± 66,0	2168,3 ± 134,6	7,2 ± 0,5
	2 мес. (n = 10)	3088,3 ± 1785,4 **	0,5 ± 0,2 **	31,2 ± 18,8 **	265925,3 ± 7800,2 **	4,9 ± 1,1 *	1222,9 ± 96,8 #	1458,5 ± 126,0	4,9 ± 0,4

Примечание. * p<0,05; ** p<0,01; # p<0,09 — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ+ИНТ»; • p<0,05; •• p<0,01; x p<0,08 — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ+ФР»; + p<0,05 — по сравнению со значением показателя в группе «Омега-3+ИНТ». Сравнения проведены с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна—Уитни

Число колебаний



Длительность колебаний

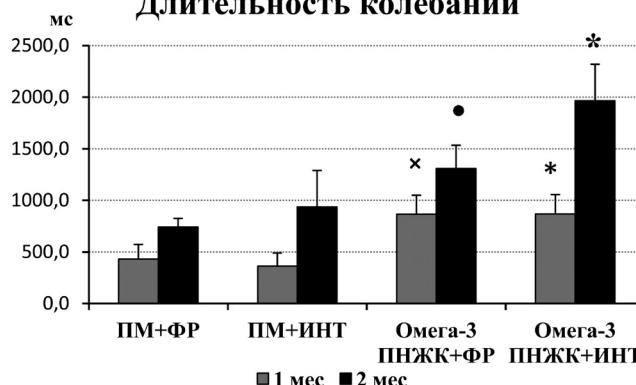


Рис. 4. Характеристика колебаний при исследовании «Приподнятого крестообразного лабиринта» у крыс, подвергнутых действию стрессирования многократным введением физиологического раствора (ФР) в период с 5 по 18 постнатальные дни, и интактных (ИНТ) животных, вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или подсолнечное масло (ПМ) в период лактации. * по сравнению со значением показателя в группе «ПМ+ИНТ», p<0,05; • по сравнению с группой «ПМ+ФР», p<0,05; x по сравнению с группой «ПМ+ФР», p<0,08. Сравнение по непарному непараметрическому U-критерию Манна—Уитни.

зателей в группах «ПМ+ИНТ» и «ПМ+ФР», соответственно (табл. 1). У крыс в группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» была также выявлена тенденция к превышению величины пробега в ЗР по сравнению с крысами из группы «ПМ+ИНТ». В обеих группах животных, получавших омега-3 ПНЖК с молоком матери, было снижено число посещений ЗР, что может быть связано с общим снижением двигательной активности у взрослых крыс (рис. 2). У стрессированных крыс в группе «Омега-3+ФР» общий пробег и скорость перемещения в ПКЛ были статистически значимо ниже, чем в группе «ПМ+ФР», тогда как в группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» снижение этих показателей в сравнении с группой «ПМ+ИНТ» не достигло уровня статистической значимости (табл. 1). По результатам обследования в группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» было обнаружено статистически значимое снижение предпочтения ОР (рис. 3); в группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» просматриваемое снижение предпочтения ОР не достигло уровня статистической значимости ($p = 0,123$). На этой стадии онтогенеза число и длительность колебаний в группах крыс «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» и «Омега-3 ПНЖК+ФР» были увеличены по сравнению с величинами данных показателей соответственно в группах «ПМ+ИНТ» и «ПМ+ФР» (рис. 4), а латентный период колебаний, напротив, был статистически значимо снижен и составил в группах «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» и «ПМ+ИНТ» соответственно $24413,6 \pm 2419,6$ мс и $106523,4 \pm 26062,6$ ($p < 0,05$), в группах «Омега-3 ПНЖК+ФР» и «ПМ+ФР», соответственно, $23537,7 \pm 3508,46$ мс и $80638,5 \pm 15880,79$ мс ($p < 0,001$). Данные свидетельствуют о росте уровня тревожности у взрослых крыс, получавших омега-3 ПНЖК с молоком матери, независимо от того, были ли животные подверг-

нуты мягкому стрессированию в раннем постнатальном периоде.

У крыс подросткового возраста не обнаружено различий между группами по числу, длительности и латентному периоду появления вертикальных стоек, свешиваний из ОР и эпизодов груминга в ПКЛ.

У взрослых двухмесячных крыс число стоек, их длительность и латентный период появления ни в одной из групп не различались, за исключением тенденции к снижению длительности стоек в группе «Омега-3+ФР» по сравнению с группой «Омега-3+ИНТ» (соответственно $12117,1 \pm 2024,6$ мс и $17622,5 \pm 2156,8$ мс, $p = 0,089$), что, в целом, свидетельствовало об отсутствии нарушений вертикальной исследовательской активности в ПКЛ. По показателям поведения оценок риска (свешиваний из ОР) и эмоциональной напряженности (груминга) стрессированные крысы группы «ПМ+ФР» не отличались от крыс группы «ПМ+ИНТ», то есть последствий стрессирования как такового по этим показателям не было выявлено.

У взрослых крыс, получавших омега-3 ПНЖК с молоком матери, стрессирование (группа «Омега-3 ПНЖК+ФР») сопровождалось увеличением числа эпизодов груминга и снижением латентного периода его появления по сравнению с ИНТ крысами (группа «Омега-3 ПНЖК+ИНТ») (табл. 2), то есть омега-3 ПНЖК вызывали повышение эмоционального напряжения у взрослых крыс, перенесших стрессирование в неонатальном периоде. В группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» по сравнению с группой «ПМ+ФР» в тенденции было увеличено число эпизодов груминга и статистически значимо снижен латентный период его появления; было выражено снижение числа и длительности свешиваний (табл. 2), что свидетельствовало о повышении уров-

Таблица 2

Характеристика эмоционального напряжения и поведения оценок риска в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у двухмесячных крыс, подвергнутых действию физиологического раствора (ФР) в период с 5 по 18 постнатальные дни, и интактных (ИНТ) животных, вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или подсолнечное масло (ПМ) в период лактации

Группа	Груминг, число эпизодов	Груминг, длительность (мс)	Груминг, латентный период (мс)	Свешивания из ОР, число	Свешивания из ОР, длительность (мс)	Свешивания из ОР, латентный период (мс)
ПМ +ФР	$3,8 \pm 1,0$	$14805,2 \pm 6057,4$	$83956,8 \pm 18106,5$	$6,1 \pm 1,2$	$6170,3 \pm 1470,5$	$55971,9 \pm 32192,1$
ПМ + ИНТ	$2,7 \pm 0,7$	$23869,8 \pm 8352,3$	$109185,8 \pm 10104,1$	$6,8 \pm 1,9$	$7535,9 \pm 2924,2$	$21568,7 \pm 10084,3$
Омега-3 ПНЖК + ФР	$6,7 \pm 1,2$ +x	$36558,4 \pm 12313,6$	$37658,7 \pm 5245,2$ ++ •	$0,8 \pm 0,4$ ••	$552,2 \pm 272,7$ ••	$36363,8 \pm 29231,8$
Омега-3 ПНЖК + ИНТ	$3,5 \pm 0,7$	$16004,6 \pm 6430,0$	$133483,9 \pm 26693,6$	$0,2 \pm 0,1$ **	$156,2 \pm 107,5$ **	$123615,0 \pm 115682,0$

Примечание. ** $p < 0,01$ — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ+ИНТ», • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$; x $p < 0,08$ — по сравнению со значением показателя в группе «ПМ+ФР»; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ — по сравнению со значением показателя в группе «Омега-3+ИНТ». Сравнения проведены с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна—Уитни.

ня тревожности у этих животных на фоне эмоциональной напряженности. В группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» в сравнении с группой «ПМ+ИНТ» были снижены число свешиваний и их длительность (табл. 2), то есть омега-3 ПНЖК изменяли поведение оценок риска, повышая уровень тревожности у ИНТ крыс.

2.3. Депрессивноподобное поведение.

Тест принудительного плавания

Раннее стрессирование оказывало продепрессивное действие на крысят в возрасте 1 мес., увеличивая число кратких периодов иммобильности: в группе «ПМ+ФР» число периодов иммобильности было больше, чем в группе «ПМ+ИНТ» ($p = 0,09$) (рис. 5). В группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» число периодов иммобильности, суммарная длительность иммобильности и индекс депрессивности (в тенденции) были меньше, чем, в группе «ПМ+ФР», то есть омега-3 ПНЖК проявляли свойства антидепрессантов, предотвращая продепрессивное действие мягкого стресса. Различий в характеристиках плавательного поведения между группами крысят «ПМ+ИНТ» и «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» не выявлено, что свидетельствует об отсутствии влияния омега-3 ПНЖК на поведение ИНТ крысят подросткового возраста в тесте принудительного плавания.

Омега-3 ПНЖК оказывали также психостимулирующее действие на стрессированных животных, увеличивая в группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» среднюю длительность периодов активного плавания по сравнению с группами «ПМ+ФР» и «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» при сокращении числа таких периодов.

У крысят, достигших двухмесячного возраста, в тесте принудительного плавания не было обнаружено влияния омега-3 ПНЖК либо стрессирования как таковых. Однако у стрессированных животных омега-3 ПНЖК по-прежнему проявляли антидепрессивное и психостимулирующее действие: в группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» длительность пассивного плавания была снижена по сравнению с величиной данного показателя в группе «ПМ+ФР», а средняя длительность периодов активного плавания — увеличена по сравнению с группой «Омега-3+ИНТ».

2.4. Зоосоциальное взаимодействие

Стрессирование приводило к реструктуризации активного неагрессивного взаимодействия у крыс подросткового возраста: в группе «ПМ+ФР» по сравнению с группой «ПМ+ИНТ» число активных контактов (исключая груминг) было снижено, а число

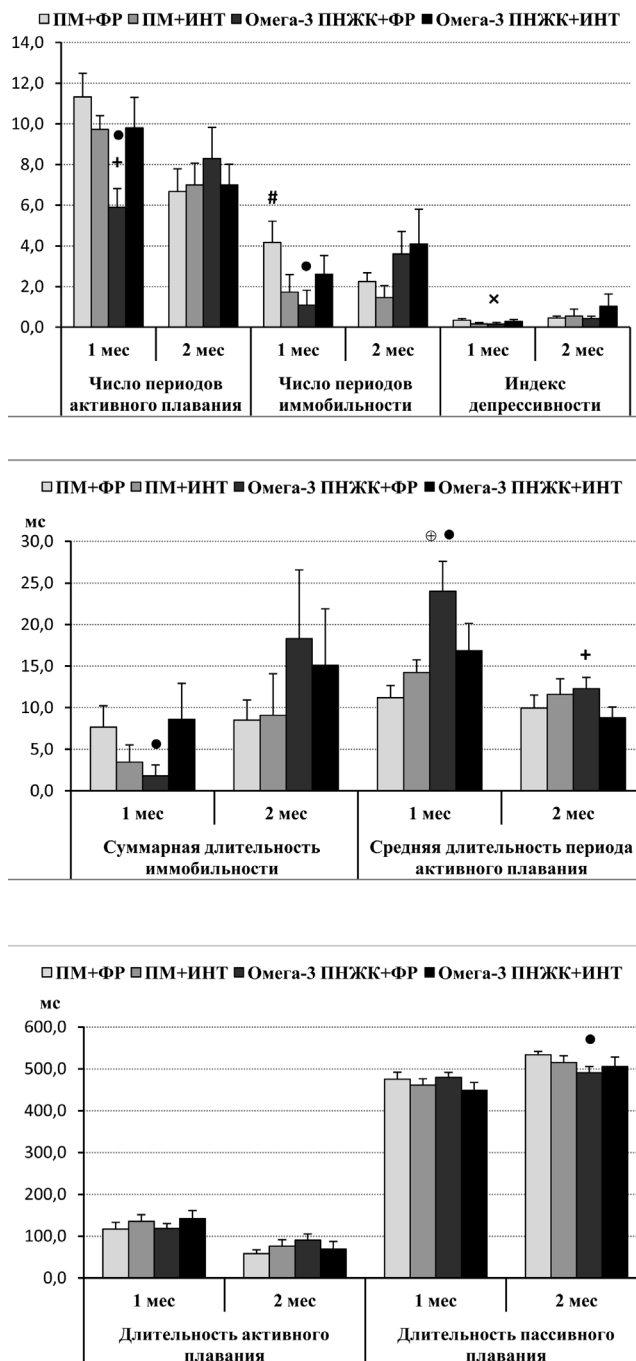


Рис. 5. Показатели поведения в тесте принудительного плавания у крыс, подвергнутых действию стрессирования многократным введением физиологического раствора (ФР) в период с 5 по 18 постнатальные дни, и интактных (ИНТ) животных, вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или подсолнечное масло (ПМ) в период лактации. # по сравнению с группой «ПМ+ИНТ», $p \leq 0,09$; • по сравнению с группой «ПМ+ФР», $p < 0,05$; x по сравнению с группой «ПМ+ФР», $p \leq 0,09$; + по сравнению с группой «Омега-3 ПНЖК+ИНТ», $p < 0,05$; ⊕ по сравнению с группой «Омега-3 ПНЖК+ИНТ», $p \leq 0,09$. Сравнение по непарному непараметрическому U-критерию Манна–Уитни.

эпизодов социального груминга, напротив, увеличено (рис. 6) без изменения общего числа неагрессивных контактов. Омега-3 ПНЖК сами по себе уменьшали число активных неагрессивных социальных контактов у ИНТ крыс подросткового возраста, не изменяя длительности таких контактов: в группе «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» число активных неагрессивных контактов было меньше, чем в группе «ПМ+ИНТ». Омега-3 ПНЖК предотвращали реструктуризацию активного неагрессивного поведения у стрессированных крысят, не уменьшая суммарного числа активных неагрессивных социальных контактов: в случае соче-

танного действия омега-3 ПНЖК и стрессирования (группа «Омега-3 ПНЖК+ФР») негативные эффекты каждого из факторов не проявлялись.

У крыс, достигших двухмесячного возраста, перенесенное в неонатальном периоде мягкое стрессирование проявлялось увеличением числа неагрессивных социальных контактов: в группе «ПМ+ФР» число контактов было выше, чем в группе «ПМ+ИНТ» (рис. 6). Омега-3 ПНЖК сами по себе не изменяли число и длительность неагрессивных социальных контактов (группа «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» в сравнении с группой «ПМ+ИНТ»), но предотвращали их увеличение у крыс, перенесших стрессирование (группа «Омега-3 ПНЖК+ФР» в сравнении с группой «Омега-3 ПНЖК+ИНТ»).

Длительность неагрессивных социальных контактов в группах статистически значимо не различалась ни на одном из сроков обследования.

Стрессирование само по себе не влияло на агрессивное поведение крыс-подростков (группа «ПМ+ФР» в сравнении с группой «ПМ+ИНТ») (рис. 6). Омега-3 ПНЖК сами по себе также не оказывали влияния на агрессивность животных (группа «Омега-3 ПНЖК+ИНТ» в сравнении с группой «ПМ+ИНТ»). В группе «Омега-3 ПНЖК+ФР» не выявлено статистически значимых отличий в величинах показателей агрессивного поведения от групп «ПМ+ФР» и «Омега-3 ПНЖК+ИНТ», хотя обращает на себя внимание большая вариативность величины этих показателей.

У взрослых крыс в возрасте 2 мес. не просматривалось последствий стрессирования по показателям агрессивного поведения, однако в группе ИНТ крыс, получавших омега-3 с молоком матери («Омега-3 ПНЖК+ИНТ»), были увеличены (на уровне выраженной тенденции) суммарное число и длительность агрессивных эпизодов (соответственно, $\rho = 0,095$ и $\rho = 0,056$) по сравнению с группой «ПМ+ИНТ». Сочетанное действие омега-3 ПНЖК и стрессирования (группа «Омега-3 ПНЖК+ФР») по показателям агрессивного поведения было сходно с проагрессивным действием омега-3 ПНЖК у ИНТ крыс, однако отличие от величины показателей группы «ПМ+ФР» не достигало уровня статистической значимости.

Изучение в динамике эффектов омега-3 ПНЖК, полученных с молоком матери, проведено на крысятах, подвергнутых процедуре многократного внутрибрюшинного введения ФР, которая является стандартной для контрольных групп в нейрофармакологических исследованиях. Эта процедура, включающая в себя стресс, связанный с хэндлингом и уколами, относится к щадящим стресс-воздействиям и, как правило, не изменяет поведение взрослых крыс,

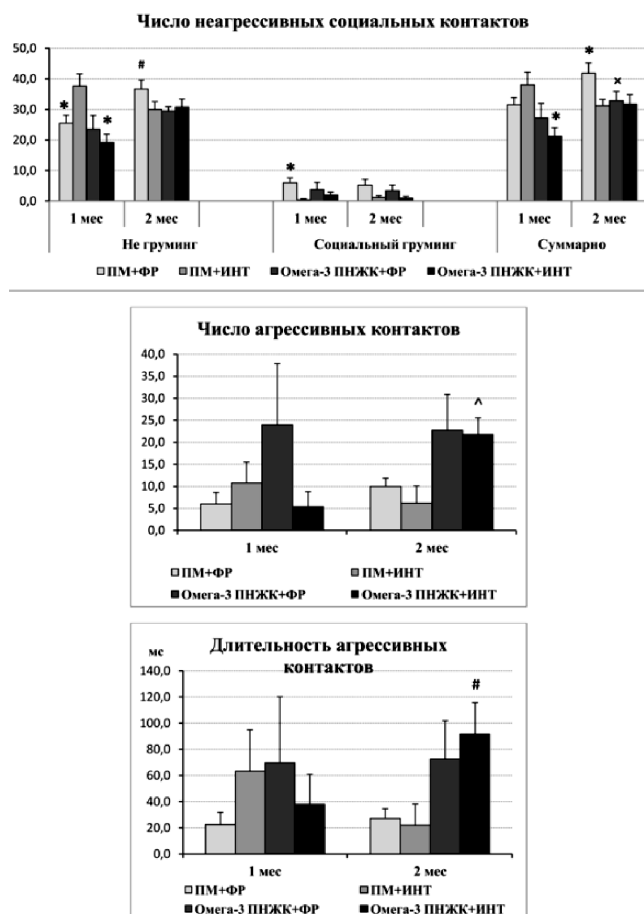


Рис. 6. Показатели неагрессивного и агрессивного взаимодействия в тесте социальных контактов у крыс, подвергнутых действию стрессирования многократным введением физиологического раствора (ФР) в период с 5 по 18 постнатальные дни, и интактных (ИНТ) животных, вскормленных крысами-самками, получавшими омега-3 ПНЖК или подсолнечное масло (ПМ) в период лактации. Общее число неагрессивных социальных контактов определяли как сумму эпизодов социального груминга и эпизодов всех других видов неагрессивного социального взаимодействия (не груминг). * по сравнению со значением показателя в группе «ПМ+ИНТ», $p < 0,05$; # по сравнению с группой «ПМ+ИНТ», $p < 0,06$; ^ по сравнению с группой «ПМ+ИНТ», $p < 0,1$; x по сравнению с группой «ПМ+ФР», $p < 0,09$. Сравнение по непарному непараметрическому U-критерию Манна–Уитни.

однако может приводить к нарушениям физиологических реакций [22] и вызывать ультраструктурные изменения в нервных клетках крыс [20], то есть может сопровождаться нейропластическими изменениями. В целом, такую процедуру можно рассматривать как модель мягкого стресса. Однако с учетом того, что в неонатальном периоде мозг отличается особой чувствительностью сенсорных систем к стимуляции [23], процедура многократного введения ФР в период раннего онтогенеза может провоцировать возникновение нейропластических перестроек в ЦНС, существенных для дальнейшего изменения поведения. Действительно, мы обнаружили, что крысята, перенесшие двухнедельную процедуру введения ФР на 2—3-й нед постнатального развития, в возрасте 1 мес. отстают в наборе веса (рис. 1) демонстрируют признаки повышения тревожности (рис. 2) и депрессивности (рис. 5) в поведении. У них также изменяется характер зоосоциального взаимодействия, а именно, уменьшается число неагрессивных социальных контактов всех типов, за исключением социального груминга. (рис. 6). У взрослых животных в возрасте 2 мес. поведение нормализуется. Более того, отмечается выраженная тенденция к повышению исследовательской активности, что, по-видимому, находит отражение в значительном увеличении числа неагрессивных социальных контактов (рис. 6). Таким образом, субхроническое введение ФР в раннем постнатальном периоде сопровождается нарушениями в поведении крыс, выраженными преимущественно в подростковом возрасте.

В настоящей работе на данной модели мягкого стресса получено принципиальное подтверждение наличия антидепрессивного и психостимулирующего действия омега-3 ПНЖК у животных, перенесших стрессирование, и показано, что эффект наблюдается на разных стадиях онтогенеза. Вместе с тем, использованный подход к оценке эмоционально-мотивационного поведения крыс в динамике их взросления позволил выявить негативное влияние омега-3 ПНЖК на поведение как ИНТ крыс, так и крыс, стрессированных в раннем неонатальном периоде, что проявлялось наличием признаков повышенной тревожности, более выраженных у взрослых животных, снижением ориентировочно-исследовательской деятельности у взрослых крыс, увеличении числа и длительности агрессивных эпизодов у взрослых животных.

Выраженность негативных последствий приема омега-3 ПНЖК кормящими самками крыс по показателям эмоционально-мотивационного поведения потомства усиливается в динамике взросления крысят. Об усилении тяжести последствий дефицита омега-3 ПНЖК в рационе мышей по мере их взрос-

ления сообщалось в работе [24]. По-видимому, как недостаток омега-3 ПНЖК, так и обогащение пищи путем их добавления в раннем онтогенезе могут иметь отдаленные последствия, проявляющиеся в негативном влиянии на эмоционально окрашенное поведение.

Особый интерес представляет тот факт, что в случае раннего постнатального действия омега-3 ПНЖК их отдаленные эффекты различаются по знаку: позитивные по показателям предотвращения развития депрессивности в поведении стрессированных животных и негативные по показателям повышения тревожности и агрессивности, заметного у взрослых ИНТ крыс. Данные, полученные в настоящей работе на модели мягкого стресса, вызванного многократным введением ФР крысятам в раннем постнатальном периоде, принципиально согласуются с данными, полученными на других моделях стрессирования. В работе Nakashima et al. [25] показано, что прием омега-3 ПНЖК по сравнению с приемом омега-6 ПНЖК кормящими самками мышей и мышатами после их отлучения от матери сопровождается ростом тревожности шестинедельных мышат в тесте ПКЛ. В работе Vancassel et al. [26] добавление омега-3 ПНЖК в рацион мышей, подвергавшихся классическому хроническому мягкому стрессу, приводило к ухудшению поведения животных в тесте подавления приема пищи в условиях новизны: латентный период взятия корма возрастал как у стрессированных, так и у контрольных взрослых животных с предварительной пищевой депривацией. Авторы предполагают наличие у омега-3 ПНЖК подавляющего действия на пищевую мотивацию в условиях конфликта пищевой мотивации и страха новизны и, на основании полученных ими данных, считают, что антистрессорное действие омега-3 ПНЖК обусловлено их влиянием на состояние центральных моноаминергических систем в структурах мозга. В исследовании Chalon et al. [27] было выявлено снижение двигательной активности в автоматизированном тесте «открытого поля» у крыс, подвергнутых стрессу ограничения и получавших пищу, обогащенную омега-3 ПНЖК, что хорошо согласуется с полученными нами результатами. Авторы связывают такое снижение с нарушением функционирования кортикальной дофаминергической системы.

В наших предыдущих исследованиях по изучению антидепрессивного действия у синтетических ингибиторов ПЭП на моделях депрессивноподобных и смешанных тревожно-депрессивных состояний [3—5] мы связывали генез таких состояний с изменениями функциональной активности пролинспецифических пептидаз ПЭП и ДПП-IV в ЦНС. По-видимому, в случаях появления у ИНТ крысят негативных последствий приема омега-3 ПНЖК, обладающих

свойствами ингибиторов ПЭП, в механизмах развития этих нарушений также участвуют данные пептидазы, в первую очередь, ПЭП. Это предположение находит поддержку в работе Peltonen et al. [28], показавших, что ПЭП играет регуляторную роль в модуляции дофаминергической передачи, различающуюся в nigrostriатной и мезолимбической дофаминергических системах и осуществляющуюся, по-видимому, опосредованно через рецепторы нейротензина. Таким образом, просматривается опосредованная взаимосвязь действия ингибиторов ПЭП — омега-3 ПНЖК — с изменением состояния моноаминергических, в частности, дофаминергических систем мозга, вовлеченных в генез аффективных нарушений, что в определенных условиях может проявляться развитием негативной симптоматики в эмоционально-мотивационном поведении.

Известно, что омега-3 ПНЖК обладают иммунорегуляторным действием [29]. Вклад ЭПК и ДГК в иммунорегуляторные эффекты омега-3 ПНЖК различен: ЭПК не оказывает влияния на уровень цитокинов в экспериментах *ex vivo*, тогда как ДГК изменяет соотношение цитокинов в пользу провоспалительных, что может способствовать появлению расстройств настроения [30]. Интересно, что ДГК обладают более выраженным тормозным действием на ПЭП, чем ЭПК [6]. Нельзя исключить, что выявленные нами разные поведенческие эффекты омега-3 ПНЖК у стрессированных и ИНТ крысят могут быть обусловлены разнонаправленными влияниями составляющих омега-3 ПНЖК компонентов и зависят от состояния стресс-реактивных систем животного. Кроме того, заслуживает внимания факт смены знака действия омега-3 ПНЖК на уровень тревожности в сторону ухудшения оценки в зависимости от возраста крыс, а также то, что нарушения поведения вследствие приема омега-3 ПНЖК с молоком матери были длительными и усиливались во взрослом возрасте.

К механизмам действия омега-3 ПНЖК, без разделения эффектов на позитивные и негативные, как сказано выше, относят их регуляторное влияние на состояние моноаминергических систем и иммунной системы мозга [28—29]. Обнаружено влияние омега-3 ПНЖК на нейрогенез в гиппокампе и активность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси [10]. Все эти механизмы связаны с состоянием нейропсихического здоровья. Результаты настоящей работы позволяют добавить в этот список еще один механизм, посредством которого омега-3 ПНЖК могут оказывать влияние на эмоционально-мотивационное поведение — торможение активности ПЭП.

Заключение

На модели мягкого стресса, вызванного многократным внутривентриальным введением ФР крысам на 2—3-й нед постнатального развития, показано что омега-3 ПНЖК, обладающие свойствами ингибиторов ПЭП, в условиях их приема кормящими самками проявляют выраженное антидепрессивное и психостимулирующее действие на поведение потомства.

Омега-3 ПНЖК в тесте социального взаимодействия предотвращали стресс-индуцированную реструктуризацию активного неагрессивного поведения у крыс подросткового возраста. У взрослых крыс омега-3 ПНЖК предотвращали вызванное стрессированием увеличение числа неагрессивных социальных контактов, однако увеличивали суммарное число и длительность агрессивных эпизодов (на уровне выраженной тенденции) у интактных животных.

Омега-3 ПНЖК, полученные с молоком матери, в тесте ПКЛ оказывали анксиолитическое действие на крысят подросткового возраста по показателю увеличения предпочтения открытых рукавов и анксиогенное — по показателю роста числа колебаний при исследовании лабиринта. По достижении двухмесячного возраста омега-3 ПНЖК по большинству показателей в этом тесте оказывали анксиогенное действие как на интактных, так и на стрессированных животных.

Омега-3 ПНЖК не предотвращали вызванную стрессированием задержку в наборе веса у крысят подросткового возраста и вызывали снижение ориентировочно-исследовательской активности у взрослых крыс независимо от факта стрессирования.

Последствия действия омега-3 ПНЖК, полученных с молоком матери, включавшие в себя как позитивное, так и негативное влияние на поведение крыс, наблюдались на протяжении всего двухмесячного периода наблюдения и различались у животных подросткового и взрослого возраста.

Результаты работы являются новым экспериментальным свидетельством вовлеченности ПЭП в патогенез депрессивноподобного поведения, тревожности и агрессивности и расширяют представления о спектре возможных негативных влияний омега-3 ПНЖК в условиях их приема кормящими самками на поведение потомства в разные периоды постнатального онтогенеза.

References

1. Garcia-Horsman J.A., Mannisto P.T., Venalainen J.I. On the role of prollyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*. 2007; 41(1):1-24.
2. Hofling C., Kuleshkaya N., Jaako K., Peltonen I., Mannisto P.T., Nurmi A. et al. Deficiency of prollyl oligopeptidase in mice disturbs synaptic plasticity and reduces an-

- xiety-like behaviour, body weight, and brain volume. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016; 26(6):1048-61. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2016.02.015.
3. Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kushnareva E.Yu., Bogdanova N.G., Orlova I.N. Synthetic inhibitors of prolyl endopeptidase exhibit antidepressant-like effects in rat models of depressive syndrome and anxiety-depression state. In: Jayden T. Van Leeuwen, ed. *Antidepressants: Types, Efficiency and Possible Side Effects*. NY: Nova Science Publishers, Inc.; 2010: 135-54, ISBN 978-1-61668-581-2
 4. Krupina N.A., Bogdanova N.G., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Benzyloxycarbonyl-methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine, a prolyl endopeptidase inhibitor, modulates depression-like behavior of rats in forced swimming test and activities of proline-specific peptidases in the brain structures. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 154(5): 606-9. DOI: 10.1007/s10517-013-2010-y.
 5. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Yu., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Effect of imipramine and prolyl endopeptidase inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine on activity of proline-specific peptidases in the brain of rats with experimental anxious-depressive syndrome. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 152(4): 409-12. DOI: 10.1007/s10517-012-1540-z.
 6. Park Y.S., Jang H.J., Lee K.H., Hahn T.R., Paik Y.S. Prolyl endopeptidase inhibitory activity of unsaturated fatty acids. *J. Agric. Food. Chem.* 2006; 54(4): 1238-42. DOI: 10.1021/jf052521h
 7. Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Neonatal exposure to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitors diprotin A and sitagliptin induces depression-like behavior, anxiety, and latent aggression in adolescent and adult rats. *J. Behav. Brain Sci.* 2016; 6(4): 167-83. DOI: 10.4236/jbbs.2016.64018
 8. Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Omega-3 polyunsaturated fatty acids when administered to lactating rats modify the development of experimental anxiety-depressive state in the rat pups exposed to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor diprotin A on the second — third weeks after the birth. *Patol. Fiziol. Eksp. Ther.* 2016; 60 (4): 9 -19. (in Russian)
 9. Wilczynska-Kwiatkowska A., Singh Ram B., De Meester F. *Nutrition and Behaviour: The Role of ω 3 Fatty Acids*. The Open Nutraceuticals J. 2010; 3: 119-128. DOI: 10.2174/18763960010030300119
 10. Larriue T., Hilal M.L., Fourrier C., De Smedt-Peyrusse V., Sans N., Capuron L. et al. Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behaviour through corticosterone secretion. *Transl. Psychiatry.* 2014 Sep 9; 4:e437. DOI: 10.1038/tp.2014.77.
 11. McNamara R.K., Carlson S.E. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2006; 75(4-5): 329-49. DOI:10.1016/j.plefa.2006.07.010
 12. Green P., Yavin E. Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. *Lipids.* 1996; 31(8): 859-65. DOI:10.1007/BF02522981
 13. Yehuda S., Rabinovitz S., Mostofsky D.I. Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging. *Neurobiol. Aging.* 2005; 26(Suppl. 1): 98-102. DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.013
 14. Carlson S.J., Fallon E.M., Kalish B.T., Gura K.M., Puder M. The role of the ω -3 fatty acid DHA in the human life cycle. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 2013; 37(1):15-22. DOI: 10.1177/0148607112467821
 15. Buydens-Branchey L., Branchey M., Hibbeln J.R. Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2008; 32(2): 568-75. DOI:10.1016/j.pnpbp.2007.10.020
 16. Ferraz A.C., Delattre A.M., Almendra R.G., Sonagli M., Borges C., Araujo P., Andersen M.L., Tufik S., Lima M.M. Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behav. Brain Res.* 2011; 219(1): 116-22. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.12.028.
 17. Takeuchi T., Iwanaga M., Harada E. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res.* 2003; 964(1): 136-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04113-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04113-6)
 18. Appleton K.M., Grippo A.J., Beltz T.G., Johnson A.K. Consumption of a high n-3 polyunsaturated fatty acid diet during gradual mild physiological stress in rats // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2015; 95: 11-8. DOI: 10.1016/j.plefa.2014.11.010.
 19. Adell A., Casanovas J. M., Artigas F. Comparative Study in the Rat of the Actions of Different Types of Stress on the Release of 5-HT in Raphe Nuclei and Forebrain Areas. *Neuropharmacology.* 1997; 36(4-5): 735-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00048-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00048-8)
 20. Folan J.C., Johansson O., Heym C. Paraganglionic cell response to chronic imipramine and handling stress: an ultrastructural study. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 1990; 79(3): 169-81. DOI:10.1007/BF01245128
 21. Rosenfeld P., Gutierrez Y.A, Martin A.M., Mallett H.A., Alleve E., Levine S. Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rats. *Physiol. Behav.* 1991; 50(4): 661-71. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90001-5](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(91)90001-5)
 22. Paniagua N., Giron R., Goicoechea C., Lopez-Miranda V., Vela J.M., Merlos M., Martin Fontelles M.I. Blockade of sigma 1 receptors alleviates sensory signs of diabetic neuropathy in rats. *Eur. J. Pain.* 2017; 21(1):61-72. DOI: 10.1002/ejp.897.
 23. Freitas D., Antoniazzi C.T., Segat H.J., Metz V.G., Vey L.T., Barcelos R.C. et al. Neonatal tactile stimulation decreases depression-like and anxiety-like behaviors and potentiates sertraline action in young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2015; 47(Pt B): 192-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.09.010>
 24. Carrie I., Clement M., de Javel D., Frances H., Bourre J.-M. Phospholipid supplementation reverses behavioural and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J. Lipid Res.* 2000; 41(3): P. 473-80.
 25. Nakashima Y., Yuasa S., Hukamizu Y., Okuyama H., Ohhara T., Kameyama T. et al. Effect of a high linoleate and a high α -linolenate diet on general behaviour and drug sensitivity in mice. *J. Lipid Res.* 1993; 34(2): 239-47.
 26. Vancassel S., Leman S., Hanonick L., Denis S., Roger J., Nolle M. et al. n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *J. Lipid Res.* 2008; 49(2): 340-8. DOI:10.1194/jlr.M700328-JLR200
 27. Chalou S., Delion-Vancassel S., Belzung C., Guillo-teau D., Leguisquet A.M., Besnard J.C. et al. Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behaviour in rats. *J. Nutr.* 1998; 128(12): 2512-9.
 28. Peltonen I, Myohanen T.T., Mannisto P.T. Different interactions of prolyl oligopeptidase and neurotensin in do-

paminergic function of the rat nigrostriatal and mesolimbic pathways. *Neurochem Res.* 2012; 37(9):2033-41. DOI: 10.1007/s11064-012-0825-y.

29. Su K.P. Biological mechanism of antidepressant effect of omega-3 fatty acids: how does fish oil act as a 'mind-body interface'? *Neurosignals.* 2009; 17(2):144-52. DOI: 10.1159/000198167.

30. Maes M., Mihaylova I., Kubera M., Bosmans E. Why fish oils may not always be adequate treatments for depression or other inflammatory illnesses: docosahexaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated fatty acid, induces a Th-1-like immune response. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2007; 28: 875-80.

Сведения об авторах:

Хлебникова Надежда Николаевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: nanikh@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Ветрилэ Л.А.¹, Невидимова Т.И.², Мастерова Е.И.², Бохан Н.А.²,
Захарова И.А.¹, Савочкина Д.Н.², **Фомина В.Г.**¹, Давыдова Т.В.¹

Антитела к нейромедиаторам — нейроиммунные маркеры в персонализированной профилактике болезней зависимости

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Томского НИМЦ РАН, 634014, г. Томск, Россия, ул. Алеутская, д. 4

Цель исследования — изучение содержания аутоантител к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК на разных стадиях развития зависимости от ПАВ, а также влияние различных видов наркотиков на их уровень в сыворотках крови. **Методика.** Исследование выполнено на базе отделения аддиктивных состояний и лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН. Группу здоровых людей составили 148 студентов средних специальных и высших учебных заведений. Группа наркологических пациентов состояла из 203 лиц. Кровь для исследования у наркологических пациентов брали однократно при поступлении в стационар или на диспансерном приеме. У добровольцев кровь брали однократно при обследовании. Антитела к нейромедиаторам дофамину (ДА), норадреналину (НА), серотонину (5-ОТ), глутамату (ГЛУ) и ГАМК определяли методом твердофазного ИФА (ELISA) на полистироловых 96-луночных планшетах, сенсibilизированных тест-антигеном. В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты нейромедиатора с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Конъюгированные антигены ДА-БСА и 5-ОТ-БСА синтезировали с использованием диазотированного белка. Конъюгаты НА-БСА, ГЛУ-БСА и ГАМК-БСА синтезировали с помощью глутарового альдегида. Полученные данные статистически обрабатывали с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни и точного метода Фишера. **Результаты.** Установлено, что уровень антител к нейромедиаторам (ДА, НА, 5-ОТ, ГЛУ, ГАМК) может отражать изменения в нейротрансмиттерных системах головного мозга, происходящие при развитии зависимости от ПАВ и выявлять особенности действия различных наркотических веществ. Наиболее существенное усиление продукции аутоантител к нейромедиаторам наблюдалось у пациентов с опийной наркоманией. Пациенты, злоупотреблявшие психоактивными веществами без развития зависимости, но с вредными последствиями для здоровья, характеризовались низким уровнем аутоантител к нейромедиаторам. При этом следует особо отметить более выраженное снижение уровня аутоантител к глутамату в этой группе пациентов. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют, что аутоантитела к нейромедиаторам особенно к дофамину, норадреналину, глутамату могут рассматриваться в качестве нейроиммунных маркеров стадийного развития аддиктивных состояний.

Ключевые слова: болезни зависимости; опийная наркомания; антитела к нейромедиаторам, дофамин; норадреналин; серотонин; глутамат; ГАМК.

Для цитирования: Ветрилэ Л.А., Невидимова Т.И., Мастерова Е.И., Бохан Н.А., Захарова И.А., Савочкина Д.Н., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. Антитела к нейромедиаторам — нейроиммунные маркеры в персонализированной профилактике болезней зависимости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 31—37.
DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.31-37

Для корреспонденции: Давыдова Татьяна Викторовна, гл. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: dav-ta@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ отделение гуманитарных и общественных наук Грант № 16-06-00617.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.12.2016

Vetrile L.A.¹, Nevidimova T.I.², Masterova E.I.², Bokhan N.A.²,
Zakharova I.A.¹, Savochkina D.N.², **Fomina V.G.**², Davydova T.V.²

Antibodies to neurotransmitters — neuroimmune markers in individual prevention of addiction

¹ FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315 Moscow, Baltiyskaya str., 8

² FSBSI Mental Health Research Institute Tomsk NRMС RAS, 634014 Tomsk, Aleutskaya str., 4

The purpose. The aim of this work was to study the level of autoantibodies to neurotransmitters dopamine, noradrenaline, serotonin, glutamate and GABA at different stages of development of the psychoactive substances dependence, as well as the effect of various types of narcotics on their serum levels. **Methods.** The study was performed on the basis of the department of addictive states and the laboratory of clinical psychoneuroimmunology and neurobiology of the Mental Health Research Institute Tomsk NRMC RAS. The group of healthy people was 148 students of secondary special and higher educational institutions. The group of narcological patients consisted of 203 persons. Blood for study in narcological patients was taken only once on admission to hospital or on a dispensary. The volunteers received blood once during the examination. Antibodies to neurotransmitters dopamine (DA), norepinephrine (NA), serotonin (5-OT), glutamate (GLU) and GABA were determined by solid-state ELISA (ELISA) on polystyrene 96-well plates sensitized with test antigen. As test antigens were used. neuromediators conjugate with bovine serum albumin (BSA). Conjugated DA-BSA and 5-OT-BSA antigens were synthesized using a diazotized protein. Conjugates of NA-BSA, GLU-BSA and GABA-BSA were synthesized with glutaraldehyde. The data obtained were statistically processed using the nonparametric Mann—Whitney test and Fisher's exact method. **Results.** As a result of the study, it was established that the level of antibodies to neurotransmitters (DA, NA, 5-OT, GLU, GABA) may reflect changes in neurotransmitter systems of the brain that occur when development of the psychoactive substances dependence and may to reveal the specific features of the action of various narcotic substances. The most significant increase in the production of autoantibodies to neurotransmitters was observed in patients with opiate addiction. Patients who abused psychoactive substances without dependence development, but with harmful health effects, were characterized by a low level of autoantibodies to neurotransmitters. In this case, we should especially note a more pronounced decrease in the level of autoantibodies to glutamate in this group of patients. **Conclusions.** The data obtained indicate that autoantibodies to neurotransmitters, especially dopamine, norepinephrine, glutamate can be considered as neuroimmune markers of the stage development of addictive states.

Keywords: dependence diseases, opiate addiction, antibodies to neurotransmitters, dopamine, norepinephrine, serotonin, glutamate, GABA.

For citation: Vetrile L.A.¹, Nevidimova T.I.², Masterova E.I.², Bokhan N.A.², Zakharova I.A.¹, Savochkina D.N.², Fomina V.G.¹, Davydova T.V.¹ Antibodies to neurotransmitters — neuroimmune markers in individual prevention of addiction. *Patjlogicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy. Russian Journal)*. 2017; 61(3): 31—37. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.31-37

For correspondence: Davydova Tatiana V., principal researcher FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», e-mail: dav-ta@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research Department of Humanities and Social Sciences Grant № 16-06-00617

Information about authors:

Nevidimova T.I., <http://orcid.org./0000-0002-5084-9200>

Bokhan N.A., <http://orcid.org./0000-0002-1052-855X>

Davydova T.V., <http://orcid.org./0000-0002-3176-1035>

Received 18.12.2016

Введение

Ключевую роль в разработке технологий персонализированной профилактики болезней зависимости играет изучение молекулярных нейроиммунных механизмов развития аддиктивных расстройств. Согласно современным данным, одним из ведущих звеньев молекулярно-генетических механизмов зависимости от психоактивных веществ (ПАВ) являются функциональные нарушения нейромедиаторных систем мозга. Фундаментальными исследованиями установлена ведущая роль мезолимбической дофаминергической нейромедиаторной системы в формировании зависимости от психоактивных веществ [1—3]. Многочисленными исследованиями последних лет установлено, что в патогенезе аддиктивных расстройств наряду с дофаминергической нейромедиаторной системой,

важную роль играют норадреналин-, серотонин-, глутамат- и ГАМК-эргические нейромедиаторные системы. Повторные введения морфина или других наркотических веществ изменяют специфическую активность нейромедиаторных систем, изменяя высвобождение ряда нейромедиаторов, включая дофамин, серотонин, норадреналин, ГАМК и глутамат [4]. Введение кокаина или амфетамина вызывают увеличение внеклеточного уровня норадреналина и серотонина посредством ингибирования соответствующих мембранных транспортёров или стимуляции выделения моноаминов [5]. Глутамат- и ГАМК-эргические нейромедиаторные системы, являясь главными возбуждающими и тормозными системами ЦНС, модулируют формирование зависимости от ПАВ. В механизмах развития зависимого от наркотических веществ поведения вовлечены несколько групп глутаматных рецеп-

торов: ионотропные AMPA- и NMDA-рецепторы (NR1 и NR2 субъединицы) и метаботропные рецепторы (mGLUR3, mGLUR5, mGLUR7). Экспериментальными исследованиями было установлено, что повторные введения кокаина приводили к глубоким изменениям глутаматергической трансмиссии в лимбических структурах, в частности в *n. accumbens* [6, 7]. Острое или хроническое введение опиатов вызывает значительное снижение концентрации глутамата в гиппокампе мышей [8] и повышение его содержания в *n. accumbens*. В период синдрома отмены морфина, вызванного налоксоном, наблюдается существенное увеличение концентрации глутамата и субъединиц NR1 и NR2 NMDA рецептора в разных областях мозга [9,10]. В последнее десятилетие в результате доклинических исследований на животных было сделано предположение о критической роли глутамата на всех стадиях развития наркотической зависимости: вознаграждение, подкрепление и рецидив. Большинство наркотических препаратов видоизменяют гомеостаз глутамата на внеклеточном, синаптическом и постсинаптическом уровнях, который модулирует синаптическую прочность и пластичность через взаимодействия с ионотропными и метаботропными глутаматными рецепторами [11]. Таким образом, зависимость от психоактивных веществ — это сложный поликомпонентный синдром, в формировании которого участвуют все нейротрансмиттерные системы головного мозга. В связи с этим особый интерес вызывает изучение факторов нейроиммунных взаимодействий в нейротрансмиттерных системах мозга, к которым в первую очередь можно отнести антитела к нейромедиаторам. Последние могут рассматриваться в качестве нейроиммунных маркеров болезненной зависимости. Ранее нами было показано, что в группе риска по формированию зависимости от психоактивных веществ было отмечено существенное снижение уровня антител к норадреналину, дофамину, серотонину и глутамату по сравнению с группой студентов-добровольцев, не употреблявших психоактивные вещества [12]. Цель работы — изучение содержания аутоантител к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК на разных стадиях развития зависимости от ПАВ, а также влияние различных видов наркотиков на их уровень в сыворотках крови.

Методика

Клиническое обследование и создание банка биологического материала осуществлены на базе отделения аддиктивных состояний и лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН.

Формирование групп обследованных проходило также на базе Томского, Кемеровского и Юргинского наркологических диспансеров. Группу здоровых людей составили 148 студентов средних специальных и высших учебных заведений. Группа наркологических пациентов состояла из 203 лиц. Клиническая верификация диагнозов осуществлялась психиатрами-наркологами в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Около 70% пациентов страдали зависимостью от ПАВ (преимущественно опиоидной зависимостью). У остальных пациентов диагностировано употребление каннабиноидов и других ПАВ с вредными последствиями. Критериями включения пациентов, в группу обследованных явились верифицированный диагноз, письменное информированное согласие на участие в исследовании, возраст 18—28 лет. Критериями исключения были наличие эндогенных психических расстройств и умственной отсталости, неврологической патологии, соматических расстройств в стадии обострения. Для контрольной группы здоровых лиц критериями включения были письменное информированное согласие добровольца на участие в исследовании, пол и возраст, сопоставимые с основной группой. Критериями исключения были наличие психических расстройств, неврологической патологии, соматических расстройств в стадии обострения. Кровь для исследования у наркологических пациентов брали однократно при поступлении в стационар или на диспансерном приеме. У добровольцев кровь брали однократно при обследовании.

Антитела к нейромедиаторам дофамину (ДА), норадреналину (НА), серотонину (5-ОТ), глутамату (ГЛУ) и ГАМК определяли методом твердофазного ИФА (ELISA) на полистироловых 96-луночных планшетах, сенсibilизированных тест-антигеном. В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты нейромедиатора с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Конъюгированные антигены ДА-БСА и 5-ОТ-БСА синтезировали с использованием диазотированного белка [13]. Конъюгаты НА-БСА, ГЛУ-БСА и ГАМК-БСА синтезировали с помощью глутарового альдегида [13]. Тест-антиген вносили в объеме 100 мкл в лунки планшета (Costar, USA) в конечной концентрации 0,3 мкг/лунку. Через 18 ч инкубации при 4°C планшеты 4—5 раз промывали физиологическим раствором с 0,05% твином-20. Тестируемые сыворотки вносили в объеме 100 мкл в 0,05 М фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,4 с 0,05% твином-20 в конечном разведении 1:50. После инкубации в течение 1 ч при 37°C планшеты промывали физиологическим раствором с 0,05% твином-20 3—4 раза и обрабатывали вторичными антителами к IgG человека, меченные пе-

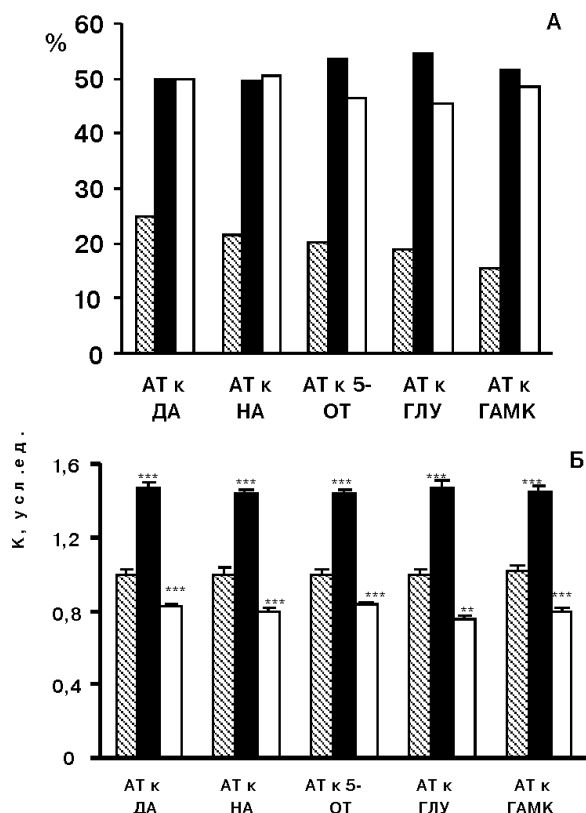


Рис. 1. Частота выявления (А) и содержание (Б) аутоантител к нейромедиаторам в сыворотке крови здоровых лиц и наркологических пациентов:

А — по оси ординат: % встречаемости антител к нейромедиаторам; Б — по оси ординат содержание аутоантител к нейромедиаторам (К, усл.ед.) по оси абсцисс аутоантитела к нейромедиаторам. Косая штриховка — контроль; черные столбики — высокий уровень антител; белые столбики — низкий уровень антител. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с группой здоровых лиц.

роксидазой хрена («Sigma»), в разведении 1:2000. После часовой инкубации в термостате при 37°C планшеты промывали 3—4 раза физиологическим раствором с 0,05% твин-20 и в лунки добавляли по 100 мкл субстратной смеси, содержащей равные объемы 0,2 М раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 0,1 М раствора лимонной кислоты, 8 мг о-фенилдиамина, 8 мкл 33% раствора H_2O_2 . После часовой инкуба-

ции в темноте при комнатной температуре реакцию останавливали 6 н. H_2SO_4 . Содержание антител в каждой лунке оценивали по оптической плотности сыворотки при $\lambda = 492$ нм с использованием считывающего устройства «Mini-reader» («ImmunoChem-2100», USA) и выражали в условных единицах активности показателем «К», представляющим отношение оптической плотности сыворотки крови каждого больного к среднему значению сывороток крови здоровых доноров.

Полученные данные статистически обрабатывали по алгоритмам программы «Statistica 6.0» с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни и точного метода Фишера. Критические значения уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимались равными 0,05. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, где M — среднее, SEM — стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

В группе наркологических пациентов с зависимостью от ПАВ среднее содержание аутоантител к нейромедиаторам (дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК) в сыворотках крови было существенно выше по сравнению с контрольной группой здоровых лиц (табл. 1).

При анализе содержания аутоантител к нейромедиаторам в группе наркологических пациентов были выявлены лица с разным уровнем аутоантител к нейромедиаторам, которых можно было разделить на подгруппы: одна — с высоким содержанием аутоантител к нейромедиаторам, и другая — пациенты, у которых уровень аутоантител в сыворотке крови было ниже, чем в контрольной группе (рис. 1 А, Б).

В связи с этим представляло интерес изучение содержания аутоантител к дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК в зависимости от времени развития зависимости от ПАВ. Так, наркологические пациенты были разделены на 2 группы: 1-я группа — пациенты, употребляющие ПАВ с вредными последствиями (иными словами, злоупот-

Таблица 1

Содержание аутоантител к нейромедиаторам в сыворотке крови здоровых лиц и пациентов с зависимостью от ПАВ ($M \pm m$)

Группа обследованных	Кол-во обследованных	Уровень аутоантител к нейромедиаторам (К, усл.ед.)				
		ДА	НА	5-ОТ	ГЛУ	ГАМК
Здоровые лица (контроль)	148	0,994 ± 0,028	1,00 ± 0,031	0,996 ± 0,026	0,995 ± 0,028	1,016 ± 0,027
Наркологические пациенты	203	***1,153 ± 0,031	**1,117 ± 0,031	***1,147 ± 0,027	***1,135 ± 0,032	**1,123 ± 0,028

Примечание. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с группой здоровых лиц

ребляющие ПАВ без развития зависимости), 2-я группа — пациенты с развившейся зависимостью от наркотических веществ. Между этими группами пациентов были выявлены существенные различия в содержании аутоантител ко всем исследуемым нейромедиаторам (рис. 2).

Пациенты с развившейся зависимостью от ПАВ характеризовались высоким содержанием в сыворотках крови аутоантител к дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК. В то же время уровень аутоантител к нейромедиаторам в сыворотках крови пациентов, злоупотреблявших наркотическими веществами без развития зависимости, практически не отличался от их уровня в группе контроля. Исключение составляли только антитела к глутамату, содержание которых было ниже, чем в контроле. Следующим этапом исследования было изучения содержания аутоантител к нейромедиаторам у пациентов с опишной наркоманией, у которых можно было выделить состояние острой абстиненции, постабстинентных расстройств и состояние ремиссии. Состояние острой абстиненции характеризовалось отменой наркотических веществ в течение нескольких суток, состояние постабстинентных расстройств развивалось после нескольких недель отмены ПАВ и состояние ремиссии характеризовалось уменьшением психопатологической симптоматики. Результаты исследования приведены в табл. 2. Как видно из таблицы, пациенты с опишной наркоманией в период острой абстиненции и постабстинентных расстройств, не получавших наркотики в течение от суток до нескольких недель, характеризуются увеличением содержания аутоантител ко всем исследуемым нейромедиаторам. Повышенное содержание аутоантител к дофамину, норадреналину и серотонину по сравнению со здоровыми лицами сохранялось и в период ремиссии. Вместе с тем в период ремиссии содержание аутоантител к глутамату и ГАМК в сыворотке крови больных наркоманией бы-

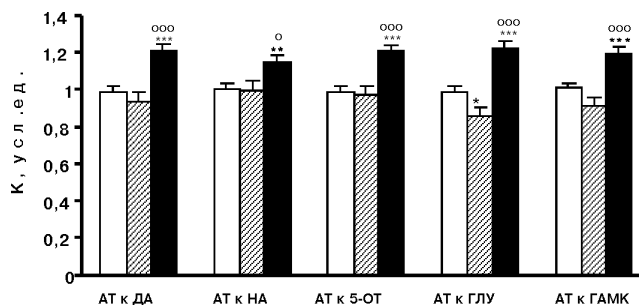


Рис. 2. Аутоантитела к нейромедиаторам в сыворотке крови здоровых лиц и наркотических пациентов.

По оси ординат содержание антител, усл.ед.; белые столбики — контроль, столбики с косой штриховкой — группа пациентов, злоупотреблявших ПАВ без развития зависимости, черные столбики — группа пациентов с развившейся зависимостью от ПАВ; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ по сравнению с группой здоровых лиц; $o < 0,05$, $ooo < 0,001$ по сравнению с группой пациентов, злоупотребляющих ПАВ без развития зависимости.

ло существенно ниже, чем в предыдущих двух группах, и статистически значимо не отличалось от группы контроля.

Среди обследованных пациентов были лица, употребляющие каннабиноиды, летучие вещества, а также несколько ПАВ вместе. Было проанализировано содержание аутоантител к нейромедиаторам в зависимости от употребляемого наркотического вещества. Как видно из табл. 3, в сыворотках пациентов, злоупотребляющих опиатами, были выявлены наиболее высокие уровни аутоантител к дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК по сравнению с контрольной группой здоровых лиц и с пациентами, употреблявшими другие психоактивные вещества (каннабиноиды, летучие вещества, сочетание нескольких средств). Следует отметить существенно более низкое содержание аутоантител к глутамату и ГАМК в сыворотках крови пациентов, страдающих зависимостью от каннабиноидов.

Таблица 2

Содержание аутоантител к нейромедиаторам в сыворотке крови пациентов опишной наркоманией в зависимости от стадии заболевания ($M \pm m$)

Группа обследованных	Кол-во обследованных	Уровень аутоантител к нейромедиаторам К, усл.ед.				
		ДА	НА	5-ОТ	ГЛУ	ГАМК
Здоровые лица (контроль)	148	0,994 ± 0,028	1,00 ± 0,031	0,996 ± 0,026	0,995 ± 0,028	1,016 ± 0,027
Пациенты с острой абстиненцией	17	*1,197 ± 0,075	1,251 ± 0,099	*** 1,313 ± 0,065	**+1,168 ± 0,073	*1,192 ± 0,092
Пациенты в постабстинентный период	98	***1,292 ± 0,048	***1,231 ± 0,047	***1,280 ± 0,041	***1,406 ± 0,045	***1,335 ± 0,046
Пациенты в стадии ремиссии	14	***1,229 ± 0,188	1,179 ± 0,214	** 1,281 ± 0,144	+1,125 ± 0,101	+1,063 ± 0,090

Примечание. ** $p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с группой здоровых лиц, + $p < 0,05$ по сравнению с группой больных в стадии подострой абстиненции

Таблица 3

Аутоантитела к нейромедиаторам и вид употребляемого ПАВ (M ± m)

Группы	Число обследованных лиц	Содержание аутоАТ к нейромедиаторам (К, усл.ед.)				
		ДА	НА	5-ОТ	ГЛУ	ГАМК
Здоровые лица (контроль)	148	0,994 ± 0,028	1,00 ± 0,031	0,996 ± 0,026	0,995 ± 0,028	1,016 ± 0,027
Пациенты, употребляющие опиаты	137	***1,234 ± 0,039	***1,190 ± 0,042	***1,238 ± 0,035	***1,253 ± 0,038	***1,215 ± 0,038
Пациенты, употребляющие каннабиноиды	27	0,900 ± 0,051	0,921 ± 0,048	0,921 ± 0,057	**0,804 ± 0,053	**0,858 ± 0,043
Пациенты, употребляющие летучие вещества	5	0,864 ± 0,117	0,836 ± 0,086	1,00 ± 0,097	1,300 ± 0,399	0,972 ± 0,119
Пациенты, употребляющие ПАВ сочетанно	34	0,998 ± 0,045	0,962 ± 0,045	0,976 ± 0,048	0,891 ± 0,063	0,999 ± 0,057

Примечание. ** p<0,01; *** p<0,001 по сравнению с группой здоровых лиц

Таким образом, усиленная продукция аутоантител к нейромедиаторам при формировании зависимости от психоактивных веществ свидетельствует о вовлеченности иммунной системы в механизмы аддиктивных расстройств и о дисрегуляции нейроиммунных взаимодействий при данной форме патологии. В результате проведенного исследования установлено, что уровень антител к нейромедиаторам (дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату, ГАМК) может отражать изменения в нейротрансмиттерных системах головного мозга, происходящие при развитии зависимости от ПАВ и выявлять особенности действия различных наркотических веществ. Наиболее существенное усиление продукции аутоантител к нейромедиаторам наблюдалось у пациентов с опиоидной наркоманией, что подтверждает ранее полученные данные [14, 15]. Пациенты, злоупотреблявшие психоактивными веществами без развития зависимости, но с вредными последствиями для здоровья, характеризовались низким уровнем аутоантител к нейромедиаторам. При этом следует особо отметить более выраженное снижение уровня аутоантител к глутамату в этой группе пациентов. Ранее нами было показано, что лица, эпизодически употреблявшие наркотические вещества и относящиеся к группе риска по формированию зависимости от ПАВ, имеют низкий уровень аутоантител к дофамину, норадреналину, серотонину и глутамату [12, 14]. По всей вероятности, низкий уровень аутоантител к нейромедиаторам у лиц, злоупотребляющих ПАВ без развития зависимости, является дифференциально-диагностическим маркером данного этапа, на котором в мезолимбических структурах головного мозга еще нет резкого повышения нейромедиаторов. Результаты также не противоречат предположению, что аутоантитела к нейромедиаторам отражают тяжесть зависимости и степень ее прогрессивности, сопряжены с риском формирования псевдоабстинентного синдрома и срыва ремиссии.

Полученные данные свидетельствуют, что аутоантитела к нейромедиаторам, особенно к дофамину, норадреналину, глутамату могут рассматриваться в качестве нейроиммунных маркеров стадийного развития аддиктивных состояний и должны быть включены как обязательные лабораторные показатели при разработке технологии персонализированной профилактики болезней зависимости.

References

1. Anokhina I.P. The main biological mechanisms psychoactive substances dependence. *Voprosi narcologii*. 2013; 6:40-59. (in Russian)
2. Koob GF. The neurobiology of addiction: a neuroadaptive view relevant for diagnosis. *Addiction*. 2006;101:23-30.
3. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:217-38.
4. Schoffelmeer A., Wardeh G., Vanderschuren L. Morphine acutely and persistently attenuates nonvesicular GABA release in rat nucleus accumbens. *Synapse*. 2001; 42: 87-94.
5. Muller CP, Homberg J. The role of serotonin in drug use and addiction. *Behav Brain Res*. 2015; 277: 46-92.
6. Schmidt HD, Pierce RC. Cocaine-induced neuroadaptations in glutamate transmission: potential therapeutic targets for craving and addiction. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1187:35-75.
7. Peters J, De Vries TJ. Glutamate mechanisms underlying opiate memories. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(9):a012088. doi: 10.1101/cshperspect.a012088.
8. Guo M, Hu J., Yang N., Wu C., Pei G. Morphine modulates glutamate release in the hippocampal CA1 area in mice. *Neurosci. Lett*. 2005; 381 (1-2):12-5.
9. Noda Y., Nabeshima T. Opiate physical dependence and N-methyl-D-aspartate receptors. *Eur.J.Pharmacol*. 2004; 500 (1-3):121-8.
10. Xia Li, Jie Li, Gardner E., Xi Z. Activation of mGluR7s inhibits cocaine-induced reinstatement of drug seeking behavior by a nucleus accumbens glutamate-mGluR2/3 mechanism in rats. *J. Neurochem*. 2010;114(5):1368-80.
11. Marques J., Campos-Sandoval JA, Penalver A. Matos JM, Segura JA, Blanco E et al. Glutamate and Brain Glu-

taminases in drug addiction. Neurochem.Res. 2016 Dec. 23. DOI: 10.1007/s11064-016-2137-0.

12. Davydova TV, Vetrile LA, Nevidimova TI, Vetlugina TP, Fomina VG et al. Ratio of antibodies to neurotransmitters in the serum of students, occasional drug users Bull Exp Biol Med. 2014;157(3):333-5

13. Evseev V.A. Antibodies to neuromediators in mechanisms of neuroimmunopathology Moscow, RAMS 2007: 144.

14. Davydova TV, Vetrile LA, Vetlugina TP, Nevidimova TI, Bokhan NA et al. Antibodies to neurotransmitters as possible neuroimmune risk markers of formation dependence to psychoactive substances Patol Fiziol Eksp Ter. 2013; (2):13-6. (in Russian)

15. Vetrile LA, Fomina VG, Nevidimova TI, Vetlugina TP, Batukhtina EI et al. Autoantibodies to glutamate and GABA in opiate addiction Patol Fiziol Eksp Ter. 2015;(3):38-43. (in Russian)

Сведения об авторах:

Ветрилэ Лучия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»;

Невидимова Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН;

Мастерова Елена Ивановна, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. отделения аддиктивных состояний НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН;

Бохан Николай Александрович, акад. РАН, доктор мед. наук, проф., засл. деятель науки РФ, директор НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН, руководитель отделения аддиктивных состояний;

Захарова Ирина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»;

Савочкина Дарья Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН;

Фомина Валентина Гавриловна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

© Коллектив авторов, 2017

УДК 616-092.6:612.017.1: 577.175.534:364.272

Ветлугина Т.П., Матафонова Е.В., Бохан Н.А., Никитина В.Б., Мандель А.И., Лобачева О.А.

Параметры иммунитета и уровень кортизола у больных опишной наркоманией при синдроме отмены

Научно-исследовательский институт психического здоровья, «Томский национальный исследовательский медицинский центр» Российской академии наук, 634014, г. Томск, Россия, ул. Алеутская, д. 4

Цель исследования: изучение динамики показателей иммунитета и уровня кортизола у больных опишной наркоманией в процессе терапии синдрома отмены. **Методика.** В исследование включено 136 больных опишной наркоманией (инъекции экстракта опия) с сформировавшейся физической зависимостью. Пациенты получали в стационаре стандартную терапию с полной отменой наркотика. Исследование проводилось на следующих этапах: при поступлении в стационар (опишный абстинентный синдром — ОАС); на 5—7-е сут. терапии (переход в постабстинентное состояние — ПАС); на 25—28-е сут. лечения (становление терапевтической ремиссии — СТР). Лабораторные методы включали определение количества лимфоцитов с рецепторами CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, с рецепторами к дофамину (D-RFC); содержание иммуноглобулинов М, G, А, уровня кортизола и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови. **Результаты.** Основной иммуноэндокринный паттерн на всех этапах терапии синдрома отмены характеризуется дефицитом субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺; увеличением числа лимфоцитов с рецепторами к дофамину (D-RFC); активацией гуморальных факторов иммунитета (IgM, IgG, ЦИК); высокой концентрацией кортизола. На этапе ОАС и ПАС эти изменения были наиболее выражены; на 25—28-е сут. лечения отмечена позитивная динамика Т-лимфоцитов CD3⁺ и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺); хелперы/индукторы CD4⁺ оставались устойчиво сниженными; D-RFC лимфоциты, параметры гуморального иммунитета и концентрация кортизола — повышенными. Длительный срок наркотизации при употреблении высоких доз наркотика связан с большей выраженностью нарушений. **Заключение.** Установленная дизрегуляция параметров иммуноэндокринной системы у больных опишной наркоманией на всех этапах терапии синдрома отмены в наблюдаемые сроки (25—28 сут.) свидетельствует о неустойчивости достигнутой терапевтической ремиссии и необходимости проведения дальнейших реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: опишная наркомания, синдром отмены, система иммунитета, кортизол.

Для цитирования: Ветлугина Т.П., Матафонова Е.В., Бохан Н.А., Никитина В.Б., Мандель А.И., Лобачева О.А. Параметры иммунитета и уровень кортизола у больных опишной наркоманией при синдроме отмены. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 38—45. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.38-45

Для корреспонденции: Ветлугина Тамара Парфеновна, доктор биол. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, e-mail: vetlug@mail.tomsknet.ru

Финансирование. Исследование не имело финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи частично были опубликованы в журнале «Наркология», 2010, № 12.

Благодарность. Авторы благодарят Матафонова Антона — научного сотрудника департамента патологии, микробиологии и иммунологии Вандербильтского университета США (Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA), аспиранта факультета биотехнологии и органической химии политехнического университета (Томск, РФ) за техническую поддержку.

Поступила 11.10.2016

Vetlugina T.P., Matafonova E.V., Bokhan N.A., Nikitina V.B., Mandel A.I., Lobacheva O.A.

Immune parameters and level of cortisol in patients with opiate addiction during withdrawal syndrome

Mental Health Research Institute, Tomsk NRMС, 4, Aleutskaya, Tomsk, 634014, Russia

The purpose: investigate changes in immunity parameters and cortisol level in subjects with opiate addiction during the treatment of opiate withdrawal syndrome. **Methods.** The study enrolled 136 subjects with opiate addiction with physical dependence receiving injections of opium extract. Patients received conventional therapy with complete opiate withdrawal. The study was performed at the following stages: at admission to the hospital (acute withdrawal syndrome (AWS)); on days 5—7 of therapy (transition into post-withdrawal state — PWS); on days 25—28 of therapy (formation of therapeutic re-

mission — FTR). Laboratory methods included determination count of lymphocytes with receptors CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, with receptors to dopamine (D-RFC); the serum levels of IgM, IgG, IgA, cortisol, circulating immune complexes (CIC). **Results.** The principal immunoendocrine pattern for all stages of withdrawal syndrome therapy is characterized in comparison to the reference normal values quantitative deficit of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-lymphocyte subpopulations, increased count of lymphocytes with receptors to dopamine, activation of humoral immunity factors (IgM, IgG, CIC), high cortisol level. At AWS and PAS stages such changes are most pronounced; on days 25—28 of therapy positive changes in cytotoxic T-lymphocytes (CD8⁺) and T-lymphocytes CD3⁺ was revealed. CD4⁺ count remained steadily reduced, count of lymphocytes with receptors to dopamine and cortisol level were elevated. Clinical and immunological analysis demonstrated that consumption of high opiate doses, long-term narcotization are associated with higher intensity of disorders detected. **Conclusion.** Dysregulation of immunoendocrine parameters was revealed in subjects with opiate addiction at all stages of withdrawal syndrome therapy within the term observed evidencing instability of therapeutic remission achieved and necessity in further rehabilitation events.

Keywords: opiate addiction, opioids withdrawal, immune system, cortisol.

For citation: Vetlugina T.P., Matafonova E.V., Bokhan N.A., Nikitina V.B., Mandel A.I., Lobacheva O.A., Immune parameters and level of cortisol in patients with opiate addiction during withdrawal syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 38—45. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.38-45

For correspondence: Tamara P. Vetlugina, professor, Doctor of Biological Sciences, профессор, Заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник Laboratory of clinical psychoneuroimmunology and neurobiology Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC; 4, Aleutskaya Street, Tomsk, 634014, Russian Federation, e-mail: vetlug@mail.tomsknet.ru

Conflict of interest. The authors report no conflicts of interest. Materials of this article were partially published in the journal «Narcology» (Russian Federation), 2010, Issue no. 12

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Tamara P. Vetlugina orcid.org/0000-0003-2068-0931

Nikolai Bokhan orcid.org/0000-0002-1052-855X

Valentina B. Nikitina orcid.org/0000-0002-1644-770X

Anna Mandel orcid.org/0000-0002-6020-6604

Olga A. Lobacheva orcid.org/0000-0002-7477-6296

Received 11.10.2016

Введение

Проблема наркомании остается одной из актуальных в связи с неуклонным ростом заболеваемости, снижением возраста потребителей психоактивных веществ, тяжестью медицинских и социальных последствий [1, 2]. Психоактивные вещества, в частности опиоиды (опиаты), приводят к дисрегуляции нейромедиаторных систем мозга с повышением уровня дофамина, активируют в лимбико-диэнцефальной системе мозга регионы «вознаграждения», изменяют регуляцию эмоциональных, мотивационных процессов и вызывают развитие синдрома зависимости [3—6].

Опиоиды влияют на модуляцию иммунной системы, поскольку опиоидные рецепторы экспрессируются в нервных и иммунных клетках. Эти рецепторы участвуют в регуляции оси мозг—иммунная система, инициируя сложный ряд сигнальных событий при действии наркотиков и оказывая психонейроиммунотенулирующий эффект [7—9]. Употребление опиоидов или других наркотиков связано с существенным

воздействием, в основном — иммуносупрессирующим, на адаптивный и врожденный иммунитет, которое выражается в нарушении функции антигенпрезентирующих клеток и фагоцитарной функции, модуляции активности НК клеток, изменении активности лимфоцитов и их количества, изменении иммунного ответа Th1 и Th2, нарушении баланса цитокинов [10—13].

В эксперименте при изучении влияния на иммунитет резкой отмены морфина, а также использование блокаторов опиоидных рецепторов, таких, как налоксон, установлен иммуносупрессирующий эффект отмены [14]. Вместе с тем, остаются практически не освещенными в литературе изменения нейроиммуноэндокринных показателей на разных этапах синдрома отмены опиоидов, что имеет существенное значение для оценки состояния гомеостаза и качества терапевтической ремиссии.

Цель исследования — изучение динамики параметров иммунитета и кортизола у больных опиоидной наркоманией в процессе терапии синдрома отмены.

Методика

Обследовано 136 больных наркоманией в возрасте в возрасте от 15 до 35 лет с сформировавшейся физической зависимостью. Больные принимали инъекции экстракта опия, получаемого при обработке опия-сырца различными органическими растворителями; одна торговая доза препарата содержала около 0,02 г хлорида морфина. Критерии включения в группу обследования: верифицированный диагноз опийной наркомании в соответствии с МКБ-10 «Психические и поведенческие расстройства в результате употребления опиоидов, синдром зависимости (F11.21) и синдром отмены (F11.30); добровольное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие эндогенных заболеваний, эпилепсии, декомпенсированных форм психопатий; наличие заболеваний, передающихся половым путем (ВИЧ-инфекции, сифилиса), отказ больного от участия в исследовании. Всего было обследовано 136 больных опийной наркоманией. Половозрастная характеристика клинического материала приведена в табл. 1.

Пациенты в стационаре получали стандартную терапию с полной отменой наркотика: детоксикационная терапия в течение 5—7 сут., которая направлена на достижение безопасной и гуманной отмены наркотического средства; затем после купирования острых проявлений синдрома отмены на этапе постабстинентных расстройств — дифференцированное назначение по принципу «минимальной достаточности» основных групп препаратов для коррекции аффективных, диссомнических, нейровегетативных расстройств [15].

Исследования проводились: при поступлении больных в стационар в период острых проявлений синдрома отмены наркотика (58 чел.); на 5—7-е сут. интенсивной терапии абстинентного синдрома (ОАС, 78 чел.); на 25—28-е сут. пребывания больного в стационаре (69 чел.). 1-й этап обозначен нами как острый и соответствует периоду острых проявлений опийного абстинентного синдрома (ОАС), 2-й — снятие острых проявлений ОАС и переход в постабстинентное состояние (ПАС), 3-й — как становление терапевтической ремиссии (СТР). 2-ю и 3-ю группы составили одни и те же пациенты, часть из которых к концу исследования выбыла самостоятельно или по решению лечащего врача.

Лабораторные методы включали определение количества периферических лимфоцитов CD3⁺ (зрелые Т-лимфоциты), CD4⁺ (Т-хелперы/индукторы), CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD16⁺ (натуральные киллеры) иммунофлюоресцентным методом с использованием моноклональных антител фирмы «Сорбент» (Москва, Россия); количество дофаминпозитивных лимфоцитов (D-RFC) определяли методом, основанным на способности лимфоцитов, имеющих рецепторы к дофамину, присоединять эритроциты барана, которые были предварительно обработаны глутаровым альдегидом и нагружены дофамином; оценивали процент лимфоцитов, присоединивших 3 и более эритроцита [16]; концентрацию сывороточных иммуноглобулинов М, G, А определяли методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле [17] с использованием стандартных наборов производства «Микроген» (Нижний Новгород, Россия); уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом селективной преципитации с использованием полиэтиленгликоля-6000 [18] и выражали в условных единицах (ус. ед.) по величине оптической плотности преципитата, умноженной на 1000. Концентрацию кортизола определяли методом иммуоферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных наборов реагентов фирмы «Алкор Био» (Санкт-Петербург, Россия). Контролем служили данные 106 здоровых людей, проживающих в регионе Западной Сибири (региональные иммунологические нормы).

При проведении исследования были соблюдены принципы информированного согласия Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета программ STATISTICA для Windows, версия 12.0. Описательная статистика представлена средним арифметическим значением М, стандартной ошибкой среднего m, стандартным отклонением σ, 95% доверительным интервалом, медианой Me и межквартильным интервалом (LQ — нижний квартиль, UQ — верхний квартиль). Статистическая значимость различий при сравнении независимых выборок количественных признаков была оценена с использованием непараметрического U-критерия Манна—Уитни, для проверки различий между двумя выборками парных измерений использовали W-критерий Вилкоксона.

Таблица 1

Характеристика больных опийной наркоманией по полу и возрасту

Мужчины		Женщины		Все пациенты	
Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
107	79	29	21	136	100
Возраст на момент исследования (M ± σ)					
23,18 ± 4,35		21,82 ± 3,34		22,88 ± 4,16	

Результаты и обсуждение

Клиническая картина опиной наркомании характеризовалась наличием стойкого патологического влечения к наркотику, ростом толерантности, различными соматическими осложнениями в результате длительного токсического действия наркотика. Основные клинические показатели общей группы обследованных больных приведены в табл. 2.

Ведущими в структуре ОАС являлись алгический симптомокомплекс, аффективные нарушения (дисфорические, тревожно-депрессивные), диссомнические, нейровегетативные расстройства. При постабстинентном состоянии (ПАС) ведущими симптомокомплекс-

сами выступали астенические, аффективные и диссомнические расстройства как проявления патологического влечения к наркотику; гастроинтестинальные расстройства были слабо выражены у большинства больных. На этапе становления терапевтической ремиссии (СТР) аффективные расстройства отмечались в единичных случаях и были представлены тревожно-ипохондрической, резидуальной астенодепрессивной симптоматикой с пониженным настроением и ощущением психического дискомфорта.

При лабораторном исследовании пациентов в состоянии острого абстинентного синдрома установлены статистически значимые по сравнению с контролем

Таблица 2

Клиническая характеристика обследованных больных ($M \pm \sigma$)

Показатели	Больные (n = 136)
Средний возраст начала употребления опиоидов	17,57 ± 2,88 (от 12 до 27 лет)
Длительность употребления опиоидов на момент исследования	5,06 ± 2,69 (от 1 года до 14 лет)
Максимальная толерантность	17,64 ± 9,45 (от 2 до 40 торговых доз)
Продолжительность абстинентного синдрома	5,94 ± 0,90 (от 4 до 9 дней)
Длительность постабстинентного состояния	13,56 ± 6,80 (от 7 до 35 дней)

Таблица 3

Иммуноэндокринная характеристика больных опиной наркоманией на этапах синдрома отмены. Медиана (LQ-UQ)

Параметры	Контроль (n = 106)	Больные наркоманией		
		Этапы синдрома отмены		
		Опийный абстинентный синдром (ОАС), n = 58	Постабстинентное состояние (ПАС), n = 78	Становление терапевтической ремиссии (СТР), n = 69
Лейкоциты, $10^9/л$	5,50 (4,70–6,80)	7,30 (5,90–9,00) p = 0,000000	7,00 (5,80–8,80) p = 0,000004	7,70 (6,30–8,90) p = 0,000080
CD3 ⁺ , %	67,00 (60,00–74,00)	60,00 (47,00–70,00) p = 0,000662	61,00 (54,00–68,00) p = 0,000214	63,50 (53,50–72,50) p = 0,032109
CD4 ⁺ , %	40,00 (35,00–44,00)	28,00 (26,00–32,00) p = 0,000000	31,00 (28,00–34,00) p = 0,000000	32,00 (30,00–35,00) p = 0,000000
CD8 ⁺ , %	24,00 (22,00–28,00)	14,00 (8,00–18,00) p = 0,000000	21,00 (18,00–24,00) p = 0,000007	24,00 (19,00–26,50)
CD16 ⁺ , %	10,00 (8,00–12,00)	14,00 (7,00–18,00) p = 0,033702	7,00 (5,00–11,00) p = 0,000000	9,00 (6,00–14,00)
Ig M, г/л	1,52 (1,12–2,02)	2,36 (1,94–3,10) p = 0,000000	2,43 (1,80–3,12) p = 0,000001	2,40 (1,38–3,46) p = 0,000543
Ig G, г/л	14,48 (12,08–16,92)	17,64 (14,92–21,20) p = 0,000006	16,68 (13,02–19,92) p = 0,000191	17,48 (14,72–21,84) p = 0,000022
Ig A, г/л	2,20 (1,58–3,04)	2,14 (1,86–2,76)	2,18 (1,53–2,89)	2,06 (1,56–2,80)
ЦИК, ус. ед.	80,00 (54,00–108,00)	268,00 (191,00–345) p = 0,000000	210,00 (120,00–275,00) p = 0,000000	151,00 (106,50–222,50) p = 0,000000
D–RFC, %	2,00 (2,00–4,00), n = 27	—	6,00 (4,00–7,00) p = 0,000001	5,00 (4,00–6,00) p = 0,000086
Кортизол, нмоль/л	342,30 (175,00–418,00)	—	579,00 (465,00–661) p = 0,000005	549,00 (429,00–687,00) p = 0,000034

Примечание. p — достоверность уровня различий по отношению к контролю.

отклонения исследуемых показателей (табл. 3): обеднение пула иммунокомпетентных клеток CD3⁺-лимфоцитами; хелперами/индукторами CD4⁺, цитотоксическими Т-лимфоцитами CD8⁺; увеличения количества натуральных киллеров CD16⁺. У пациентов были активированы факторы гуморального иммунитета с повышением концентрации сывороточных иммуноглобулинов IgM и IgG, уровня циркулирующих иммунных комплексов. У некоторых больных уровень ЦИК превышал контрольные значения в 3—4 раза.

После купирования ОАС на этапе перехода в постабстинентное состояние (ПАС) на фоне выраженных аффективных и диссомнических расстройств основной характер иммунных нарушений сохраняется. Отмечается статистически значимое снижение популяции натуральных киллеров CD16⁺-фенотипа (7,00 (5,00—11,00)%) по отношению как к контролю 10,00 (8,00—12,00)%, $p = 0,000000$, так и к группе пациентов в ОАС (14,00 (7,00—18,00)%, $p = 0,000073$).

Исследования, проведенные на 25—28-е сут. лечения пациентов на этапе формирования терапевтической ремиссии (СТР), показали, что профиль биологических параметров практически не изменяется; можно отметить повышение до уровня контроля количества цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺, NK-клеток и положительную динамику общей популяции Т-лимфоцитов CD3⁺-фенотипа (табл. 3). При этом у пациентов на этапе ПАС и СТР выявлено повышение в 2—3 раза по сравнению с контролем количества лимфоцитов, имеющих рецепторы к дофамину (D-RFC).

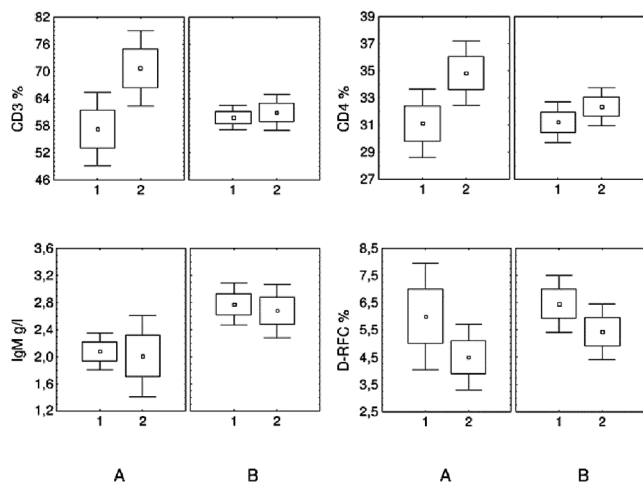


Рис. 1. Зависимость исследуемых показателей от длительности потребления наркотика: 1 — постабстинентное состояние (ПАС); 2 — становление терапевтической ремиссии (СТР); А — длительность потребления наркотика до 3 лет ($2,01 \pm 0,77$); В — длительность потребления наркотика 4 года и более ($6,32 \pm 2,13$).

На исследованных этапах синдрома отмены концентрация кортизола в сыворотке крови пациентов была также значимо повышена по отношению к контролю (табл. 3).

Следующей задачей исследования был анализ клинко-иммунологических взаимосвязей. Анализировались данные, полученные в динамике для одних и тех же пациентов при постабстинентном состоянии (ПАС) и при становлении терапевтической ремиссии (СТР). Учитывались такие клинические характеристики, как длительность наркотизации и толерантность в торговых дозах.

При изучении зависимости динамики исследуемых показателей в процессе терапии от стажа приема наркотика больные были разделены на две группы: 1-я группа А — с длительностью приема наркотика до 3 лет ($2,01 \pm 0,77$), 2-я группа В — с длительностью приема наркотика 4 года и более ($6,32 \pm 2,13$). На рис. 1 представлены наиболее характерные клинко-биологические сопряжения.

На этапе ПАС в обеих группах пациентов как с малым, так и длительным стажем потребления наркотика наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов CD3⁺ — 58,00 (38,00—63,00) и 61,00 (51,00—69,00)%; $p = 0,009817$ и $p = 0,011118$ по отношению к контролю 67,00 (60,00—74,00)% и хелперов/индукторов CD4⁺ (32,00 (30,00—36,00) и 31,00 (28,00—36,00)%; $p = 0,000018$ и $p = 0,000000$ по отношению к контролю 40,00 (35,00—44,00)%. После проведенной терапии на этапе становления терапевтической ремиссии происходила нормализация этих показателей в группе с длительностью приема наркотика до 3 лет (рис. 1, А), тогда как в группе с длительным стажем наркотизации данные показатели оставались устойчиво сниженными (рис. 1, В).

Кроме того, на этапе ПАС наблюдалось повышение, по сравнению с контролем, уровня сывороточного IgM, более выраженное в группе больных с длительным стажем приема наркотика: 1,94 (1,82—2,48) и 2,50 (1,80—3,16) г/л, $p = 0,020092$ и $p = 0,000006$ соответственно. Концентрация IgM оставалась высокой на 5—7-е сут. обследования.

В обеих группах пациентов на этапе ПАС выявлено повышение количества периферических лимфоцитов, имеющих рецепторы к дофамину: 5,00 (4,00—7,00)% и 5,00 (4,00—6,00)% (в контроле 2,00 (2,00—4,00)%), $p = 0,000128$ и $p = 0,041541$ соответственно. На этапе СТР количество D-RFC в группе А незначительно снижалось, в группе В у пациентов с длительным стажем потребления наркотика устойчиво сохранялось до конца срока наблюдения (на 25—28-е сут. терапии).

Динамика концентрации кортизола у больных опишной наркоманией с разной длительностью приема наркотика и уровнем толерантности

Группы обследования	Точки обследования			
	ПАС		СТР	
	Кортизол, нмоль/л; медиана (LQ-UQ)	p к контролю	Кортизол, нмоль/л; медиана (LQ-UQ)	p к контролю
Длительность потребления наркотика (M ± σ)				
До 3 лет (2,01 ± 0,77)	428,0 (317,0—613,0)	p = 0,05654	439,0 (394,0—496,0)	p = 0,03242
4 года и более (6,32 ± 2,13)	566,0 (429,0—631,0)	p = 0,00013	572,0 (421,0—687,0)	p = 0,00127
Максимальная толерантность (M ± σ)				
До 10 доз (7,51 ± 2,41)	562,0 (455,0—789,0)	p = 0,00051	489,0 (421,0—595,0)	p = 0,00430
11 доз и более (22,55 ± 7,49)	566,0 (454,5—712,5)	p = 0,00007	586,0 (432,0—691,0)	p = 0,00009

В динамике терапии синдрома отмены у пациентов выявлен высокий уровень кортизола на всех этапах обследования, причем в группе пациентов с длительным стажем наркотизации статистическая значимость различий с контролем была более выраженной (табл. 4).

При анализе взаимосвязей биологических показателей с уровнем толерантности пациенты были разделены на группы с максимальной дозой потребления опиоидов до 10 торговых доз (7,51 ± 2,41) и 11 и более торговых доз (22,55 ± 7,49); наиболее характерные сопряжения представлены на рис. 2.

На этапе ПАС в обеих группах пациентов выявлено снижение общей популяции Т-лимфоцитов CD3⁺ по отношению к контролю: 60,00 (58,00—66,00)% в группе А, 61,00 (57,00—67,00)% в группе В; $p = 0,023988$ и $p = 0,000000$. В этой точке исследования были статистически значимо снижены по сравнению с контролем и показатели хелперов/индукторов CD4⁺ в группе А — 31,00 (30,00—32,00)%, в группе В — 30,00 (28,00—34,00)%. При исследовании в конце наблюдения в динамике терапии на этапе СТР количество CD3⁺- и CD4⁺-лимфоцитов в группе пациентов с толерантностью до 10 торговых доз (рис. 2, А) повышалось, приближаясь к значениям нормы (в контроле 67,00 (60,00—74,00)% и 40,00 (35,00—44,00)% соответственно), тогда как в группе пациентов, потребляющих высокие дозы наркотика (рис. 2, В), количество общей популяции Т-лимфоцитов и хелперов/индукторов оставалось стабильно сниженным.

У пациентов обеих групп на этапе ПАС выявлено повышение пула периферических лимфоцитов с рецепторами к дофамину (D-RFC), число которых в 3 раза превышало уровень контроля (рис. 2, В): в группе А — 5,00 (4,00—5,00)%, в группе В — 6,00 (4,00—7,00)%, в контроле — 2,00 (2,00—4,00)%. После проведенной терапии на этапе формирования терапевтической ремиссии в группе наркологических пациентов с толерантностью по-

требления наркотика выше 11 торговых доз количество лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы к дофамину, оставалось устойчиво повышенными.

Концентрация кортизола у пациентов с разным уровнем толерантности в динамике терапии абстинентного синдрома оставалась высокой до конца срока наблюдения (табл. 2).

Таким образом, проведенное клинико-биологическое исследование больных наркоманией выявило нарушения параметров иммунной и нейроэндокринной систем, которые на разных этапах терапии синдрома отмены имеют свои особенности и закономерности. Иммуномодулирующее действие морфина отмечено многими авторами

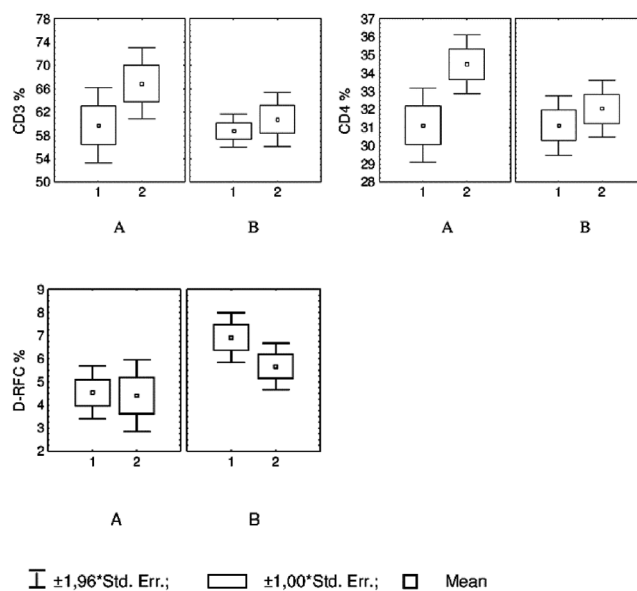


Рис. 2. Зависимость исследуемых показателей от максимальной толерантности: 1 — постабстинентное состояние (ПАС); 2 — становление терапевтической ремиссии (СТР). А — максимальная толерантность до 10 торговых доз (7,51 ± 2,41); В — максимальная толерантность 11 торговых доз и выше (22,55 ± 7,49).

ми. В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что опиоиды оказывают влияние на все основные аспекты адаптивного иммунного ответа, в том числе на презентацию антигена, дифференцировку и рециркуляцию лимфоцитов, соотношение регуляторных Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ [19—21].

Обращает на себя внимание выявленная в исследовании динамика периферических NK-клеток крови. При обследовании пациентов сразу при поступлении в стационар отмечалось повышение количества NK — клеток; в группе пациентов после 5—7 сут. интенсивной терапии количество этих клеток было резко сниженным; при обследовании на 25—28-е сут. лечения их количество приближалось к значениям контроля. В литературе имеются данные о снижении цитотоксической активности естественных киллеров, выделенных из крови пациентов при интратекальном введении морфина при общей анестезии [22]. Напротив, Tabellini G. и соавт. [23] показано, что опиоидная терапия пациентов с хронической болью не оказывает заметного подавления фенотипа и функции периферических NK клеток крови. Возможно, выявленная в нашем исследовании динамика количества периферических NK клеток у наркологических пациентов носит компенсаторный характер.

В проведенном исследовании у пациентов выявлен высокий уровень периферических лимфоцитов, имеющих рецепторы к дофамину, который более чем в 2 раза превышал уровень контроля и сохранялся до конца срока наблюдения (на 25—28-е сут. терапии). Показано [7, 9, 24], что морфин модулирует функцию иммунитета, действуя через μ -опиоидные рецепторы в центральной нервной системе и активацию дофаминовых рецепторов. В экспериментальных исследованиях получены убедительные данные о роли дофаминовой нейромедиации в мезолимбических структурах мозга в развитии болезней зависимости [3]. Изучение дофаминовых и других рецепторов в ЦНС человека имеет очевидные ограничения, и в качестве модели при научных и клинических исследованиях используют лимфоциты периферической крови, что, по мнению многих авторов, отражает состояние гомологичных рецепторов в головном мозге [25, 26].

На всех этапах исследования в динамике терапии пациентов нами выявлен высокий уровень кортизола. Состояние регуляторных систем организма при отмене наркотиков рассматривается как реакция на стресс с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, увеличением концентрации кортикостероидов, также оказывающих иммуносупрессивный эффект [20, 27].

Иммуносупрессирующее действие опиоидов и их отмена снижает защитные функции иммунитета, способствует развитию инфекционных, оппортунистических заболеваний. В литературе имеется большое количество сведений об инфицировании вирусами гепатита людей, употребляющих инъекционные наркотики. Все пациен-

ты в нашем исследовании инъекционно принимали экстрат опия, и у них диагностированы вирусные гепатиты С — в 45% случаев; В+С — в 41%; В — в 13%; В+С+D — в 1% случаев. Употребление наркотиков, хроническая вирусная инфекция сопровождается лейкоцитозом, повышением концентрации IgM, IgG, уровня ЦИК. Поскольку снижение защитных иммунных механизмов является важнейшим звеном патогенеза химической зависимости, одним из путей повышения эффективности лечения больных наркоманией может быть включение в комплекс реабилитационных мероприятий иммуноактивных препаратов [28, 29].

Выявлены клинко-иммунологические взаимосвязи, основные из которых представлены на рис. 1 и 2. У пациентов с давностью потребления наркотика более 4 лет и высокой толерантностью (11 и более торговых доз) отмечены наиболее значимые нарушения нейроиммунно-эндокринных параметров, которые были устойчивы в динамике терапии до конца срока наблюдения. Прямая зависимость выраженности нарушений факторов иммунитета от стажа потребления психоактивных веществ установлена и при других аддикциях [30].

Таким образом, выявлена дисрегуляция параметров иммунной и нейроэндокринной систем у больных опиоидной наркоманией при синдроме отмены. Основной психонейроиммунный паттерн на разных этапах синдрома отмены характеризуется количественным дефицитом субпопуляций Т-лимфоцитов, активацией гуморальных факторов иммунитета, высокой концентрацией кортизола, повышением количества циркулирующих в крови лимфоцитов, имеющих рецепторы к дофамину. Большинство этих нарушений сохраняется до конца срока наблюдения, что наряду с резидуальной астенодепрессивной, тревожно-ипохондрической симптоматикой, ощущением психического дискомфорта у больных свидетельствует о неустойчивости становления терапевтической ремиссии и необходимости проведения дальнейших реабилитационных мероприятий.

References

1. Koshkina E.A., Kirzhanova V.V. The problems of drug and alcohol addiction morbidity in russia and the main strategies for prevention of substance abuse disorders. *Voprosy narkologii*. 2013; 6: 10-26. (in Russian)
2. Bokhan N.A., Ovchinnikov A.A. *Dissociative model of addictions formation*. Saint-Louis: ; 2014: 324 p.
3. Anohina I.P. Biological mechanisms of predisposition to psychoactive substance addiction. *Voprosy narkologii*. 2006; 1: 21-30. (in Russian)
4. Yevseyev V.A., Davydova T.V., Vetrile L.A., Trekova N.A., Fomina V.G. Common neuroimmunological features of drug addiction, alcoholism, epilepsy, and neurogenic pain syndromes. *Vestnik Rossiyskoy AMN*. 2006. 7: 38-43. (in Russian)
5. Peregud D.I., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Neurobiological bases of predisposition to the development of opiate addiction. *Neurochemical Journal*. 2008; 2 (3): 153-6.

6. Volkow N.D., Koob G.F., McLellan A.T. Neurobiological Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(4): 363-71.
7. Cheido M.A., Iдова G.V. The differential contribution of dopamine d1 and d2 receptors to α -opioidergic immunomodulation. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2007; 37(7): 721-4.
8. Zhang L., Belkowski J.S., Briscoe T., Rogers T.J. Regulation of mu opioid receptor expression in developing T cells. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012; 7(4): 835-42.
9. Ninkovic J., Roy S. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids.* 2013; 45(1): 9-24.
10. Gamaleya N.B. Disorders of the immune system with alcohol and drug addiction. In: Ivanets N.N., Anokhina I.P., Vinnikova M.A., eds. *Narcology. National leadership [Narkologija. Nacional'noe rukovodstvo]*. Moscow: «GEOTAR-Media»; 2008: 116-34. (in Russian)
11. Chang M.C., Fan S.Z., Hsiao P.N., Cheng W.F., Sun W.Z. Influence of morphine on host immunity. *Acta Anaesthesiol. Taiwan.* 2011 Sep; 49(3): 105-8.
12. Clark K.H., Wiley C.A., Bradberry C.W. Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotox. Res.* 2013 Feb; 23(2): 174-88.
13. Nevidimova T.I., Batukhtina E.I., Vetlugina T.P., Savochkina D.N., Nikitina V.B., Lobacheva O.A., Bokhan N.A. Association of Cytokine Production with Hormone Level and Sensory Responses during the Formation of Psychoactive Drug Addiction in Men. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2015; 159(6): 774-8.
14. Rahim R.T., Meissler J.J.Jr., Adler M.W., Eisenstein T.K. Splenic macrophages and B cells mediate immunosuppression following abrupt withdrawal from morphine. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78(6): 1185-91.
15. Sivolap Yu.P. Treatment of opioid dependence: Approaches and Perspectives. *Nevrologicheskiy vestnik. Zhurnal im. V.M. Bekhtereva.* 2015; 43(4): 85-91. (in Russian)
16. Yushkov V.V., Petrov V.F., Yushkova T.A. *Psychomotional stress (pathogenesis, intersystem interactions, and pharmacotherapy)*. [Psihoemocional'nyj stress (patogenez, mezhsistemnye vzaimodejstviya, farmakoterapiya)]. Perm; 1996. (in Russian)
17. Mancini G., Vaerman J.P., Carbonara A.O., Heremans J.F. A single radial-diffusion method for the immunological quantitation of proteins. Peters H., eds. *XI Colloquium on Protides of the Biological Fluids*. Amsterdam. Elsevier Publishing Co.; 1964: 370-3.
18. Haskova V., Kaslik I., Riha J., Matl I., Rovensky J. Simple method of circulating immune complex detection in the human sera by polyethylene glycol precipitation. *Z. Immunol. Forsch.* 1978; 154: 399-406.
19. Borner C., Warnick B., Smida M., Hartig R., Lindquist J.A., Schraven B., Holtt V., Kraus J. Mechanisms of opioid-mediated inhibition of human T cell receptor signaling. *J. Immunol.* 2009; 183(2): 882-9.
20. Roy S., Ninkovic J., Banerjee S., Charboneau R.G., Das S., Dutta R., et al. Opioid drug abuse and modulation of immune function: consequences in the susceptibility to opportunistic infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2011; 6(4): 442-65.
21. Sacerdote P., Franchi S., Panerai A.E. Non-analgesic effects of opioids: mechanisms and potential clinical relevance of opioid-induced immunodepression. *Curr. Pharm. Des.* 2012; 18(37): 6034-42.
22. Yokota T., Uehara K., Nomoto Y. Addition of noradrenaline to intrathecal morphine augments the postoperative suppression of natural killer cell activity. *J Anesth.* 2004; 18(3): 190-5.
23. Tabellini G., Borsani E., Benassi M., Patrizi O., Ricotta D., Caimi L. et al. Effects of opioid therapy on human natural killer cells. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 18(1): 169-74.
24. Saurer T.B., James S.G., Lysle D.T. Evidence for the nucleus accumbens as a neural substrate of heroin-induced immune alterations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009; 329(3): 1040-7.
25. Barbanti P., Fabbrini G., Ricci A., Bruno G., Cerbo R., Bronzetti E. et al. Reduced density of dopamine D2-like receptors on peripheral blood lymphocytes in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 2000; 120: 65-75.
26. Kirillova G.P., Hrutkay R.J., Shurin M.R., Shurin G.V., Tourkova I.L., Vanyukov M.M. Dopamine receptors in human lymphocytes: radioligand binding and quantitative RT-PCR assays. *J Neurosci Methods.* 2008; 174(2): 272-80.
27. Nugent A.L., Houghtling R.A., Bayer B.M. Morphine suppresses MHC-II expression on circulating B lymphocytes via activation of the HPA. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2011; 6(1): 130-41.
28. Gamaleya N.B. Immunotherapy at of narcological diseases (part 1). *Voprosy narkologii.* 2011; 5: 79-103. (in Russian)
29. Vetlugina T.P., Nevidimova T.I., Nikitina V.B., Lobacheva O.A., Bokhan N.A., Semke V.Ya. Pathogenetic background of technology of immunocorrection in mental disorders and dependence illnesses. *Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii.* 2013; 1: 7-12.
30. Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V. Humoral immune response to the oxidation of lipoproteins in nicotine addicted patients according to their smoking history. *Patologicheskaya fiziologiya i yeksperimental'naya terapiya.* 2016; 60(): 39-43.

Сведения об авторах:

Никитина В.Б., доктор мед. наук, зав. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии

Мандель А.И., доктор мед. наук, вед. науч. сотр. отделения аддиктивных состояний

Матафонова Е.В., канд. мед. наук, мл. науч. сотр. отделения аддиктивных состояний

Лобачева О.А., доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии

Бохан Н.А., доктор мед. наук, проф., академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.155.18:612.43].001.57-07:612.017.1

Черешнев В.А., Самоделкин Е.И., Косарева П.В., Сивакова Л.В.,
Шилов Е.Ю., Федык О.В., Хоринко В.П.

Морфологические изменения в центральных и периферических органах иммуногенеза при моделировании токсической гемолитической анемии на фоне острого холодогового стресса

ГБУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России,
614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26

Цель исследования — оценка изменений показателей красной крови и морфологии органов иммуногенеза при токсической гемолитической анемии, вызванной введением фенилгидразина, на фоне острого холодогового стресса. **Методика.** В эксперименте использовано 80 нелинейных белых крыс в возрасте 4 мес., разделенных на 4 группы: изолированный стресс, введение ФГ, сочетание введения ФГ и острого стресса, контроль. 2,5% раствор фенилгидразина (ФГ) вводили интраперитонеально в дозе 20 мг/кг. Острый холодогов стресс: температура +4°C, экспозиция — 1,5 ч, через сутки после введения ФГ. До начала эксперимента и по его окончании у животных регистрировали показатели периферической крови. На 10-е сут. животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии, выполняли гистологические и морфометрические исследования органов (тимус, селезенка). **Результаты.** В центральных и периферических органах иммуногенеза животных опытных групп наблюдали сходные изменения, являющиеся проявлениями острого стресса, но выраженные в разной степени. **Заключение.** Установлено, что в условиях эксперимента острый стресс усугубляет проявления приобретенной гемолитической анемии при ее моделировании, что необходимо учитывать при интерпретации результатов экспериментальных исследований.

Ключевые слова: приобретенная токсическая гемолитическая анемия; фенилгидразин; острый холодогов стресс; органы иммуногенеза.

Для цитирования: Черешнев В.А., Самоделкин Е.И., Косарева П.В., Сивакова Л.В., Шилов Е.Ю., Федык О.В., Хоринко В.П. Морфологические изменения в центральных и периферических органах иммуногенеза при моделировании токсической гемолитической анемии на фоне острого холодогового стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 46–51. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.46-51

Для корреспонденции: Самоделкин Евгений Иванович, доктор мед. наук, проф., каф. патологической физиологии; e-mail: sei-p@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.02.2016

Chereshnev V.A., Samodelkin E.I., Kosareva P.V., Sivakova L.V.,
Shilov Yu.I., Fedyk O.V., Khorinko V.P.

Morphologic changes in the central and peripheral organs of immunogenesis in modelling of toxic hemolytic anemia associated with an acute cold stress

SBEI HPT «Perm State University of Medicine named after ac. E.A. Wagner» of the RF Ministry of Health;
614000, Russia, Perm, Petropavlovskaya street, 26

The purpose: To experimentally characterize the changes in the indices of red blood cells, and the morphology of immunogenesis when acquired toxic hemolytic anemia caused by the introduction of phenylhydrazine on the background of acute cold stress. **Methods.** In the experiment we used 80 white non-pedigree rats of 4-month old — 4 groups: isolated stress, phenylhydrazine (PH) infusion, a combination of an acute cold stress and PH infusion, control. 2,5% solution of PH was injected intraperitoneally (i.p.) in the dose of 20 mg/kg. The characteristics of an acute cold stress are the following: the temperature was +4°C, exposition — 1,5 h, in a day after PH infusion. The indices of peripheral blood were registered before and after the experiment. **Results.** On the 10th day the animals were removed from the experiment under ether narcosis with observing all euthanasia rules and the samples of autopsy material for the following histologic examination were taken (spleen, thymus). The central and peripheral organs of immunogenesis of the investigated animals showed similar

changes which were the manifestations of the acute cold stress, but expressed in different degrees. **Conclusion.** It is determined that under experimental conditions an acute cold stress aggravates acquired hemolytic anemia in its modeling that should be taken into account during interpretation of results of experimental investigations.

Keywords: acquired toxic hemolytic anemia; phenylhydrazine; acute cold stress; organs of immunogenesis.

For citation: Chereshev V.A., Samodelkin E.I., Kosareva P.V., Sivakova L.V., Shilov Yu.I., Fedyk O.V., Khorinko V.P Morphologic changes in the central and peripheral organs of immunogenesis in modeling of toxic hemolytic anemia associated with an acute cold stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (3): 46–51. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.46-51

For correspondence: Eugeny I. Samodelkin, Doctor of Medical Sciences, Professor of Department of Pathological Physiology State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Perm State Medical University named after EA Wagner» of Ministry of Health of Russian Federation, 26, ul. Petropaulovskaya, Perm, 614990, Russian Federation, e-mail: sei-p@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kosareva P.V., <https://orcid.org/0000-0002-0853-925X>

Received 10.02.2016

Введение

На сегодняшний день существует множество экспериментальных моделей приобретенной гемолитической анемии (ПГА), различающихся методологическими подходами [1–6]. С одной стороны, это связано с разнообразием факторов, приводящих к развитию ПГА, с другой — с поиском наиболее оптимальной экспериментальной модели. Поскольку остается немало спорных вопросов, касающихся патогенеза и патоморфологии ПГА, ответы на которые могут дать только экспериментальные исследования, разработка новых экспериментальных моделей приобретенных токсических ПГА является актуальной задачей. Кроме того, при моделировании приобретенной токсической гемолитической анемии (ПТГА) не учитывается влияние острого стресса на ее течение. Между тем, в процессе любого эксперимента животное неизбежно подвергается действию стрессоров (иммобилизация, травма, сопровождающая забор крови и пр.). Помимо этого, воздействие на организм токсических веществ само по себе является острым стрессом и способно вызывать значимое подавление иммунитета [7].

Цель исследования — оценка изменений показателей красной крови и морфологии органов иммуногенеза при приобретенной токсической гемолитической анемии, вызванной введением фенилгидразина, на фоне острого холодового стресса.

Методика

В эксперименте использовано 40 нелинейных белых крыс 4-месячного возраста, с массой тела 150–200 г, содержащихся в стандартных условиях

вивария; эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г.

Гемолитическую анемию у экспериментальных животных вызывали однократным интраперитонеальным введением токсического агента с гемолитическим действием — фенилгидразина (ФГ — Phenylhydrazine; $C_6H_5NHNH_2$ — исходный продукт в производстве азокрасителей, лекарственных препаратов (например, антипирина, амидопирина).

ФГ (2,5% раствор ФГ в дозе 20 мг/кг) вводили интраперитонеально однократно под легким эфирным наркозом по оригинальной методике (Патент № 2528976 Российская Федерация МПК G09B 23/28 «Способ моделирования приобретенной токсической гемолитической анемии в эксперименте»). Животных подвергали острому холодовому стрессу однократно: температура $+4^{\circ}C$, экспозиция — 1,5 ч, через сутки после введения ФГ. Сформировано 4 экспериментальных группы по 20 животных в каждой: 1-я группа — интактные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария; 2-я — введение ФГ; 3-я — введение ФГ + острый холодовой стресс; 4-я — изолированный острый холодовой стресс. До начала эксперимента и по его окончании регистрировали с помощью гематологического автоматического анализатора Medikon M20 (Boule Medical A.B., Швеция) показатели периферической крови. На 10-е сут. животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии. Гистологические исследования селезенки и тимуса проведены по стандартным методикам. Морфометрический анализ исследуемых образцов осуществ-

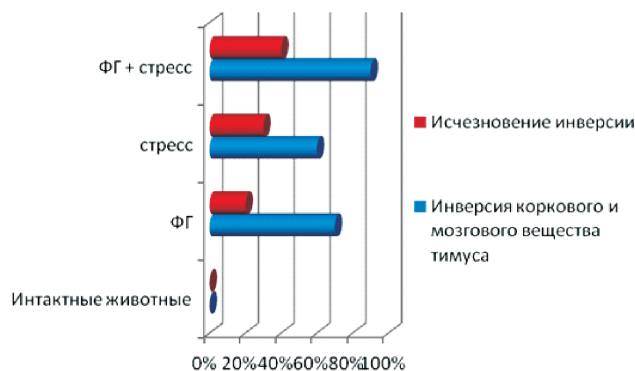


Рис. 1. Изменения в ткани тимуса экспериментальных животных.

ляли при помощи программного обеспечения BioVision, version 4,0 (Австрия), захват изображений — с использованием цифровой камеры для микроскопа CAM V200, Vision (Австрия). Точность и надежность числовых значений обеспечивается использованием адекватного оборудования. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, критериев Манна—Уитни для непарных и Вилкоксона для парных данных; для анализа частоты проявления изменений в группах использовали критерий χ^2 [8]. Критическим уровнем статистической значимости различий считали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Во время проведения эксперимента не отмечено случаев гибели животных. При введении фенилгидразина (как в группе со стрессом, так и при изолированном введении) наблюдалось статистически значимое снижение концентрации гемоглобина и количества эритроцитов и увеличение процента ретикулоцитов

в мазках к концу эксперимента по сравнению с исходными данными (табл. 1).

У всех животных с изолированным введением фенилгидразина к 10-м сут. в ткани тимуса отмечались гемодинамические расстройства, признаки инверсии коркового и мозгового вещества тимуса в отдельных дольках. В 80% имела место гибель лимфоцитов в корковом веществе, в 20% — исчезновение инверсии слоев, гибель лимфоцитов отмечена и в мозговом веществе (рис. 1, 2); $p < 0,05$; критерий χ^2 по сравнению с группой с сочетанием введения ФГ и острым стрессом. Отмечена коллагенизация стромы тимуса, формирование тимусных телец не только в мозговом, но и в корковом веществе (70%).

В селезенке наблюдалось уменьшение объема белой пульпы по сравнению с контрольной группой (табл. 2). В большинстве препаратов (80%) визуализировались лимфоидные узелки с типичной структурой. Гемодинамические нарушения в виде отека стромы селезенки и полнокровия сосудов, включая синусоидные капилляры, отмечались у 100% животных этой группы.

В группе с изолированным холододовым стрессом к 10-м сут. эксперимента в ткани тимуса отмечались, прежде всего, гемодинамические нарушения. Изменения лимфоидной ткани заключались в коллагенизации стромы долек и междольковой соединительной ткани, инверсии коркового и мозгового вещества тимуса (60%), исчезновении и стирании границ между ними, исчезновении инверсии (30%; $p < 0,05$; критерий χ^2 по сравнению с группой сочетание стресса и введения ФГ; рис. 1), визуализации участков гибели лимфоцитов в корковом (60%) и мозговом веществе (30%). У всех животных этой экспериментальной группы отмечалось формирование тимусных телец не только в мозговом, но и в корковом веществе (60%). В селезенке наблюдалось уменьшение объема белой

Таблица 1

Концентрация гемоглобина, количество эритроцитов и ретикулоцитов в периферической крови экспериментальных животных (M ± m)

Экспериментальная группа	Количество эритроцитов в начале эксперимента ($\times 10^9$ в 1 мкл крови)	Количество эритроцитов в конце эксперимента ($\times 10^9$ в 1 мкл крови)	Уровень Hb в начале эксперимента (г/л)	Уровень Hb в конце эксперимента (г/л)	Количество ретикулоцитов в начале эксперимента (%)	Количество ретикулоцитов в конце эксперимента (%)
Контрольные животные, n = 10	6,46 ± 0,57	6,53 ± 1,88	118,4 ± 9,82	122,8 ± 5,57	1,429 ± 0,19	1,787 ± 0,24
Введение ФГ, n = 10	6,34 ± 0,88	4,56 ± 0,15 *а	127 ± 6,71	70,2 ± 5,43 *а	1,557 ± 0,13	5,471 ± 0,58 *а
Острый холододовый стресс, n = 10	6,27 ± 0,98	6,35 ± 0,34	123,4 ± 7,86	127,9 ± 8,32	1,662 ± 0,14	1,994 ± 0,15
Введение ФГ с последующим острым холододовым стрессом, n = 10	6,46 ± 0,97	4,11 ± 1,22 *	130 ± 5,90	77,4 ± 3,95 *	1,351 ± 0,12	4,679 ± 0,40 *

Примечание. * — $p < 0,05$ по отношению к исходным данным по парному критерию Вилкоксона

пульпы, но менее выраженное, чем в группе стресс + введение ФГ (табл. 2, рис. 3). В большинстве препаратов визуализировались лимфоидные узелки с типичной структурой (80%), отмечались гемодинамические нарушения (100%).

У всех животных (100%), подвергнутых введению ФГ и острому стрессу, к 10-м сут. в тимусе выявлялись признаки отека соединительной ткани и полнокровие сосудов, а также инверсия коркового и мозгового вещества — за счет обеднения коркового вещества лимфоцитами; у части животных данной группы (40%) отмечалось исчезновение инверсии в отдельных долях тимуса с истощением не только коркового, но и мозгового вещества тимуса (рис. 1, 4). В селезенке животных этой группы выявлено статистически значимое уменьшение удельного (относительного) объема белой пульпы по сравнению с контрольной группой (табл. 2), у части животных (20%) — гемосидероз красной пульпы. В части лимфоидных узелков выявлялось нарушение типичной организации, выражавшееся в исчезновении светлых центров (80%), отеке стромы и полнокровии сосудов, включая синусоидные капилляры.

Таким образом, у животных, подвергнутых как стрессу, так и введению токсического агента с гемолитическим действием ФГ (что в свою очередь также является разновидностью стрессового фактора), в органах иммунной системы были выявлены изменения, характерные для острого стресса — уменьшение объема лимфоидной ткани в тимусе и селезенке, с той лишь разницей, что морфологические изменения органов иммунитета у животных, подвергнутых только стрессу или получавших только ФГ, были сопоставимы, а в группе с сочетанием введения ФГ и острого стресса они были значительно более выраженными. В условиях эксперимента острый стресс усугубляет проявления модулируемой гемолитической анемии, что необходимо учитывать при интерпретации результатов экспериментальных исследований.

Известно, что на острый стресс организм отвечает триадой симптомов — увеличением коркового вещества надпочечников и повышением его активности, редукцией тимуса и лимфатических узлов, появлением эрозий на слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта («общий адаптационный синдром», по

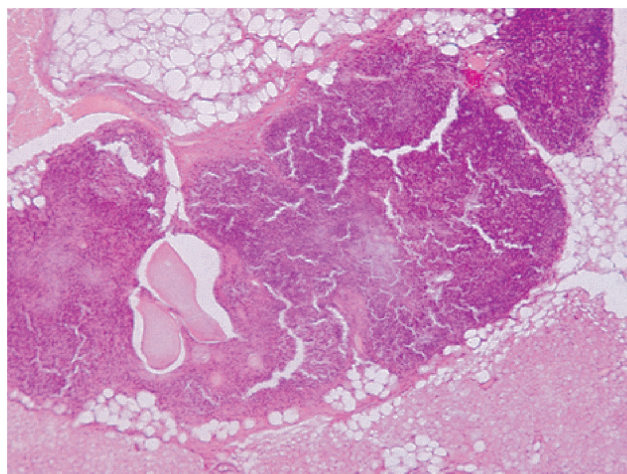


Рис. 2. Тимус животного, подвергнутого введению ФГ — инволюция части долек, отсутствие дифференциации коркового и мозгового вещества вследствие гибели лимфоцитов. Гематоксилин и эозин x 100.

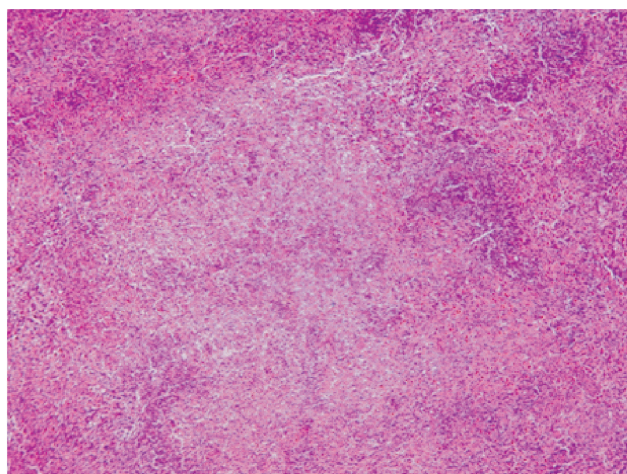


Рис. 3. Селезенка животного с острым стрессом — инволюция белой пульпы, гемосидероз красной пульпы. Гематоксилин и эозин x 100.

Г. Селье), который протекает в три стадии: тревоги, резистентности и истощения [9, 10].

К настоящему времени в реализации стресса неплохо изучены деятельность сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, желудочно-кишечного тракта (кровотечения), но реакция на стресс иммунной системы изучена недостаточно [9]. Однако еще Г. Селье при изучении стресса наряду с увеличением

Удельный объем белой пульпы в селезенке экспериментальных животных (%)

Таблица 2

Удельный объем белой пульпы в селезенке (%)	Контрольные животные, n = 20	Введение ФГ, n = 20	Введение ФГ с последующим острым холодным стрессом, n = 20	Острый холодный стресс, n = 20
	30,18 ± 2,69	24,86 ± 1,33*	18,25 ± 0,93*	22,98 ± 2,45*

Примечание. * p<0,05 по отношению к контролю по критерию Манна—Уитни

массы надпочечников наблюдал уменьшение массы и размеров тимуса [10]. За несколько десятилетий до появления в печати работ Г. Селье немецкий патологоанатом J.A. Нампг описал уменьшение размеров тимуса у детей при инфекциях, обозначив этот феномен как акцидентальную инволюцию тимуса [11]. В дальнейшем было показано многими исследователями, что акцидентальная инволюция тимуса развивается не только при воздействии инфекционного агента, но также при действии на организм самых разных факторов [12—14].

В условиях стресса акцидентальная инволюция тимуса отражает подавление его функции [9, 15]. Обобщение имеющихся к настоящему времени в литературе сведений позволяет представить этот процесс в виде последовательной смены 5 фаз; вместе с тем, процессы гибели и миграции Т-лимфоцитов в разных долях протекают неравномерно, и отсутствие строгого параллелизма изменений в долях отражается в морфологической картине той или иной стадии [9]. Кроме того, характер ответа тимуса на воздействие стрессора зависит от природы стрессора [16, 17].

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что снижение сопротивляемости организма при стрессе связано не столько с повышением в крови уровня глюкокортикоидов, сколько с недостаточностью функциональной активности тимуса, подтверждением чему может служить наличие в периферической крови нейтрофильного лейкоцитоза и лимфоцитопении в стадии тревоги; при этом принято считать, что эти изменения обусловлены перераспределением клеточных элементов между лимфоидными органами, циркулирующей кровью и костным мозгом в ответ на

действие повреждающего фактора [9]. Кроме того, при остром стрессе в стадии тревоги отмечается повышенная пролиферация клеток миелоидного ряда и увеличение количества нейтрофилов в единице объема крови, что связано с поступлением в кровяное русло нейтрофилов из пристеночного пула [18], лимфоцитопения при остром стрессе имеет, как правило, относительный характер [19]. Однако на сегодняшний день имеются данные, свидетельствующие о том, что нейтрофильный лейкоцитоз и лимфоцитопения при остром стрессе могут развиваться и в результате иных причин — в частности, из-за апоптоза кортизолчувствительных лимфоцитов при повышении в крови уровня кортикостероидов, то есть уменьшение в крови лимфоцитов при остром стрессе может быть не только относительным [9]. Вместе с тем, по данным других авторов, лимфопения в лимфоидных органах при стресс-реакции развивается не в результате распада клеток, а за счет уменьшения новообразования и усиленной миграции лимфоцитов из этих органов в костный мозг с образованием «лимфоидного пика» [20]. То есть вопрос этот остается дискуссионным.

Существует две группы факторов, способных вызвать индуцированное стрессом значимое подавление иммунитета: при прямой активации нейроэндокринной оси из-за увеличения продукции гипоталамусом кортикотропин-высвобождающего гормона — к этой группе относится воздействие на организм токсических веществ и эмоционального стресса; при косвенной активации нейроэндокринной оси — при инфекционных болезнях и несбалансированном питании [7, 21]. То есть, развивающиеся при острых отравлениях изменения в иммунной системе расцениваются подобно возникающим в ответ на действие стресса [22].

Таким образом, в тимусе животных, подвергнутых введению сильнодействующего токсического вещества — фенилгидразина — и острому холодовому стрессу, мы наблюдали изменения, типичные для 3-й и 4-й фаз акцидентальной инволюции тимуса, соответствующие стадии тревоги по Селье. Эти изменения были выражены в большей степени у животных, при сочетанном действии стресса и введения ФГ. Выявленный феномен может быть объяснен, с одной стороны, тем, что острое отравление само является разновидностью стресса, усугубляя изменения в органах иммуногенеза. С другой стороны, при остром холодовом стрессе возможно сочетание действия стрессового фактора и температурного, что может усугублять проявления гемолитической анемии за счет действия холодовых антиэритроцитарных антител.

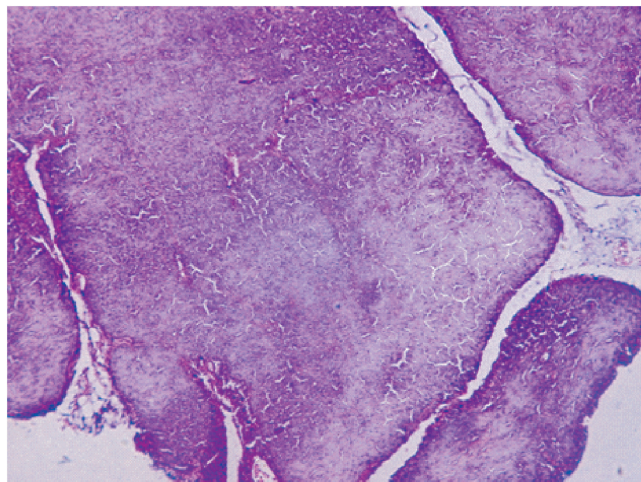


Рис. 4. Тимус животного, подвергнутого введению ФГ и острому стрессу — обширные некрозы коркового и мозгового вещества. Гематоксилин и эозин $\times 100$.

References

1. Menshikov I.V., Beduleva L.V., Ivanov V.V. The role of idiotype-anti-idiotype interactions in the induction of autoreactive lymphocyte clones with experimentally induced autoimmune hemolytic anemia in mice. *Rus. Immun. zhurnal.* 2008; 2 (2-3): 235. (In Russian)
2. Zhernov Y. The study of the antioxidant effect of humic acids peloids when acquired hemolytic anemia. *Kislород I Antioksidantny.* 2009; 1: 73-4. (In Russian)
3. Moiseenko N.A., Ivankova Zh.E., Repina E.N., Volodin V.V. Hemato protective effect of ecdysteroid serpisten substance. *Theoretic. I Prikladnaya Ecologiya.* 2012; 1: 43-8. (In Russian)
4. Sazonova V.V. Peroxidation syndrome in dogs with hemolytic anemia. Proceedings of the conference of the Russian Academy of Natural Sciences «Modern medical technologies (diagnostics, therapy, rehabilitation and prevention).» *Fundamental. Issledov.* 2005; 6: 96. (In Russian)
5. Bazzoni G.B., Bollini A.N., Hernandez G.N. et al. In vivo effect of aluminium upon the physical properties of the erythrocyte membrane. *J. Inorg. Biochem.* 2005; 99 (3): 822-827.
6. E-Ashtavy IM, S. Gad, salad OM Grap Seed Extract prevention azatneprine toksitsity John RATS. *Fototner. RES.* 2010; 24 (11): 1710-1715.
7. Ivankova Zh.E., N.A. Moiseenko, Repina E.N. Effect of 20 hydroxyecdysone on the parameters of red and white blood cells in hemolytic anemia. *Ecolog. Chel. Pril.* 2004; 1: 327-9. (In Russian)
8. Glantz S. Biomedical statistics. M.: Practice 1999; 459.
9. Kiseleva NM, Kuzmenko LG, Nkana Nkosa MM Stress and lymphocytes. *Pediatrics.* 2012; 91(1): 137-43.
10. Selye G. *Studies on adaptation syndrome*: Trans. from English. M.: Medgiz, 1960: 255.
11. Hammar J.A. Histogenesis und Involution der Thymsdruse. *Anat. Anz.* 1905; 27: 23-30, 41-89.
12. Selye G. At the level of the whole organism: lane. from English. M.: Nauka, 1972: 121.
13. Shalaev S., Markov I.I., Chuchkov V.M. The influence of some extreme factors on the morphology of organs of the immune system in the conditions of application of anti-rabies vaccines. *Functional. neuromorphology. Fund. I Priclad. Issled.* Minsk. 2001: 377-80. (In Russian)
14. Muller-Hermelink H. The human thymus. Berlin: Springer Verlag, 1986: 207-69. (In Russian)
15. Pertsov SS Effect of melatonin on the thymus, spleen and adrenal glands in rats with acute stress load. *Bulluten Eksperimentalnoy Biologii Meditsiny.* 2006; 33: 263-6. (in Russian)
16. Fuchs B.A., Pruet S.B. Morphine produces apoptosis in murine thymocytes in vivo but not in vitro. *J. Pharmacol. Expl. Therapeutics.* 1993; 266: 652.
17. Munck A., Guyre P.M., Holbrook N.J. Physiological Functions of glucocorticoids in Stress and their relation to Pharmacological Actions, *Endocrine Reviews.* 1984; 5: 25.
18. Dolgushin II, Bukharin OV. Neutrophils and homeostasis. Ekaterinburg, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, 2001: 9. (in Russian)
19. Verkhoglyadova NM, Kurganova LV, Kachur AY. Interpretation of hematological research. Veterinary hospital «Fauna-service». 2005; 1: 35-40. (In Russian)
20. Ivanova I.K., Lonshakova K.S., Shantanova L.N. Morphological and functional changes of the thymus of rats during immobilization stress and their correction fitosredstv «Tanton». *Bulletin Vost-Sib. Nauch. Tsentra Sib. Otd. Rus. Akad. Med. Nauk.* 2009; 2: 260-1. (In Russian)
21. Hassig A., Wen-Xi L., Stampflil K. Stress-induced suppression of the cellular immune reactions: on the neuro-endocrine control of the immune system. *Med. Hypotheses.* 1995; 46 (6): 551-555.
22. Zabrodskii PF. Changes in non-specific resistance and the immune status of acute poisoning arsenite [*Izmeneniye nespetsificheskoy rezistentnosti organizma i immunnogo statusa pri ostrom otravlenii arsenitami*]. Saratov, 2012; 157. (In Russian)

Сведения об авторах:

Черешнев Валерий Александрович, доктор мед. наук, проф., академик РАН, зав. каф. иммунологии

Косарева Полина Владимировна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. отдела морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ, зав. курсом клинической лабораторной диагностики каф. микробиологии, вирусологии с курсом КЛД, e-mail: sei-p@mail.ru

Сивакова Людмила Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии, ст. преподаватель каф. микробиологии, вирусологии с курсом КЛД

Шилов Юрий Иванович, канд. мед. наук, доцент каф. иммунологии

Федык Оксана Владимировна, аспирант заочной формы обучения каф. иммунологии

Хоринко Виталий Петрович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отдела морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ

© Коллектив авторов, 2017
УДК 615.32: 612.017.1

Хобракова В.Б.^{1,2}, Цыренова Д.З.¹, Оленников Д.Н.¹

Иммунотомулирующая активность форситозидов В при экспериментальной иммуносупрессии

¹ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

² ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет», 670000, г. Улан-Удэ, Россия, ул. Смолина, 24а

Цель исследования — изучение иммуномодулирующего действия фенолпропаноидов (форситозидов В, ForB), выделенного из клубней зопника клубненосного (*Phlomis tuberosa* (L.) Moench) на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии. **Методика.** Эксперименты проведены на 100 мышцах-самцах линии F1 (СВАхС57В1/6) массой 18—20 г. Иммунодефицит моделировали внутрижелудочным введением азатиоприна в дозе 50 мг/кг в течение 5 сут. (контрольная группа). Опытная группа животных получала ForB 1 раз в сутки внутрижелудочно в дозе 1 мг/кг в течение 14 сут. на фоне азатиоприновой иммуносупрессии. Интактная группа мышей получала очищенную воду по аналогичной схеме. Показатели клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ, гуморального звена — по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по A.J. Cunningham (1965). Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента. **Результаты.** Установлено, что курсовое применение форситозидов В способно ослаблять иммуносупрессивное действие цитостатика азатиоприна — индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа возрастал в 1,5 раза, абсолютное и относительное число антителообразующих клеток в 1,3 и 1,9 раза соответственно. **Заключение.** Форситозид В, выделенный из клубней *P. tuberosa* обладает иммуномодулирующим действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии, что обосновывает целесообразность его дальнейшего исследования для создания новых эффективных иммуномодуляторов.

Ключевые слова: форситозид В; *Phlomis tuberosa*; иммуномодулирующая активность; азатиоприн; иммуносупрессия; реакция гиперчувствительности замедленного типа; антителогенез.

Для цитирования: Хобракова В.Б., Цыренова Д.З., Оленников Д.Н. Иммуномодулирующая активность форситозидов В при экспериментальной иммуносупрессии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 52—55. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.52-55

Для корреспонденции: Хобракова Валентина Бимбаевна, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной фармакологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН, e-mail: val0808@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.02.2017

Khobrakova V.B.^{1,2}, Tsyrenova D.Z.¹, Olennikov D.N.¹

Immune modulating activity of forsythoside B at experimental immune suppression

¹ Institute of General and Experimental Biology SB RAS, 6, ul. Sakh'yanovoi, Ulan-Ude, 670047, Russia

² Buryat State University, 24a, ul. Smolina, Ulan-Ude, 670000, Russia

The purpose of the study is to determine the immune modulating activity of phenylpropanoid (forsythoside B, ForB) isolated from the tubers of *Phlomis tuberosa* (L.) Moench (Lamiaceae) on the cellular and humoral immune response at the azathioprine immune suppression. **Methods.** Experiments were carried out on CBA male mice (n = 100, 18—20 g). Immune deficiency was modeled by the intragastrical introduction of azathioprine in the dose 50 mg/kg once a day for 5 days. The experimental group of animals administered ForB once a day intragastrically in dose 1 mg/kg for 14 days against the background of azathioprine immune suppression. The intact group administered the purified water according to the analogous scheme. The activity of the tested compound on the cellular immunity was evaluated in the reaction of delayed-type hypersensitivity (DTH) according to the standard method of local DTH. Condition of the humoral immunity was estimated by the number of antibody-forming cells (AFC) determined by the method of local hemolysis by A.J. Cunningham (1965). Statistical analysis was performed using standard methods of variation statistics using parametric Student's *t*-test. **Results.** It was established that the

administration of the ForB to animals significantly reduced suppressive effect of cytostatic azathioprine on the DTH reaction and antibody response. The use of the tested compound was resulted to the increase of the DTH-index (1.5 times) and the value of absolute and relative numbers of AFC in 1.3 and 1.9 times comparing with the control group. **Conclusion.** The results obtained allow to conclude that the ForB showed the marked immune modulating activity at the azathioprine-induced immune suppression demonstrating its perceptiveness as a new and effective immune modulators.

Keywords: forsythoside B; *Phlomis tuberosa*; immune modulating activity; azathioprine; immune suppression; delayed-type hypersensitivity response; antibody response.

For citation: Khobrakova V.B., Tsyrenova D.Z., Olennikov D.N. Immune modulating activity of forsythoside B at experimental immune suppression. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 52–55. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.52-55

For correspondence: Valentina B. Khobrakova, Doctor of Biological Sciences, Senior staff scientist Federal State Budgetary Institution of Science «Institute of General and Experimental Biology» SB RAS; 6, ul. Sakh'yanovoi, Ulan-Ude, 670047, Russian Federation, e-mail: val0808@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Khobrakova V.B., <http://orcid.org/0000-0002-4689-5706>

Tsyrenova D.Z., <http://orcid.org/0000-0002-3383-5122>

Olennikov D.N., <http://orcid.org/0000-0001-8194-1061>

Received 02.02.2017

Введение

В связи с широким распространением иммунодефицитных состояний поиск веществ с иммуномодулирующими свойствами весьма актуален. Показано, что иммуностропной активностью обладают такие извлечения из лекарственных растений, как полифенольные соединения, полисахариды, эфирные масла, сапонины, витамины, различные макро- и микроэлементы [1–4]. Данные ряда работ свидетельствуют об иммуномодулирующих свойствах растительных фенолпропаноидов различных классов [5–10]. В качестве источника фенолпропаноидов представляет интерес сухой экстракт клубней *Phlomis tuberosa* (L.) Moench (*Lamiaceae*), содержащий не менее 3% фенолпропаноидов, в том числе форситозид В (ForB), актеозид (вербаскозид) и изоактеозид (изовербаскозид), а также иридоиды и полисахариды [11]. Ранее нами установлена иммуномодулирующая активность сухого экстракта из клубней *P. tuberosa* [11–13].

Цель исследования — определение иммуномодулирующих свойств ForB, доминирующего фенолпропаноида клубней *P. tuberosa*, в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии.

Методика

Растительное сырье. Клубни *P. tuberosa* были собраны в окрестностях с. Ошурково (Иволгинский район, Республика Бурятия, 15.IX.2011), очищены от грунта и высушены при 50°C до воздушно-сухого состояния.

Выделение ForB. ForB экстрагировали из измельченных клубней *P. tuberosa* (1,5 кг) 60% этанолом (1:15) при 50°C с применением УЗ-ванны (100 Вт, частота 35 кГц) в течение 60 мин дважды. Полученные извлечения объединяли и высушивали в вакууме. Сухой остаток ресуспендировали в смеси растворителей этилацетат-вода (1:1) до равновесного состояния, после чего органический слой отбирали, промывали водой и концентрировали в вакууме до полного высушивания. Этилацетатное извлечение подвергали твердофазной экстракции на полиамиде (400 г), как описано ранее [14], элюируя водой (2 л), 40% этанолом (5 л) и 85% этанолом (5 л). Фракции, полученные элюцией 40% этанолом, объединяли, концентрировали высушиванием и хроматографировали на Сефадексе LH-20 (5x80 см) с применением градиентной системы вода-этанол (100:0→5:95). Фракции, полученные в результате элюции 30% этанолом, рехроматографировали в тех же условиях. В результате получено 124 мг форситозид В (ForB), идентифицированного по данным температуры плавления, масс-спектрометрии, УФ- и ЯМР-спектроскопии [15].

Эксперименты проведены на мышках-самцах линии F1 (СВАХС57В1/6) массой 18–20 г (питомник РАН Столбовая). Животные находились в стандартных условиях вивария. Эксперименты проводили в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных,

используемых для экспериментальных и иных научных целей». Протокол исследований согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол №2 от 05.09.2013 г.). Из эксперимента животных выводили дислокацией шейных позвонков под легким эфирным наркозом.

Действие ForB было изучено на интактных животных, а также животных, в состоянии иммунодепрессии. Иммуносупрессию вызывали введением цитостатика азатиоприна (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко», Россия, лекарственная форма — таблетки) в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сут. в течение 5 сут. [16]. ForB вводили иммуносупрессированным мышам в дозе 1 мг/кг перорально. Первое введение ForB осуществляли по окончании введения азатиоприна (АЗ), на 6-е сут. эксперимента и далее в течение 14 сут. 1 раз в сутки. Интактная группа животных получала по аналогичной схеме в соответствующем объеме очищенную воду. Действие ForB на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ [17]. Мышей sensibilizировали внутрибрюшинным введением 0,1% взвеси эритроцитов барана в физиологическом растворе. На 4-е сут. под подошвенный апоневроз задней лапы вводили разрешающую дозу антигена — 50 мкл 50% взвеси эритроцитов барана. В контрольную лапу инъецировали физиологический раствор в том же объеме. Оценку реакции ГЗТ проводили спустя 24 ч по разнице масс опытной и контрольной лап. Индекс реакции ГЗТ (I_p) рассчитывали по формуле:

$$I_p = [(M_{оп} - M_k) / M_k] \times 100\%$$

где

$M_{оп}$ — масса опытной лапы,

M_k — масса контрольной лапы.

Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по А.Д. Сиппінгхам (1965) [18]. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе 2×10^8 клеток/мышь. Величину иммунного ответа оценивали по числу антителообразующих клеток (АОК) на селезенку и на 10^6 клеток с ядрами на 5-е сутки после иммунизации.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического t критерия Стьюдента [19].

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния ForB на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что исследуемое вещество восстанавливает индекс данной реакции в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Введение азатиоприна приводило к снижению индекса реакции ГЗТ на 39% по сравнению с тем же показателем в интактной группе (табл. 1). После введения животным опытной группы с иммунодепрессией, ForB в дозе 1 мг/кг отмечалось увеличение индекса реакции ГЗТ в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой.

При исследовании влияния ForB на процессы антителообразования установлено, что это вещество по-

Таблица 1

Влияние ForB на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа ($\pm SD$)

Группа животных	I_p , %
Интактная, n = 10	32,42 \pm 3,18
Контрольная (АЗ+H ₂ O), n = 10	19,77 \pm 1,40*
Опытная (АЗ+ForB), n = 10	29,44 \pm 1,71**

Примечание. Различия статистически значимы по сравнению с данными: * — интактной группы; ** — контрольной группы ($p \leq 0,05$), n — количество животных в группе.

Таблица 2

Изменение количества антителообразующих клеток (АОК) селезенки мышей под влиянием ForB на фоне приема азатиоприна ($\pm SD$)

Группа животных	Количество АОК на селезенку	Количество АОК на 10^6 спленоцитов
Интактная, n = 10	66591 \pm 4997	166,08 \pm 12,92
Контрольная (АЗ+H ₂ O), n = 10	40717 \pm 3387*	99,76 \pm 8,85*
Опытная (АЗ+ForB), n = 10	53125 \pm 2540**	187,37 \pm 18,11**

Примечание. Различия статистически значимы по сравнению с данными: * — интактной группы; ** — контрольной группы ($p \leq 0,05$), n — количество животных в группе.

вышает показатели гуморального иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии (табл. 2). Введение азатиоприна приводило к снижению как абсолютного числа АОК, так и относительного (число АОК на 10^6 спленоцитов) на 39% и 40% соответственно, по сравнению с теми же показателями интактной группы.

Введение ForB на фоне иммуносупрессии статистически значимо увеличивало как абсолютное количество АОК, так и относительное при расчете на 10^6 спленоцитов; при этом 1-й показатель превышал уровень азатиоприновой супрессии в 1,3 раза, а 2-й — в 1,9 раза.

Таким образом, на основании проведенных исследований по выявлению иммуномодулирующей активности ForB установлено, что соединение обладает способностью восстанавливать показатели клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Результаты проведенного исследования согласуются с ранее полученными данными об иммуномодулирующем действии фенилпропаноидов [6—9].

Заключение

Форситозид (ForB), выделенный из клубней *P.tuberosa*, обладает иммуномодулирующим действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии, что аргументирует целесообразность его дальнейшего изучения с целью создания новых эффективных иммуномодуляторов.

References

1. Lazareva D.N., Plechev V.V., Morugova T.V., Samigullina L.I., *Plants, stimulating immunity. [Rasteniya, stimuliruyushchie immunitet]*. Ufa: «Bashkortostan»; 2005. (in Russian)
2. Paszkiewicz M., Budzyska A., Rozalska B., Sadowska B. The immunomodulatory role of plant polyphenols (Review). *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*. 2012; 66: 637-46.
3. Vajdy M. Immunomodulatory properties of vitamins, flavonoids and plant oils and their potential as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2011; 11(11): 1501-13.
4. Il'derbaev O.Z., Il'derbaeva G.O. The influence of the triterpenoid from *Betula pendula* on the reactivity of an organism exposed to action of the dust-radiating factor. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2011; 3: 47-8. (in Russian)
5. Kurkin V.A., Poroykov V.V. The phenylpropanoids of medicinal plants: the prognosis of the antioxidant and immunomodulating activities. *Sovremennye problemy nauki i obra-*

zovaniya. 2015; 2 Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22694>. (in Russian)

6. Kurkin V.A., Avdeeva E.V., Suvorova A.V., Dubishchev A.V. Acute problems and development prospects of phytopharmacology and phytotherapy. *Meditsinskiy al'manakh*. 2008; 4: 41-4. (in Russian)

7. Akbay P., Calis I., Undeger U., Basaran N., Basaran A.A. In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L. *Phytotherapy Research*. 2002; 16(6): 593-5.

8. Harmatha J., Zidek Z., Kmonickova E., Smidrkal J. Immunobiological properties of selected natural and chemically modified phenylpropanoids. *Interdisciplinary Toxicology*. 2011; 4(1): 5-10.

9. Ahmad W., Jantan I., Kumolosasi E., Bukhari S.N.A. Immunostimulatory effects of the standardized extract of *Tinospora crispa* on innate immune responses in Wistar Kyoto rats. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015; 9: 2961-73.

10. da Costa-Silva T.A., Grecco S.S., de Sousa F.S., Lago J.H., Martins E.G., Terrazas C.A. et al. Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of Phenylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucantha*. *Journal of Natural Products*. 2015; 78(4): 653-7.

11. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomoides tuberosa* on the fagocytic activity in experimental immunosuppression. In: *Materialy mezhdunarodnogo foruma «Klinicheskaya immunologiya i allergologiya — mezhdistiplinarnye problemy»*. Kazan'; 2014: 276-7. (in Russian)

12. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomoides tuberosa* (L.) Moench on the cellular chain of the immune response in experimental immunosuppression. In: *Proceedings of the VI International Scientific Conference «Traditional Medicine: Ways of Integration with Modern Health Care»*. Ulan-Ude; 2013: 97-8.

13. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomis tuberosa* on the humoral immune response. In: *Proceedings of the Seventh International Symposium on Mongolian Medicine and Natural Medicine Inner Mongolia*, (Tongliao) First Mongolian Medicine Industry Expo. Tongliao; 2015: 475-8.

14. Olennikov D.N., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Tankhaeva L.M. Iridoids and Flavonoids of Four Siberian Gentians: Chemical Profile and Gastric Stimulatory Effect *Molecules*. 2015; 20: 19172-88.

15. Saracoglu I., Harput U.S., Calis I., Ogiyara Y. Phenolic Constituents from *Phlomis lycia*. *Turkish journal of chemistry*. 2002; 26: 133-42.

16. Lazareva D.N., Alekhin E.K. *Immune stimulants. [Stimulyatory immuniteta]*. Moscow: Meditsina; 1985. (in Russian)

17. Mironov A.N., ed. *Guidelines for preclinical trials of drugs. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)

18. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibodyforming cells. *Nature*. 1965; 207(5001): 1106-7.

19. Lakin G.F. *Biometrics. [Biometriya]*. 4th ed. Moscow: «Vysshaya shkola»; 1990. (in Russian)

Сведения об авторах:

Цыренова Дарима Золтоевна, аспирант

Оленников Даниил Николаевич, доктор фарм. наук, вед. науч. сотр.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-001.18+616.832-004.2

Герасимова-Мейгал Л.И.¹, Сиренев И.М.^{1,2}

Холод-индуцированная реактивность у пациентов с рассеянным склерозом

¹ ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, Россия, пр. Ленина, д. 33

² Республиканская больница им. А.В. Баранова, 185019, г. Петрозаводск, Россия, ул. Пирогова, д. 3

Цель исследования — изучение особенностей восприимчивости пациентов с рассеянным склерозом (РС) к холодному воздействию с помощью функциональных тестов, характеризующих функцию терморегуляции. Как известно, РС — хроническое прогрессирующее аутоиммунное заболевание центральной нервной системы мультифакториальной природы, более часто встречающееся в регионах с холодным и влажным климатом. Нарушения терморегуляции вследствие автономной дисфункции являются характерным признаком РС, вместе с тем участием холодного фактора в развитии заболевания не придается существенного значения. **Методика.** Обследовано 32 пациента (17 мужчин и 15 женщин, средний возраст $29,6 \pm 4,2$ года) с установленным диагнозом: РС ремиттирующе-рецидивирующая форма течения (средняя продолжительность заболевания — $4,2 \pm 2,7$ года) и 18 практически здоровых лиц группы сравнения. Восприятие холода оценивали с помощью визуально-аналоговой шкалы. Продолжительность холод-индуцированной вазоконстрикции после локального холодного теста изучали по данным инфракрасной термометрии. Вегетативную регуляцию вазомоторных реакций оценивали по результатам анализа вызванных кожных вегетативных потенциалов (ВКВП). **Результаты.** На основе анализа самооценки восприятия холода у пациентов с РС показана низкая переносимость холодного фактора. При проведении локального холодного теста отмечено замедление восстановления температуры кожи кисти, что характерно для усиления холод-индуцированной вазоконстрикции. В группе пациентов с РС выявлено снижение параметров ВКВП ладоней и стоп, свидетельствующее о дефиците нейрогенного контроля терморегуляционных сосудистых реакций. **Заключение.** У пациентов с РС выявлены нарушения механизмов терморегуляции при действии холода, что обуславливает высокую индивидуальную восприимчивость к холоду у данной категории лиц. Сопоставление результатов анализа механизмов индивидуальной холод-индуцированной реактивности у пациентов с РС с данными эпидемиологических исследований приводит к заключению о потенциальном модулирующем влиянии холодного фактора на течение РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз; холод-индуцированная вазоконстрикция; локальный холодный тест; вызванный кожный вегетативный потенциал.

Для цитирования: Герасимова-Мейгал Л.И., Сиренев И.М. Холод-индуцированная реактивность у пациентов с рассеянным склерозом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 56—62.
DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.56-62

Для корреспонденции: Герасимова-Мейгал Людмила Ивановна, доктор мед. наук, проф., каф. физиологии человека и животных, патофизиологии, гистологии Медицинского института Петрозаводского государственного университета, e-mail: gerasimova@petrsu.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансовая поддержка. Исследование выполнено без финансовой поддержки.

Поступила 27.06.2016

Gerasimova-Meigal L.I.¹, Sirenev I.M.^{1,2}

Cold-induced reactivity in multiple sclerosis patients

¹ Petrozavodsk state university, 33, Lenin Str., 185910, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia

² Republican hospital V.A. Baranova, 3, Pirogov Str., 185019, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia

The purpose of the present study was focused on the evaluation of the sensitivity to cold in multiple sclerosis (MS) patients by means of functional thermoregulatory based tests. MS is known to be a chronic autoimmune progressive disease of the central nervous system of multifactor origin that is very common in regions with cold and humid climate. Disorder of thermoregulation caused by autonomic dysfunction is a typical feature of MS, however the role of the cold in the disease development is still underestimated. **Methods.** Thirty two MS patients (17 males, 15 females, mean age $29,6 \pm 4,2$ years) with the remittent form of the disease (mean disease duration $4,2 \pm 2,7$ years) and 18 age-matched healthy controls volunteered to participate in this study. Susceptibility to cold was analyzed with the use of visual-analogous scale. The duration of cold-induced vasoconstriction after local cold test was estimated using by infrared thermometry. Autonomic regulation of vasomotor reactions was investigated with the help of the skin sympathetic response (SSR) analysis. **Results.** The analysis of

self-reported perception of the cold in MS patients showed their low tolerance to cold. Slow recovery of the skin temperature of the hand in the local cold test observed in MS patients was considered as the aggravated cold-induced vasoconstriction. The decreased SSR in the hands and feet in MS patients was found that indicates the deficit of the neurogenic control of thermoregulatory vasomotor reactions. **Conclusion.** The results obtained demonstrate the impairment of thermoregulation under cold in MS patients that leads to higher individual susceptibility to cold of this group. Comparing of the data found in this study on the mechanisms of the individual cold-induced reactivity in MS patients with epidemiological surveys enable to conclude that cold environment has potential modulating effect of on the course of MS.

Keywords: multiple sclerosis; cold-induced vasoconstriction; local cold test; skin sympathetic response.

For citation: Gerasimova-Meigal L.I., Sirenev I.M. Cold-induced reactivity in multiple sclerosis patients. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)* 2017; 61(3): 56—62. (In Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.56-62

For correspondence: Liudmila Gerasimova-Meigal, doctor of medical sciences, professor of the department of human and animal physiology, pathophysiology, histology of Petrozavodsk state university, 33, Lenin Str., 185910, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia gerasimova@petsu.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Gerasimova-Meigal L.I. <http://orcid.org/0000-0002-3677-3764>

Sirenev I.M. <http://orcid.org/0000-0003-3778-4884>

Received 27.06.2016

Введение

Рассеянный склероз (РС) — хроническое аутоиммунное прогрессирующее заболевание нервной системы, характеризующееся множественными очагами демиелинизации в центральной нервной системе [1, 2]. Обще-признана мультифакториальная природа РС, при которой различные экзогенные влияния, включая вирусные инфекции (ретровирус, EBV, herpes VI, JC и др.), недостаточность инсоляции, приводящую к дефициту витамина D, особенности питания, хронические интоксикации (бензин, органические растворители) и др., запускают иммуновоспалительный процесс в ЦНС у лиц с генетической предрасположенностью [1, 2]. Данные литературы неоднозначно определяют роль климато-географических факторов в эпидемиологии РС. Существует точка зрения о широтозависимом распространении заболеваемости РС в северном полушарии [2, 3], наряду с этим есть мнение об отсутствии подобной закономерности [4]. Ряд авторов отмечает высокую частоту РС в странах с холодным и влажным климатом, а также сезонную динамику заболеваемости РС [2, 5, 6]. Наши собственные исследования также показали тенденцию к увеличению числа госпитализаций пациентов с РС в холодное время года [7].

Расстройства вегетативной регуляции различных систем организма, а также нарушения терморегуляции являются характерными признаками РС [1, 2, 8, 9]. Расстройства терморегуляции при РС объясняют последствиями демиелинизации, приводящей к дисфункции центральных механизмов сохранения теплового баланса, а также нарушениям восприятия изменений температуры и

эффекторных терморегуляционных реакций [8, 9]. Хорошо известен феномен Утхоффа, который заключается в плохой переносимости повышенной температуры и усилении неврологических симптомов РС при перегревании или повышении температуры внешней среды по любой причине (например, физическая нагрузка, действие горячей ванны, бани) [1, 2, 7, 9—11]. Нарушения терморегуляции в виде ощущения переохлаждения у пациентов с РС также хотя и встречаются, но не вызывают столь выраженного дискомфорта [8]. Вместе с тем, отмечается, что частота гипотермии у пациентов с РС может быть значительно выше, чем описывается в литературе [8]. Типично также нарушение судомоторной функции, отражающей активность вегетативной нервной системы, в частности, нарушается терморегуляционное потоотделение [8, 9]. Однако роль холодного фактора в развитии РС практически не рассматривается, несмотря на возможное участие механизмов холод-индуцированной реактивности и нарушений терморегуляции в развитии РС в условиях северного климата.

Ранее нами было показано, что холод-ассоциированные симптомы (ХАС) как проявление дезадаптации к холоду возникает чаще у лиц в начальном периоде акклиматизации, при различных хронических заболеваниях, при этом сопутствующие нарушения функции нервной системы повышали восприимчивость к холоду [12]. Для оценки адаптации к холоду использован подход к выявлению склонности к вазоконстрикторным реакциям, в том числе феномена Рейно и других ХАС, которые возникают при нарушении адаптации к холоду [12, 13] как проявление возрастающей адреночувствительности тканей [14, 15].

Цель исследования — изучение с помощью функциональных тестов особенностей индивидуальной восприимчивости пациентов с РС к холодному воздействию.

Методика

В исследовании приняли участие 50 чел. (27 мужчин, 23 женщины) в возрасте от 22 лет до 41 года, из которых 32 чел. имели установленный на основании критериев McDonald [2, 16] диагноз РС с ремиттирующе-рецидивирующей формой течения и 18 практически здоровых лиц (10 мужчин и 8 женщин сопоставимых по возрасту) составивших группу сравнения. Все испытуемые включались в исследование на основе добровольного информированного согласия.

Группа РС включала 17 мужчин и 15 женщин, средний возраст исследуемой группы составил $29,6 \pm 4,2$ года, средняя продолжительность заболевания — $4,2 \pm 2,7$ года. На момент исследования у 18 пациентов РС было обострение заболевания, 14 пациентов с РС обследованы в состоянии ремиссии. Пациенты с РС постоянно получали терапию препаратами, изменяющими течение РС (ПИТРС). Неврологический статус пациентов исследуемой группы был сопоставим по следующим критериям: вовлечение не более 3 функциональных систем по Куртке [17], средний показатель по шкале EDSS меньше 3.0 баллов, оценка функции рук по шкале Arm Index от 0 до 1 балла, состояние неврологического статуса по шкале SCRIPPS от 85 до 100 баллов, схожая локализация очагов демиелинизации по данным МРТ головного мозга.

Исследования выполняли в лаборатории (температура воздуха 22—24°C, в среднем $22,9 \pm 1,1^\circ\text{C}$, влажность 50—60%, скорость движения воздуха менее 0,1 м/с) после 30-минутного пребывания испытуемого в помещении для стабилизации температуры кожи. Анализ антропометрических параметров и «состава тела» проведен с помощью анализатора состава тела «Tanita SC-330». В антропометрических характеристиках статистически значимых различий исследуемых параметров между группами РС и сравнения не выявлено (табл. 1).

Субъективную восприимчивость к холоду оценивали с помощью визуально-аналоговой шкалы субъективного отношения к холоду, где 1—2 балла соот-

ветствовали низкой переносимости холода, 3—4 — умеренной, 5—6 — высокой переносимости холода. Кроме того, учитывались признаки дезадаптации к холоду в форме ХАС [12, 18], которые выявляли с помощью анкетирования на основе анамнестических описаний. Оценивали общее количество и наличие отдельных симптомов (феномен Рейно, боли, нарушения чувствительности и др.).

Для исследования холод-индуцированной вазоконстрикции использована методика проведения локального холодного теста с последующей термометрией [19]. Для этого испытуемый погружал кисть в холодную воду (температура в среднем $3,3 \pm 0,3^\circ\text{C}$) на 3 мин. Температуру кожи (T_k), отражающую терморегуляционные вазомоторные реакции [20, 21], измеряли с помощью портативного инфракрасного тепловизора «Testo 882» (Testo AG, Германия) на обеих руках в симметричных точках, расположенных на дистальных фалангах первого, третьего и пятого пальцев, в середине тыльной поверхности кисти, на уровне середины предплечья и наружной поверхности локтя. Измерения T_k проводили перед выполнением локального холодного теста, сразу после его проведения и далее через каждые 3 мин на протяжении 15 мин.

На протяжении исследования проводился контроль показателей систолического (САД) и диастолического (ДАД) артериального давления и частоты сердечных сокращений (ЧСС) с помощью электронного полуавтоматического тонометра UA-705 (A&D, Япония). Гемодинамические параметры измерялись в состоянии покоя, сразу по окончании локального охлаждения и далее на 6-й и 15-й мин периода наблюдения.

Состояние вегетативной регуляции оценивали с помощью анализа вызванных кожных вегетативных потенциалов (ВКВП). Регистрация ВКВП ладоней и стоп билатерально при однократной зрительной стимуляции (серия из 5—7 стимулов длительностью 20 мс) проводилась с использованием прибора «ВНС-спектр» («Нейрософт», Иваново) согласно методическим рекомендациям [19, 22]. Анализировали следующие параметры ВКВП: латентный период (L, с), амплитуду первой и второй фаз ВКВП (соот-

Таблица 1

Антропометрические характеристики исследуемых групп (данные представлены в формате $M \pm sd$)

Исследуемый параметр	Группа РС (n = 32)		Практически здоровые лица (n = 18)	
	Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
Масса тела, кг	$75,2 \pm 11,0$	$60,5 \pm 15,8$	$78,8 \pm 10,1$	$58,2 \pm 4,40$
Рост, см	$177,2 \pm 4,5$	$168,6 \pm 9,9$	$177,8 \pm 7,1$	$160,4 \pm 6,1$
ИМТ	$24,0 \pm 3,5$	$21,3 \pm 5,6$	$25,0 \pm 3,6$	$23,0 \pm 2,4$
Основной обмен, Ккал	1816 ± 177	1348 ± 158	1847 ± 152	1326 ± 67

ветственно A_1 , A_2 , мкВ), длительность восходящих частей фаз (соответственно S_1 , S_2 , с).

Анализ результатов выполнен с использованием методов вариационной статистики. Оценка значимости различий между группами проводилась с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и непараметрических критериев (Манна—Уитни, Спирмена, Кендалл—Тай). Статистически значимыми считали результаты при уровне значимости p менее 0,05. Обработка и анализ результатов проводились с помощью пакета «Statgraphics».

Результаты и обсуждение

Анализ результатов самооценки влияния холодого фактора показал более низкую переносимость действия холода у пациентов с РС (рис. 1). Большинство пациентов с РС (66%) оценивало переносимость холодого фактора 1—2 баллами (из 6), что соответствует реакции избегания действия холода, неспособностью к продолжительному пребыванию на холоде и выполнению каких-либо действий в холодных условиях среды. Средняя оценка переносимости холода в группе РС составила $2,2 \pm 1,2$, в то время как в группе сравнения — $3,6 \pm 1,4$ ($p < 0,01$).

Анализ корреляционных связей показал, что отрицательное отношение к холоду у пациентов с РС статистически значимо коррелирует с следующими факторами: 1 — ухудшение течения хронического заболевания, 2 — плохое самочувствие, 3 — увеличение числа ХАС, 4 — наличие холодной одышки, 5 — боль, 6 — дизурия. В группе с РС 73% опрошенных отмечали от 1 до 10 ХАС, наиболее часто выявлялись холодный ринит (у 41%), феномен Рейно (у 34%); холодная одышка (у 31%), холодные парестезии (у 28%). Феномен Рейно как один из характерных признаков повышения адренореактивности клеточно-тканевых структур сосудистой стенки [15], возникающий при нарушенной адаптации к холоду, как правило, проявлялся с некоторыми другими ХАС: холодная крапивница, боли различных локализаций, в том числе артралгии, что свидетельствует о системной реакции организма на холодный фактор. Последнее наблюдается при напряжении механизмов адаптации к холоду и часто выявляется у лиц с нарушениями здоровья [12]. Повышение частоты феномена Рейно в форме усиленной холод-индуцированной вазоконстрикции у пациентов с РС свидетельствует о высокой восприимчивости к холоду у данной категории лиц [12, 18].

Согласно данным литературы, феномен Рейно отличается вариабельностью и проявляется с непостоянной частотой при предъявлении холодовой экспозиции [15, 23]. Поэтому для оценки холод-индуцированной вазо-

констрикции был выполнен локальный холодый тест, при котором вазоконстрикторный эффект связан с ингибированием эндотелий-зависимого расслабления, опосредованного повышением активности симпатической нервной системы [15, 23]. При проведении локального холодого теста снижение T_k происходило главным образом в пределах кисти охлаждаемой руки, изменений T_k в области предплечья и локтя практически не отмечалось, также как и существенных изменений T_k в контролируемых точках контралатеральной конечности. Это свидетельствует об ограниченном локальном характере вазомоторных реакций, обеспечиваемых местными механизмами, в частности, временным ингибированием NO-синтазы, основного механизма эндотелий-зависимой вазодилатации [14]. Вместе с тем, результаты термометрии, представленные в табл. 2 и на рис. 2, показали усиление механизмов холод-индуцированной вазоконстрикции у пациентов с РС, что проявляется замедлением восстановления температуры дистальных участков охлаждаемой руки (кисти и пальцев). Так, в группе РС отмечены низкие значения T_k на кисти в течение всего периода наблюдения, в то время как в группе сравнения к концу наблюдения происходило практически полное восстановление T_k кисти. В процессе охлаждения T_k пальцев характеризовалась большой вариабельностью значений, статистически значимые отличия в обеих группах выявлены только в первые минуты после охлаждения. Различия динамики T_k кисти и пальцев, вероятно, связаны с особенностями структурно-функциональной организации периферического сегмента сосудистого русла [21]. Дистальные отделы пальцев имеют значительно большее количество артерио-венозных анастомозов по сравнению с тыльной поверхностью кисти, где T_k более тесно коррелирует с уровнем перфузии ткани.

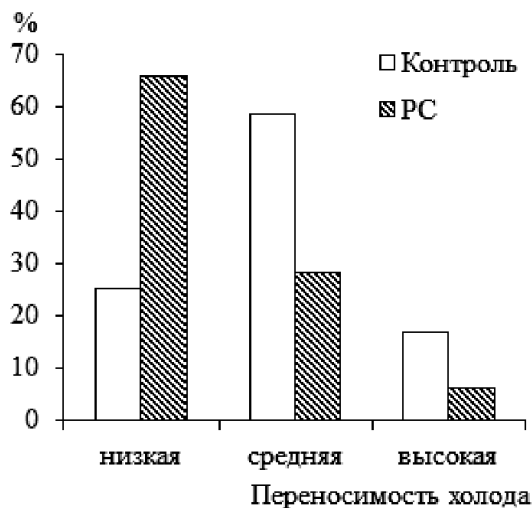


Рис. 1. Частота встречаемости исследуемых лиц с различной переносимостью холода в исследуемых группах.

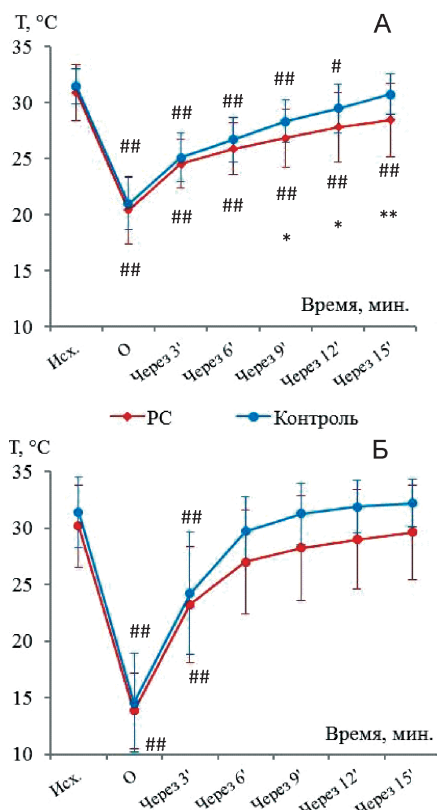


Рис. 2. Динамика температуры кисти (А) и пальцев (Б) охлаждаемой руки при проведении локального холодного теста (О – измерения сразу после локального охлаждения).
 Статистическая значимость отличий от исходного значения: # – $p < 0,01$, ## – $p < 0,001$ и между группами * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Выявленная нами измененная реактивность сосудов в условиях локального холодного теста при РС может отражать эндотелиальную дисфункцию, которая является одним из значимых факторов гипоперфузии головного мозга при РС, а также обуславливает вазомоторные нарушения на уровне периферических сосудов [24, 25]. Помимо этого, использование ПИТРС не только не устраняет дисбаланс цитокинов, как ведущий патогенетический фактор повреждения структур центральной нервной системы при РС, а также развития системной эндотелиальной дисфункции, но иногда усиливает его, вызывая проявления синдрома острой фазы, включая гриппоподобный синдром, миалгии, астенические реакции и др. [26].

Результаты проведенного теста позволяют рассценивать группу РС как высоковосприимчивую к действию холода за счет усиления реакции холод-индуцированной вазоконстрикции и более высокой частоты ХАС. Подобные реакции ранее были нами описаны при исследовании лиц с высокой восприимчивостью к холоду [18].

Артериальное давление перед проведением локального холодного теста в целом по группе в среднем находилось на уровне $113,6 \pm 8,6$ мм рт.ст. и $75,7 \pm 7,7$ мм рт.ст., для САД и ДАД, соответственно, ЧСС в среднем составила 70 ± 11 мин⁻¹. Сразу после локального охлаждения наблюдалось некоторое повышение САД и ДАД в среднем до $120,8 \pm 14,0$ мм рт.ст. и $80,2 \pm 9,9$ мм рт.ст. соответственно. К концу исследования значения САД и ДАД соответствовали исходным параметрам. Существенных

Таблица 2

Температура кожи рук при проведении локального холодного теста (M ± sd)

Период наблюдения	Группа	Охлаждаемая конечность			Контралатеральная конечность		
		Пальцы	Кисть	Предплечье	Пальцы	Кисть	Предплечье
Исходное значение	ПЗЛ ¹	31,4 ± 3,1	31,5 ± 1,6	31,1 ± 1,4	31,4 ± 3,1	31,6 ± 1,6	31,2 ± 1,3
	РС	30,2 ± 4,6	30,9 ± 2,5	30,9 ± 1,7	29,9 ± 4,7	30,8 ± 2,6	31,0 ± 1,8
После охлаждения	ПЗЛ	14,6 ± 4,3 ##	21,0 ± 2,3 ##	31,0 ± 1,2	29,8 ± 4,4	31,6 ± 1,7	31,3 ± 1,3
	РС	13,8 ± 4,6 ##	20,4 ± 3,0 ##	30,4 ± 1,3	29,4 ± 4,1	30,8 ± 2,3	31,1 ± 1,4
3 мин	ПЗЛ	24,2 ± 5,4 ##	25,1 ± 2,1 ##	31,0 ± 1,1	31,5 ± 2,7	31,7 ± 1,5	31,4 ± 1,2
	РС	23,2 ± 7,1 ##	24,5 ± 2,2 ##	30,2 ± 1,4	30,2 ± 4,4	30,9 ± 2,4	31,1 ± 1,4
6 мин	ПЗЛ	31,4 ± 3,1	25,1 ± 2,2 ##	30,6 ± 1,1	32,4 ± 2,2	31,8 ± 1,3	31,4 ± 1,1
	РС	27,0 ± 6,2	25,9 ± 2,3 ##	30,3 ± 1,4	30,2 ± 4,4	31,0 ± 2,5	31,3 ± 1,4
9 мин	ПЗЛ	31,3 ± 3,7	28,3 ± 1,9 ##	30,6 ± 1,1	32,8 ± 2,0	31,9 ± 1,2	31,4 ± 1,1
	РС	28,2 ± 5,6	26,8 ± 2,6 ## *	30,3 ± 1,4	30,5 ± 4,3	31,0 ± 2,5	31,3 ± 1,5
12 мин	ПЗЛ	31,9 ± 3,7	29,5 ± 2,2 #	30,7 ± 1,2	32,9 ± 1,7	32,0 ± 1,2	31,4 ± 1,2
	РС	29,0 ± 5,4	27,8 ± 3,1 ## *	30,4 ± 1,5	30,7 ± 4,3	31,0 ± 2,5	31,3 ± 1,5
15 мин	ПЗЛ	32,2 ± 3,1	30,8 ± 1,8	30,7 ± 1,3	32,7 ± 1,6	32,1 ± 1,2	31,4 ± 1,2
	РС	29,6 ± 5,2	28,5 ± 3,3 # **	30,0 ± 2,2	30,6 ± 4,3	31,1 ± 2,5	31,3 ± 1,5

Примечание. ¹ – ПЗЛ – практически здоровые лица; статистическая значимость отличий на основании дисперсионного анализа с пост-хок сравнением Дункана от исходного значения: # – $p < 0,01$, ## – $p < 0,001$ и между группами * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

изменений ЧСС не наблюдалось. Значимых различий регистрируемых гемодинамических параметров между исследуемыми группами в процессе проведения локального холододового теста не выявлено.

Автономная дисфункция при РС проявляется нарушением симпатико-опосредованных вазомоторных реакций и судомоторной активности [27]. Для оценки состояния вегетативной регуляции нами исследованы параметры ВКВП, представляющего собой надсегментарный соматовегетативный рефлекс изменения электродермальной активности, опосредованной симпатическими возбуждающими или тормозящими влияниями [19, 22]. При исследовании ВКВП нам не удалось зарегистрировать потенциалы у 8 пациентов с РС (25% от исследуемой группы). При анализе параметров зарегистрированных ВКВП выявлено снижение судомоторной активности в группе РС в виде снижения амплитуд 1-й и 2-й фаз ВКВП (A_1 и A_2 соответственно, табл. 3). Таким образом, для группы РС характерно снижение ВКВП, которое отражает нарушения проводимости в структурах ЦНС, снижение симпатико-опосредованных реакций, что, по данным литературы, выявляется достаточно часто у пациентов с РС [8, 27—29].

Как известно, регистрация ВКВП является адекватным методом исследования вегетативной регуляции судомоторных реакций [19, 22, 30]. Вместе с тем, по данным некоторых авторов, наблюдаемая активность может также отражать регуляцию вазомоторных реакций [14, 20]. В связи с этим выявленное усиление холод-индуцированной вазоконстрикции в группе РС, происходит при дефиците нейрогенных механизмов и, в основном, за счет повышения реактивности сосудистых структур к циркулирующим и локально образующимся вазоконстрикторным агентам, что аналогично механизмам развития феномена Рейно [15, 23]. В ранее проведенном исследовании пациентов в восстановительном периоде после перенесенных острых нарушений мозгового кровообращения мы наблюдали подобное явление замедленного восстановления температуры кисти после локального холододового теста

и снижение параметров ВКВП в конечности, контралатеральной очагу поражения [31]. Таким образом, сходные результаты обоих исследований у пациентов с РС могут быть расценены как измененная холод-индуцированная вазоконстрикция при нарушении центральных звеньев терморегуляции. Выявленные нарушения судомоторной активности у пациентов с РС соответствуют общепризнанным представлениям о плохой переносимости ими высоких температур [2, 8—11], в том числе из-за неэффективности механизмов теплоотдачи в форме потоотделения.

Заключение

Результаты исследования показали, что у пациентов с РС происходит изменение функциональных показателей, характеризующих вазомоторные реакции, свидетельствующее о нарушении механизмов терморегуляции при действии холода, что обуславливает высокую восприимчивость к холоду у данной категории лиц. Сопоставление полученных результатов анализа механизмов холод-индуцированной реактивности у пациентов с РС с данными эпидемиологических исследований [2, 3, 5—7] приводит к заключению о модулирующем влиянии холододового фактора на течение РС. Обнаруженные нами нарушения судомоторной активности у пациентов с РС могут иметь также потенциальное значение для развития общеизвестных при РС феноменов расстройств терморегуляции при действии высоких температур, которые связаны с неэффективностью теплоотдачи за счет реакции потоотделения.

Таким образом, исследование показало, что у пациентов с РС нарушения температурного гомеостаза возникают вследствие сложного взаимодействия патогенетических механизмов основного патологического процесса и, вероятно, эффектов проводимой терапии. Данные изменения температурной реактивности при РС в полной мере соответствуют дизрегуляторным нарушениям, как общепатологического компонента болезни [32].

Таблица 3

Параметры ВКВП в исследуемых группах (данные представлены в формате Ме (0,25; 0,75))

Исследуемый параметр	ВКВП кисти		ВКВП стопы	
	Практически здоровые лица	Рассеянный склероз	Практически здоровые лица	Рассеянный склероз
Латентность, с	1,55 (1,38; 1,73)	1,58 (1,38; 1,86)	2,05 (1,74; 2,23)	2,14 (1,89; 2,50)
A_1 , мВ	1,01 (0,54; 1,34)	0,54 (0,18; 1,30) *	0,54 (0,32; 0,75)	0,25 (0,04; 0,66) *
S_1 , с	0,94 (0,84; 1,21)	1,23 (0,88; 1,51)	1,14 (0,84; 1,36)	1,27 (1,08; 1,61)
A_2 , мВ	1,70 (1,14; 2,34)	0,92 (0,33; 2,35) *	1,15 (0,70; 1,79)	0,60 (0,22; 0,91) **
S_{2a} , с	2,16 (1,02; 3,99)	1,86 (1,11; 3,20)	2,13 (1,39; 3,06)	2,19 (1,57; 2,73)
S_{2b} , с	2,11 (1,61; 4,05)	2,7 (1,76; 3,70)	3,00 (2,37; 4,13)	2,54 (2,17; 3,81)

Примечание. Статистическая значимость критерия Манна—Уитни: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$

References

1. Matveeva T.V., Ibatullin M.M., Khafizova I.F. *Clinical and visualization features of the differential diagnosis of multiple sclerosis. [Kliniko-vizualizatsionnye osobennosti differentsial'noy diagnostiki rasseyannogo skleroza]*. Moscow: Triada-Kh; 2013. (in Russian)
2. Shmidt T.E., Yakhno N.N. *Multiple sclerosis. [Rasseyannyy skleroz]*. Moscow: Medpress; 2012. (in Russian)
3. Kingwell E.I., Marriott J.J., Jette N., Pringsheim T., Makhani N., Morrow S.A. et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol.* 2013; 13: 128.
4. Koch-Henriksen N., Sorensen P.S. Why does the north-south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the northern hemisphere? *J Neurol Sci.* 2011; Dec 15; 311(1-2): 58-63.
5. Benjaminse E., Olavsén J., Karlberg M., Alstadhaug K.B. Multiple sclerosis in far north-incidence and prevalence in Nordland County, Norway, 1970-2010. *BMC Neurol.* 2014; Dec 4; 14(1): 226.
6. Meier D.S., Balashov K.E., Healy B. Weiner H.L., Guttman C.R. Seasonal prevalence of MS disease activity. *Neurology.* 2010; 75(9): 799-806.
7. Sirenev I.M., Gerasimova L.I. Seasonal incidence of hospitalizations of patients with multiple sclerosis in the Republic of Karelia. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki.* 2014; 2: 44-6. (in Russian)
8. Davis S.L., Wilson T.E., White A.T., Frohman E.M. Thermoregulation in multiple sclerosis. *J. of Applied Physiol.* 2010; Nov. 109(5): 1531-7.
9. Huang M., Jay O., Davis S.L. Autonomic dysfunction in multiple sclerosis: implications for exercise. *Auton Neurosci.* 2015; 188: 82-5.
10. Bol Y, Smolders J, Duits A. Fatigue and heat sensitivity in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica.* 2012; Dec. 126: 384-9.
11. Park K., Tanaka K., Tanaka M. Uhthoff's phenomenon in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *European Journal Neurology.* 2014; Aug; 28(8): 72(3-4).
12. Gerasimova L.I. The role of desadaptation to cold in the development of preclinical conditions in the North. *Patogenez.* 2007; 5(1-2): 38-41. (in Russian)
13. Makinen T.M., Hassi J. Health problems in cold work. *Ind. Health.* 2009; 47(3): 207-20.
14. Johnson J.M., Minson C.T., Kellogg D.L. Cutaneous vasodilator and vasoconstrictor mechanisms in temperature regulation. *Compr. Physiol.* 2014; Jan;4(1): 33-89.
15. Flavahan N.A. A vascular mechanistic approach to understanding Raynaud phenomenon. *Nat Rev Rheumatol.* 2015; Mar; 11(3): 146-58.
16. Gafson A., Giovannoni G., Hawkes C.H. The diagnostic criteria for multiple sclerosis: From Charcot to McDonald. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2012; Jan;1(1): 9-14.
17. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983; Nov; 33(11): 1444-52.
18. Gerasimova L.I., Fedosova A.A. Characteristics of the autonomic regulation in humans with different susceptibility to cold. *Human Physiology.* 2016; 42(2): 228-33.
19. Vejn A.M. *Autonomic dysfunction: clinical diagnosis, treatment. [Vegetativnye rasstroystva: klinika diagnostika, lechenie]*. / Ed. A. M. Vejn. Moscow: OOO «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2003. (in Russian)
20. Tansey E.A., Johnson C.D. Recent advances in thermoregulation. *Adv Physiol Educ.* 2015; Sep;39(3): 139-48.
21. Krupatkin A.I. *Clinical neuroangiophysiology of the limbs (perivascular innervation and nervous trophic). [Klinicheskaya neyroangiofizjologiya konechnostey (perivaskulyarnaya innervatsiya i nervnaya trofika)]*. M.: Nauchnyy mir, 2003. (in Russian)
22. Odinak M.M., Kotel'nikov S.A., Shustov E.B. *Skin sympathetic responses: Guidelines. [Vyzvannyye kozhnyye vegetativnye potentsialy: Metodicheskie ukazaniya]*. SPb, Ivanovo; 1999. (in Russian)
23. Baumhake M., Bohm M. Recent achievements in the management of Raynaud's phenomenon. *Vascular Health and Risk Management.* 2010; 6: 207-14.
24. D'haeseleer M, Cambron M, Vanopdenbosch L, De Keyser J. Vascular aspects of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2011 Jul; 10(7): 657-66.
25. Kemenyova P, Siarnik P, Sutovsky S, Blaho A, Turciani P, Kollar Impairment of endothelial function in patients with multiple sclerosis. *B. Neuro Endocrinol Lett.* 2015; 36(1): 67-71.
26. Spirin N.N., Kasatkin D.S., Stepanov I.O., Shipova E.G., Baranova N.S. *Side-effects of treatment with disease modifying drugs in patients with multiple sclerosis: an analysis of register data in the Yaroslavl region. Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im. C.C. Korsakova.* 2012; 112(8): 27-33. (in Russian)
27. Keller D.M., Fadel P.J., Harnsberger M.A., Remington G.M., Frohman E.M., Davis S.L. Reduced spontaneous sympathetic nerve activity in multiple sclerosis patients. *J. of Neurol. Sci.* 2014; 344: 210-4.
28. Saari A., Tolonen U., Suominen K. Sudomotor dysfunction in patients with optic neuritis. *Clin. Auton. Res.* 2010; Jun; 20(3): 199-204.
29. Sternberg Z. Sympathetic nervous system dysfunction in multiple sclerosis, linking neurodegeneration to a reduced response to therapy. *Curr pharm Des.* 2012; 18(12): 1635-44.
30. Vetrugno R., Liguori R., Cortelli P., Montagna P. Sympathetic skin response: basic mechanisms and clinical applications. *Clin Auton Res.* 2003; Aug; 13(4): 256-70.
31. Berlogina S.Yu., Gerasimova L.I. Autonomic regulation of the circulatory system in patients in the early recovery period of the ischemic hemodynamic stroke. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2011; 10-3: 477-80. (in Russian)
32. Kryzhanovskiy G.N. Dizregulating pathology. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2002; 3: 1-29. (in Russian)

Сведения об авторах:

Сиренев Илья Михайлович, врач невролог, Республиканская больница им. В.А. Баранова; аспирант каф. физиологии человека и животных, патофизиологии, гистологии Медицинского института Петрозаводского государственного университета, e-mail: bender-ip@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 612.115.12

Березовская Г.А.^{1,2}, Лазовская Т.В.³, Петрищев Н.Н.^{1,2}

Вариабельность показателей тромбограмм теста генерации тромбина

¹ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8

² ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», 197341, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Аккуратова, д. 2

³ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург, Россия, Политехническая, д. 29

Цель исследования — изучение вариабельности показателей теста генерации тромбина (ТГТ) в бедной тромбоцитами плазме у практически здоровых людей. **Методика.** В исследовании использовалась бедная тромбоцитами плазма 30 практически здоровых людей (9 мужчин и 21 женщина) без клинических проявлений атеросклероза в возрасте от 30 до 56 лет. У всех участников проводилось стандартное исследование гемостаза: АЧТВ (с), протромбинового теста по Квику (%), содержания фибриногена (г/л) и D-димеров (мкг/мл), активности антитромбина (%) и МНО. **Результаты.** Установлено, что вариабельность показателей тромбограмм при добавлении в постановку рекомбинантного человеческого тромбомодулина (rh-TM) позволяет выявить скрытую склонность к гиперкоагуляции. Наиболее информативными оказались изменения временного показателя LT (Lag Time). Отсутствие изменений LT или увеличение данного показателя при добавлении rh-TM сопровождалось значительным увеличением количества и скорости образования тромбина, отражающего тенденцию к гиперкоагуляции. **Заключение.** Изменение времени инициации свёртывания крови (LT) после добавления rh-TM позволяет выявить скрытый дисбаланс в системе гемостаза.

Ключевые слова: тест генерации тромбина; тромбомодулин; система протеина С.

Для цитирования: Березовская Г.А., Лазовская Т.В., Петрищев Н.Н. Вариабельность показателей тромбограмм теста генерации тромбина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 63–68.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.63-68

Для корреспонденции: Петрищев Николай Николаевич, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии, руководитель Центра лазерной медицины ПСПбГМУ, e-mail: lasmed@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.05.2016

Berezovskaya G.A.^{1,2}, Lazovskaya T.V.³, Petrishchev N.N.^{1,2}

Variability trombogram test thrombin generation

¹ Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, 197022, Russian Federation, Saint Petersburg, ul. Leo Tolstoy, d. 6-8. Russia

² Federal Almazov North-West Medical Research Center, 197341, St. Petersburg, ul. Akkuratova, 2. Russia

³ Saint-Petersburg State Polytechnic University, 195251, St. Petersburg, Polytechnique, 29, Russia

According to the results of the thrombin generation test (TGT) thrombinogenesis is evaluated mainly by quantitative indicators. At the moment there is no consensus in the literature about the diagnostic value of time parameters. **The purpose.** To research the variability of TGT in platelet-poor plasma from healthy individuals. **Methods.** The study used platelet-poor plasma of 30 healthy individuals (9 men and 21 women) without clinical manifestations of atherosclerosis, age from 30 to 56 years. All subjects also received standard study hemostasis APTT (s), Quick prothrombin test (%), fibrinogen content (g/l) and D-dimers (µg/ml), antithrombin activity (%) and INR. **Results.** The analysis of indicators trombogram TGT in healthy people who have normal coagulation on the results of routine coagulation tests. It has been found that variability trombogram performance, when added to the formulation of recombinant human thrombomodulin (rh-TM), reveals latent tendency to hypercoagulability. The most informative indicator of temporary changes were LT (Lag to Time). Lack LT change or an increase in this indicator with the addition of rh-TM was accompanied by a significant increase in the number and rate of formation of thrombin, reflecting a tendency to hypercoagulability. **Conclusions.** Changing the time of initiation of blood clotting (LT) after the addition of rh-TM allows to reveal hidden imbalance in the hemostatic system.

Keywords: thrombin generation test; thrombomodulin; protein C system.

For citation: Berezovskaya G.A., Lazovskaya T.V., Petrishchev N.N. Variability trombogram test thrombin generation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 63–68. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.63-68

For correspondence: Nikolai N. Petrishchev, doctor of Medical Sciences, professor, Director of Laser Center Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, 6-8, Tolstoy Str. St. Petersburg, 197022, Russian Federation, e-mail: lasmed@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Berezovskaya G.A., <http://orcid.org/0000-0001-7854-5121>

Lazovskaya T.V., <http://orcid.org/0000-0002-3324-6213>

Petrishchev N.N., <http://orcid.org/0000-0003-4760-2394>

Received 31.05.2016

Введение

Долгое время лабораторная оценка состояния гемостаза была ограничена представлением о количестве, активности отдельных его компонентов и расчётными показателями, не способными охарактеризовать состояние гемостаза в целом. Возможность определения «суммарного вектора» действия про- и антикоагулянтных факторов связана с появлением интегрального теста генерации тромбина (ТГТ) со множеством его модификаций [1].

Автоматизированный тест генерации тромбина (ТГТ), позволяющий *in vitro* оценить интенсивность образования тромбина, значительно расширил представление исследователей и о кинетике гемостаза. В настоящее время для характеристики тромбиногенеза используются преимущественно количественные показатели ТГТ. Относительно диагностической ценности временных параметров этого теста единого мнения до сих пор нет, несмотря на то, что о влиянии на данные показатели различных факторов свёртывания крови хорошо известно [2].

Цель исследования — изучение вариабельности показателей ТГТ в бедной тромбоцитами плазме у практически здоровых людей.

Методика

Обследовано 30 практически здоровых людей (9 мужчин и 21 женщина) без клинических проявлений атеросклероза в возрасте от 30 до 56 лет, не принимающих антиагрегантные и антикоагулянтные препараты. Участие в исследовании подтверждено письменным согласием и одобрено Этическим комитетом ФГБУ СЗФМИЦ.

Стандартные коагулологические исследования проводились на автоматическом коагулометре STA-Compact (Diagnostica Stago, Швейцария) с использованием реагентов от производителя. Исследовали следующие показатели: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, с), протромбиновый тест по Квику (ПТ, %), содержание фибриногена (г/л) и D-димеров (с использованием ла-

тексной агглютинации, мкг/мл), активность анти-тромбина (АТ, %) и МНО. Исследования крови проводились в ЦКДЛ ФГБУ СЗФМИЦ.

Проведение ТГТ в бедной тромбоцитами плазме (PPP, Platelet-Poor Plasma) и анализ результатов теста выполнялись согласно методике, предложенной Hemker Н. и соавт. в 2003 г. [3]. Для стандартизации ТГТ образцы крови отбирали в вакуумные пробирки VACUETT®, содержащие в качестве консерванта 3,2% (0,109 M) раствор цитрата натрия при соотношении антикоагулянта и крови 1:9. Плазма бедная тромбоцитами была подготовлена путем последовательного двойного центрифугирования образцов крови: при 130g в течение 10 мин и 2500g в течение 30 мин. Для постановки ТГТ были использованы реагенты производства Thrombinoscope bv (Нидерланды). Триггерный реагент «PPP-Reagent 5pM» содержал смесь рекомбинантного человеческого тканевого фактора (th-TF) в конечной концентрации 5 пМоль и прокоагулянтных фосфолипидов. Смесь специфичного для тромбина флюорогенного субстрата и CaCl₂ подготавливалась перед каждой постановкой теста из реагентов «Fluo-Buffer» и «Fluo-Substrate».

Для оценки влияния системы активированного протеина С на образование тромбина постановка теста генерации тромбина была модифицирована добавлением в реакционную смесь человеческого рекомбинантного тромбомодулина (rh-TM) [4–6]. Калибровка производилась параллельно с генерацией тромбина в каждом исследуемом образце плазмы при помощи реагента «Thrombin Calibrator». Постановка ТГТ проводилась в дублях на планшетном флуориметре Fluoroskan Ascent®, оборудованном диспенсером производства ThermoFisher SCIENTIFIC (Финляндия). Построение и расчет показателей тромбogram генерации тромбина осуществлялись при помощи программного обеспечения Thrombinoscope® версия 3.0.0.26.

Анализировали следующие показатели ТГТ: LT (Lag Time) — время инициации свертывания (мин); Peak (Peak thrombin) — пиковое количество тромбина, (нМ); ttPeak (time to Peak) — время достижения пикового количества тромбина (мин); ETP (Endoge-

pous Thrombin Potential) — эндогенный тромбиновый потенциал (нМ·мин). Velocity Index (VI) — скорость образования тромбина (нМ/мин), рассчитываемую по формуле:

$$VI = \frac{Peak}{ttPeak - Lag\ time}$$

Для определения чувствительности к тромбомодулину (%) использовали показатели ТГТ, полученные в параллельной постановке с добавлением и без добавления тромбомодулина по формуле:

$$\begin{aligned} \text{Чувствительность к тромбомодулину} &= \\ &= \frac{X_{(\text{без } rh\text{-TM})} - X_{(c\ rh\text{-TM})}}{X_{(\text{без } rh\text{-TM})}} \times 100\%, \end{aligned}$$

где X — показатель тромбограммы.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью компьютерной программы SPSS 20.0. Оценка значимости различий между несколькими независимыми выборками для нормально распределенных данных с однородной дисперсией проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорными множественными сравнениями по критерию Шеффе. В других случаях применялся непараметрический критерий Краскала—Уоллиса, для множественных сравнений — критерий Манна—Уитни с поправкой Бонферони [7]. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Значения средних для выборок приведены в таблицах с соответствующими 95%-ными доверительными интервалами, а также стандартным отклонением.

Результаты и обсуждение

Состояние плазменно-коагуляционного звена гемостаза характеризуют показатели коагулограммы, большинство из которых являются расчётными. Результаты стандартных коагулологических тестов, выполненных в группе практически здоровых людей, не вы-

ходят за рамки референсных значений (табл. 1). Следовательно, по всем существующим критериям во всех случаях выявлена нормокоагуляция.

О состоянии системы свёртывания крови судили также по результатам ТГТ, выполненного в двух параллельных постановках — без добавления рекомбинантного тромбомодулина и с его добавлением (rh-TM). Полученные значения приведены в табл. 2.

Добавление в реакционную смесь rh-TM, как и по данным других авторов, сопровождалось уменьшением величин всех показателей в пределах нормальных значений, также соответствующих нормокоагуляции [2]. В нашем исследовании был рассчитан не только процент снижения ЕТР и Peak, традиционно характеризующий чувствительность к rh-TM, но и степень снижения временных показателей ТГТ: LT, ttPeak и V. Было установлено, что в присутствии rh-TM уменьшение LT (% снижения LT > 0) произошло в 11 случаях (36,7%), не повлияло на данный показатель (% снижения LT = 0) в 12 случаях (40%) и вызвало удлинение LT (% снижения LT < 0) в 7 случаях (23,3%).

Коэффициенты вариации (V) свидетельствуют об однородности выборки в постановке ТГТ без добавления rh-TM по всем показателям, за исключением VI. Коэффициент вариации для средних значений, близких к нулевому, не рассчитывается, а оценивается только стандартное отклонение. В постановке с добавлением rh-TM однородность выборки, судя по коэффициенту вариации (<33%), сохранялась лишь у временных параметров ТГТ (LT и ttPeak), что подчёркивает типичность найденной средней величины для конкретной статистической совокупности (табл. 2). При анализе количественных показателей — ЕТР и Peak, обычно используемых для оценки интенсивности образования тромбина, было установлено, что добавление rh-TM приводило к их уменьшению в 1,5—2 раза (табл. 2). Это согласуется с результатами других исследований, авторы которых предлагают считать критическим уровнем снижения ЕТР менее, чем на 23% и Peak менее, чем на 15% при постановке ТГТ с rh-TM,

Таблица 1

Показатели коагулограммы у здоровых людей

Показатели	Референсные значения	Группа испытуемых
Протромбиновый тест по Квику, %	80 — 120	105 111 118 $s = 14,8$
АЧТВ, с	28,0 — 40,0	32,2 33,4 34,7 $s = 3$
Фибриноген, г/л	2,0 — 4,0	3,06 3,27 3,48 $s = 0,50$
МНО	0,65 — 1,11	0,922 0,950 0,977 $s = 0,067$

Примечание. s — стандартное отклонение

которое могло быть связано с недостаточной чувствительностью системы гемостаза к добавляемому rh-TM в результате APC-резистентности, абсолютным или относительным дефицитом протенинов С и/или S, а также наличием Лейденской мутации [4].

Ожидаемым оказалось снижение скорости образования тромбина (VI, нМ/мин) под влиянием rh-TM и уменьшение времени достижения пикового количества тромбина в постановке с rh-TM, связанное с активацией системы протеина С под влиянием rh-TM, в результате чего меньшее количество тромбина инактивировалось быстрее.

Разделение обследуемых на 3 группы по реакции LT на добавление rh-TM позволило установить статистически значимые различия результатов ТТГ (табл. 3).

Поскольку значения ttPeak, Peak и VI в постановке с rh-TM не соответствовали закону нормального распределения, для анализа этих данных применялась поправка Бонферони, чтобы исключить возможные ошибки, возникающие при сравнении отдельных групп из совокупности. Были выявлены отличия между группами по показателям Peak и VI в обеих постановках, ttPeak в постановке без rh-TM, а также % уменьшения ttPeak при добавлении rh-TM. Значимыми эти отличия оказались между группами 1 и 2, в которых LT соответственно уменьшался и не изменялся при добавлении rh-TM. Группы с отсутствием изменения и удлинением LT в ответ на добавление rh-TM характеризовались большими пиковыми концентрациями тромбина, уменьшением времени достижения пиковых концентраций, а также увеличением ско-

Таблица 2

Показатели теста генерации тромбина у здоровых людей

Показатели	LT, мин	ETP, нМ · мин	Peak, нМ	ttPeak, мин	VI, нМ/мин
Без rh-TM	2,40 2,57 2,73 s = 0,45 V = 17,5%	1624 1737 1851 s = 303 V = 17,4%	254 281 308 s = 73 V = 26%	5,54 5,99 6,44 s = 1,20 V = 20%	75,6 94,0 112,3 s = 49,2 V = 52,3%
С rh-TM	2,36 2,50 2,64 s = 0,37 V = 14,8%	777 934 1091 s = 421 V = 45,1%	153 183 214 s = 81 V = 44,3%	4,89 5,14 5,38 s = 0,66 V = 12,8%	58,4 75,9 93,3 s = 46,8 V = 61,7%
Снижение после добавления rh-TM, %	-2,90 1,45 5,80 s = 11,65 —	40,3 47,1 53,9 s = 18,2 V = 38,6%	30,5 36,5 42,4 s = 16,0 V = 43,8%	8,7 12,6 16,4 s = 10,4 V = 82,5%	12,7 19,5 26,4 s = 18,3 V = 93,8%

Примечание. s — стандартное отклонение; V — коэффициент вариации

Таблица 3

Показатели теста генерации тромбина у здоровых людей в зависимости от реакции LT на добавление rh-TM

Показатель	dLT ₁ %LT >0 (11)	dLT ₂ %LT = 0 (12)	dLT ₃ %LT <0 (7)	Значимость, p
Однофакторный анализ				
Peak + rh-TM	99 135 172 s = 54	177 225 273 s = 75	100 187 275 s = 95	p между 1 и 2 = 0,024
VI	40 58 76 s = 27	97 123 149 s = 42	49 101 153 s = 56	p между 1 и 2 = 0,003
%ttPeak	17 22 27 s = 8	2,3 7,6 12,9 s = 8,3	-0,7 6,8 14,2 s = 8,1	p между 1 и 2 = 0,001 p между 1 и 3 = 0,003
LT	2,58 2,77 2,97 s = 0,29	2,27 2,57 2,87 s = 0,47	1,82 2,24 2,66 s = 0,45	p между 1 и 3 = 0,041
Краскала—Уоллиса критерий. Парные сравнения с поправкой по Бонферони по критерию Манна—Уитни				
ttPeak	6,4 6,9 7,4 s = 0,8	4,8 5,4 5,9 s = 0,9	4,3 5,6 6,9 s = 1,4	p между 1 и 2 = 0,003
Peak	186 226 266 s = 59	293 324 356 s = 74	225 294 363 s = 74	p между 1 и 2 = 0,003
VI + rh-TM	34 46 58 s = 18	73 99 124 s = 40	23 84 144 s = 65	p между 1 и 2 < 0,003

Примечание. p — значимость отличий для групп наблюдений; s — стандартное отклонение

рости образования тромбина. Корреляционный анализ позволил установить, что % снижения ЛТ имеет положительную корреляционную связь с ЛТ в постановке без rh-TM ($k = 0,586$; $\rho = 0,001$) и не коррелирует с ЛТ в постановке с rh-TM, следовательно, реакция на добавление rh-TM в большей мере обусловлена значением исходного ЛТ без rh-TM.

За время использования ТГТ сложились определённые представления о диагностической ценности его показателей в зависимости от поставленных перед исследованием задач [8]. Однако остаётся ряд нерешённых вопросов относительно целесообразности анализа всех его показателей. Избыточному образованию тромбина, как известно, препятствует активация целого ряда антикоагулянтных факторов, к числу которых относятся антитромбин (АТ), протеин С (РС), протеин S (PS), тромбомодулин (ТМ), а также ингибитор пути тканевого фактора (Tissue factor pathway inhibitor, TFPI). ТМ представляет собой трансмембранный белок, выполняющий роль рецептора тромбина на поверхности эндотелия. Тромбин в комплексе с ТМ превращает РС, связанный с эндотелиальным рецептором протеина С (рецептором-ЕРСР), в сериновую протеиназу — активированный протеин С (АРС), обладающий антикоагулянтной, противовоспалительной и цитопротекторной активностью. В комплексе с кофактором — протеином S, АРС инактивирует факторы Va и VIIIa, необходимые для образования тромбина.

В нашем исследовании участвовали практически здоровые люди без клинических проявлений атеросклероза и других заболеваний, сопровождающихся изменениями в системе гемостаза. Именно поэтому отсутствие в целом отклонений от референсных значений в обследованной группе среди рутинных коагулологических тестов и ТГТ оказалось вполне естественным. Однако отсутствие клинических проявлений атеросклероза, с учётом выбранной возрастной категории, не означает отсутствие самого процесса у обследованных людей.

Анализ показателей тромбограмм ТГТ 30 обследованных показал, что добавление в реакционную смесь человеческого рекомбинантного тромбомодулина (rh-TM) привело, как и ожидалось, к уменьшению количественных показателей, традиционно характеризующих чувствительность к ТМ, и снижению скорости образования тромбина. Не вполне объяснимым оказалось изменение временных показателей, ЛТ и ttPeak. Было выявлено 3 варианта реакции ЛТ на добавление rh-TM: уменьшение в 11 случаях, при этом процент снижения имел положительные значения (36,7%); отсутствие изменений в 12 случаях, сопровождающихся отсутствием разницы между двумя постановками (40,0%); увеличение в 7 случаях, что соответствовало отрицательному значению процента снижения данного показателя (23,3%). Во 2-й и 3-й группах пиковые концентрации

тромбина, а также скорость его образования в обеих постановках были значительно выше, чем в 1-й группе. Напротив, время достижения пиковых концентраций тромбина и процент снижения данного показателя при добавлении rh-TM в этих группах были существенно ниже, чем в 1-й группе. В группе людей, у которых изменения ЛТ при добавлении rh-TM отсутствовали полностью, т.е. % снижения ЛТ был равен 0, эти отклонения оказались статистически значимыми.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о влиянии на продолжительность ЛТ факторов свёртывания крови. Установлено, что в постановке ТГТ в РРР при концентрации ТФ 5 μM , как это имело место и в нашем исследовании, продолжительность этого периода меньше, чем при 1 μM ТФ, более чем в 2 раза ($\rho < 0,0001$), а добавление rh-TM в концентрации 5 μM , напротив, сопровождается увеличением ЛТ ($\rho < 0,0001$). Отмечено также, что добавление в постановку rh-TM, независимо от концентрации ТФ, приводит к значительному уменьшению количественных показателей ТГТ (Peak и ETP; $\rho < 0,0001$), а к уменьшению ТТР только в постановке с ТФ в концентрации 1 μM [2]. Показано также, что степень влияния ТФ на продолжительность ЛТ зависит от концентрации других прокоагулянтов и антикоагулянтов. При этом изменения ЛТ в РРР с 5 μM ТФ менее выражены, чем при постановке с использованием 1 μM ТФ. Установлено, что ЛТ постепенно удлиняется по мере уменьшения концентрации факторов свертывания, но в большей мере в постановке с 1 μM ТФ. Известно также, что продолжительность ЛТ наиболее чувствительна к изменениям концентрации ФХ. Так, ЛТ увеличивается в 9 раз при уменьшении концентрации ФХ со 100% до 5%. Данный эффект наблюдался как в РРР, так и в РРР (Platelet-Rich Plasma).

Известно, что ЛТ в постановке с 5 μM ТФ укорачивается при увеличении концентрации ФVII и ФXII. Аналогичная зависимость, т.е. значительное сокращение ЛТ, наблюдается при увеличении концентрации ФV в постановке РРР, но при низких концентрациях ТФ (1 μM). Дефицит протеина S приводит к сокращению ЛТ на 125% при 1 μM ТФ и примерно на 80% при 5 μM ТФ [9]. Также установлено, что фибриноген и протромбин удлиняют ЛТ независимо от концентрации ТФ и наличия rh-TM, а факторы XI, IX и VIII существенно не изменяют его, хотя степень этого влияния немного больше в присутствии ТМ. При этом ЛТ не реагирует на дефицит ФXI, АТ и протеина С [2].

Результаты другого исследования свидетельствуют о том, что ЛТ в основном зависит от уровня ингибитора пути тканевого фактора (TFPI), протеина S (PS), ФVII, ФIX и фибриногена. Основными факторами, определяющими образование тромбина (ETP и Peak)

при концентрации ТФ 1рМ, являются фибриноген, ФХа (несмотря на ингибирование контактной активации), свободный ТФР1 и АТ как в отсутствие, так и в присутствии rh-ТМ. Образование тромбина в присутствии rh-ТМ также зависит от уровней протеина С. При концентрации ТФ 13,6 рМ, образование тромбина зависит от протромбина, АТ, фибриногена, свободного ТФР1 и ФV в отсутствие APC, и свободного ТФР1, PS и ФХ при наличии APC [10]. Одним из наиболее значимых факторов, влияющих на продолжительность ЛТ, является ТФР1, активность которого зависит от уровня эстрогенов, липидного спектра крови и проявлений атеросклероза [11]. Способностью изменять активность протромбиназы и, следовательно, начальную фазу образования тромбина, обладает одна из двух известных на данный момент изоформ ТФР1 — ТФР1б, точнее 2 его ингибиторных домена типа Kunitz (K2 и K3), благодаря препятствию взаимодействия Va и Ха факторов, приводящему к угнетению образования тромбина. Однако известно о существовании механизмов, благодаря которым данный эффект тормозится, что приводит к развитию прокоагулянтных эффектов отрицательно заряженных макромолекул, таких, как, например, гепарин [12, 13].

Было установлено, что добавление rh-ТМ в одну из параллельных постановок ТГТ у здоровых людей позволило выявить различные варианты изменения ЛТ в виде его увеличения, укорочения и отсутствия изменений. Отсутствие реакции ЛТ на rh-ТМ и его удлинение сопровождалось большими пиковыми концентрациями тромбина, увеличением скорости его образования и уменьшением времени достижения пиковых концентраций. Наиболее значимыми эти изменения были в группе с полным отсутствием изменений ЛТ при добавлении rh-ТМ, в которой также было отмечено минимальное снижение процента ttPeak, отражающее чувствительность к rh-ТМ.

Таким образом, анализ результатов теста генерации тромбина у практически здоровых людей позволил выявить вариабельность изменений показателей тромбограмм после добавления rh-ТМ. Выявленные нами варианты реакции ЛТ на добавление rh-ТМ и соответствующие им изменения других показателей ТГТ, безусловно, являются лабораторным феноменом. Однако дальнейшее изучение изменчивости показателей тромбограмм, на наш взгляд, может быть полезным для выявления дисбаланса в системе гемо-

стаза у больных людей с высоким риском как тромботических, так и геморрагических осложнений, получающих соответствующую терапию, а также пациентов, не имеющих исходно риска подобных осложнений, но нуждающихся в оперативном лечении.

References

1. Hemker H.C., Dieri R.A., De Smedt E. et al. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* 2006; 96: 553-61.
2. Machlus K.R., Colby E.A., Wu J.R. et al. Effects of tissue factor, thrombomodulin and elevated clotting factor levels on thrombin generation in the calibrated automated thrombogram. *Thromb Haemost.* 2009; 102(5): 936-944. doi: 10.1160/TH09-03-0180.
3. Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R. et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33: 4-15.
4. Dargaud Y., Trzeciak M.C., Bordet J.C. et al. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognize the prothrombotic phenotype. *Thromb. Haemost.* 2006; 96(5): 562-7.
5. Liesel S., Sandset P.M., Mowinckel M.C. et al. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(11): 2204-10.
6. Tripodi A., Martinelli I., Chantarangkul V. et al. The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 2007; 121: 353-9.
7. Zar J.H. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey; 1999.
8. Papajan L.P., Golovina O.G., Chechetkin A.V. et al. *Diagnostic algorithm hemostasis and monitoring of antithrombotic therapy. Guidelines*. 2016. SPb., Agency «ViT-print», 2016. (in Russian)
9. Kim S.Y., Kim J.E., Kim H.K. et al. Influence of coagulation and anticoagulant factors on global coagulation assays in healthy adults. *Am J Clin Pathol.* 2013; 139(3): 370-9. doi: 10.1309/AJCP5C4AGFRDKMX
10. Dielis A.W., Castoldi E., Spronk H.M. et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(1): 125-31.
11. Winckers K., ten Cate H., Hackeng T.M. The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis. *Blood Rev.* 2013; 27(3): 119-32. doi: 10.1016/j.blre.2013.03.001.
12. Wood J.P., Bunce M.W., Maroney S.A. et al. Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(44): 17838-43.
13. Wood J.P., Ellery P.E., Maroney S.A. et al. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 2014; 123 (19): 2934-43.

Сведения об авторах:

Березовская Гелена Анатольевна, канд. мед. наук, ассистент каф. факультетской терапии ПСПбГМУ, ст. науч. сотр. НИЛ ОКС СЗФМИЦ, e-mail: berezovgel@mail.ru

Лазовская Татьяна Валерьевна, ст. преподаватель каф. высшей математики СПбПУ, e-mail: tatianala@list.ru

© Коллектив авторов, 2017

УДК 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Фоменко О.Ю.¹, Шельгин Ю.А.^{1,2}, Порядин Г.В.³, Титов А.Ю.¹,
Берсенева Е.А.¹, Мудров А.А.^{1,2}, Белоусова С.В.¹

Утомляемость мышц наружного анального сфинктера у пациентов с анальной инконтиненцией

¹ ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, 123423, г. Москва, Россия, ул. Саляма Адила, д. 2

² ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 125993, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

³ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Цель — изучение зависимости утомляемости наружного сфинктера от наличия анальной инконтиненции и степени выраженности. **Методы.** Для выяснения зависимости утомляемости от наличия анальной инконтиненции обследовано 203 пациента с жалобами на недержание различных компонентов кишечного содержимого: 90 мужчин (44,3%), средний возраст $44,8 \pm 14,7$ года и 113 женщин (55,7%), средний возраст $46,4 \pm 15,2$ года. Для определения нормативных величин отображены 53 пациента с полипами ободочной кишки, без клинико-инструментальных признаков анальной инконтиненции. В состав группы вошли 23 женщины (43,4%), средний возраст $51,4 \pm 11,1$ года и 30 мужчин (56,6%), средний возраст $65,1 \pm 15,9$ года. Использован разработанный в ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России метод комплексной сфинктерометрии неперфузионным датчиком водного наполнения на приборе WPM Solar GI. **Результаты и обсуждение.** Получены нормативные показатели теста на выносливость наружного сфинктера. Не выявлено корреляции между степенью недостаточности анального сфинктера (по показателям давления в анальном канале) и одним из параметров утомляемости (временем падения давления на 50%), вероятнее всего из-за посттравматического характера недостаточности анального сфинктера. Предполагается продолжение работы по изучению утомляемости при различном генезе анальной инконтиненции.

Ключевые слова: наружный анальный сфинктер, тонус и сократительная способность анальных сфинктеров, давление в анальном канале, недостаточность анального сфинктера.

Для цитирования: Фоменко О.Ю., Шельгин Ю.А., Порядин Г.В., Титов А.Ю., Берсенева Е.А., Мудров А.А., Белоусова С.В. Утомляемость мышц наружного анального сфинктера у пациентов с анальной инконтиненцией: Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017;61(3): 69–75.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.69-75

Для корреспонденции: Фоменко Оксана Юрьевна, канд. мед. наук, руководитель лаб. клинической патофизиологии ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России, e-mail: info@gnck.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.03.2017

Fomenko O.Yu.¹, Shelygin Yu.A.^{1,2}, Poryadin G.V.³, Titov A.Yu.¹,
Berseneva E.A.¹, Mudrov A.A.^{1,2}, Belousova S.V.¹

The muscle fatigue of external anal sphincter in patients with anal incontinence

¹ State Scientific Centre of Coloproctology, Moscow, Russia

² Russian Medical Academy of Postgraduate Continuous Education, Moscow, Russia

³ Pirogov's Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia

The article presents materials on the muscle fatigue of the external sphincter in the norm and in patients with anal sphincter failure. **The purpose.** To determine the dependence of external sphincter fatigue on the presence of anal incontinence and its degree. **Methods.** 203 patients with complaints of incontinence of various components of intestinal contents were examined (90 male (44.3%), mean age is 44.8 ± 14.7 years, 113 female (55.7%) mean age is 46.4 ± 15.2 years) to determine the dependence of fatigue on the presence of anal incontinence. 53 patients with colon polyps without clinical and instrumental signs of anal incontinence were selected for the determination of normal values. 23 female (43.4%), mean age is 51.4 ± 11.1 years; 30 male (56.6%), mean age is 65.1 ± 15.9 years. For the study, we used the method of complex sphincterometry developed in State Scientific Centre of Coloproctology on the device WPM Solar GI (MMS, The Netherlands) with a nonperfusion water sensor. **Results.** We have received normal values for external sphincter endurance test. At the same time, there was no correlation between the degree of anal sphincter failure (in terms of pressure in the anal canal) and one of the fatigue parameters (the time of the pressure drop by 50%), most likely because of the post-traumatic nature of anal sphincter failure. We plan to continue studying fatigue with a different genesis of anal incontinence. **Conclusion.** We plan to continue studying fatigue with a different genesis of anal incontinence.

Keywords: external anal sphincter, tone and contractility of the anal sphincter, pressure in the anal canal, anal incontinence.

For citation: Fomenko O.Yu., Shelygin Yu.A., Poryadin G.V., Titov A.Yu., Berseneva E.A., Mudrov A.A., Belousova S.V. The muscle fatigue of external anal sphincter in patients with anal incontinence. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 69–75. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.69-75

For correspondence: Oksana Yu. Fomenko, Candidate of Medical Sciences, State Scientific Centre of Coloproctology; 2, ul. Salyama Adyila, Moscow, 123423, Russian Federation, e-mail: info@gnck.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Fomenko O.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9603-6988>

Shelygin Yu.A., <http://orcid.org/0000-0002-8480-9362>

Titov A.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-1636-8075>

Berseneva E.A., <http://orcid.org/0000-0002-9343-9279>

Mudrov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-1207-5988>

Belousova S.V., orcid.org/0000-0003-1475-2599

Received 03.03.2017.

Введение

Сократительная способность наружного анального сфинктера и его способность поддерживать стойкое сокращение играет важную роль в удержании кишечного содержимого. При этом большинство мышечных волокон наружного сфинктера, в отличие от скелетных мышц, представлено «медленными» волокнами (тип I), устойчивыми к утомлению [1], что полностью соответствует его функциональным задачам. В то же время, в научной литературе встречается мало исследований, посвящённых изучению вопроса утомляемости мышечного жома заднего прохода. Так было установлено [2], что время его утомления составляет приблизительно 1 мин, а волевое сокращение мышц наружного сфинктера в среднем может длиться 3,2 мин [3]. Основопологающей работой, на которую ссылается большинство современных авторов, является исследование [4], в котором был определен индекс утомляемости FRI (fatigue rate index). Формула вычисления индекса FRI:

$$FRI = \frac{\text{пиковое давление} - \text{макс. давление покоя (мм рт. ст.)}}{\text{скорость утомления (мм рт. ст./мин)}}$$

Данный индекс рассчитывался на основании метода линейной регрессии и означал время полного утомления сфинктера, когда давление в анальном канале возвращается к базальному (авторы использовали метод аноректальной манометрии). Кроме вычисления FRI, авторы исследовали латентность полового нерва (PNTML).

Позднее в 2004 г. было отмечено [1], что пациентам с анальным недержанием сложно удерживать максимальное мышечное сокращение сфинктера в те-

чение 40 с, что привело к выбору 20-секундного интервала для изучения индекса утомляемости. В качестве методов оценки также была использована аноректальная манометрия и PNTML. Выявлены статистически значимые различия индекса FRI между пациентами с анальной инконтиненцией и здоровыми добровольцами. Другими авторами [5] была выявлена отрицательная корреляция между показателями скорости утомляемости и величиной максимального давления сжатия. Помимо этого, было установлено, что с возрастом наружный анальный сфинктер становится менее утомляемым, что может соответствовать наличию более высокого процента медленно сокращающихся мышечных волокон I типа (однако данная гипотеза требует гистологического подтверждения). Авторы полагают, что эти противоречивые данные можно объяснить потерей с возрастом «быстрых» мышечных волокон (II типа) во всех мышцах организма, в том числе и в наружном анальном сфинктере, вследствие чего, с возрастом происходит снижение силы, но не утомляемости.

При оценке силы сокращения анального сфинктера и локтевого сгибателя было выявлено более выраженное снижение силы сокращений анального сфинктера при транскраниальной стимуляции, что, по мнению авторов, свидетельствует о повышенной утомляемости анального сфинктера по сравнению со скелетными мышцами. Механизм более высокой утомляемости связан, вероятнее всего, с центральными механизмами, что играет, защитную роль в сохранении сократительного потенциала с целью реализации функции держания [6]. Центральным механизмом регуляции выявлен и в работе диафрагмы. Данный механизм направлен на то, чтобы максимальные волевые сокра-

щения диафрагмы не смогли бы привести к полному утомлению и утрате функции обеспечения постоянного поступления кислорода в легкие [7].

В последнее время выносливость сфинктера рассчитывается как время, в течение которого давление в анальном канале при 30-секундной попытке сжатия снижается на 50% ниже максимального давления [8], (однако следует учитывать большой разброс данных, получаемых при использовании теста).

В доступной нам литературе мы не нашли исследований корреляции утомляемости наружного сфинктера и степени выраженности анальной инконтиненции (I, II, III степень недержания). Большинство работ посвящено различным методам лечения недержания кала [9, 10].

Цель исследования — выявление зависимости утомляемости наружного сфинктера от наличия анальной инконтиненции и степени ее выраженности.

Методика

Для выяснения зависимости утомляемости наружного сфинктера от наличия анальной инконтиненции и степени ее выраженности было обследовано 203 пациента с жалобами на недержание различных компонентов кишечного содержимого. В исследование включено 90 мужчин (44,3%), средний возраст $44,8 \pm 14,7$ года и 113 женщин (55,7%), средний возраст $46,4 \pm 15,2$ года. С помощью шкалы инконтиненции Векснера и шкалы балльной оценки степени нарушения эвакуаторной функции (ГНЦК им. А.Н. Рыжих) для определения нормальных показателей проведено анкетирование 53 пациентов с полипами ободочной кишки, у которых не выявлено клинично-инструментальных признаков анальной инконтиненции (группа контроля). В группу контроля включены 23 женщины (43,4%), средний возраст $51,4 \pm 11,1$ года и 30 мужчин (56,6%), средний возраст $65,1 \pm 15,9$ года.

Все пациенты с недостаточностью анального сфинктера (НАС) были распределены в соответствии с клинической классификацией НАС, разработанной в ГНЦК. С жалобами на недержание газов было 109 пациентов (53,7%), 68 больных (33,5%) не удерживали газы и жидкий стул и 26 чел. (12,8%) были неспособны удерживать все компоненты кишечного содержимого, что соответствовало I, II и III степени НАС. Анализ этиологических факторов возникновения болезни показал, что посттравматическая НАС выявлялась у 5 пациентов (2,4%), 33 больных (16,3%) отметили появление жалоб на недержание кала после травматических родов, послеоперационная НАС отмечена у 165 пациентов (81,3%). При оценке результатов заполнения шкалы инконтиненции Векс-

нера количество баллов у пациентов с НАС I степени составило в среднем $3,3 \pm 2,3$, у пациентов с НАС II — $7 \pm 2,5$ балла, у пациентов с НАС III — $10,8 \pm 1,8$ балла. В качестве метода функциональной оценки использовали разработанный в ГНЦК метод комплексной сфинктерометрии неперфузионным датчиком водного наполнения на приборе WPM Solar GI фирмы MMS, Голландия [9].

Специальной подготовки к исследованию, кроме естественной дефекации в день исследования, не требовалось. В случае отсутствия самостоятельного стула пациент использовал фосфатную микроклизму, что обеспечивало адекватную подготовку к исследованию. Больного укладывали на кушетку в положение «лежа на боку с согнутыми в коленях ногами». Перед введением в анальный канал на датчик надевали латексный баллончик. Датчик вводили на глубину 3,0—3,5 см.

Запись данных производили через 3—4 мин после введения — время, необходимое для адаптации больного к исследованию и затухания анального рефлекса, вызванного введением датчика.

Тест на выносливость, согласно опубликованным работам Telford K.J. [1], проводился в течение 20 с и включал в себя оценку 4 показателей:

- 1 — давление покоя перед началом волевого сокращения;
- 2 — максимальное давление при волевом сокращении;
- 3 — время падения давления на 50% после достижения максимального давления (первый пик, 1*);
- 4 — площадь фигуры, ограниченной сверху кривой давления, за время волевого сокращения (20 с, 2*).

По параметрам давления в покое и максимального давления при волевом сокращении рассчитывались значения времени падения давления на 50% (по первому пику падения) и площади под кривой (оценка мощности сокращения) [8].

В работе были применены следующие методы обработки данных:

- 1) критерий Шапиро*—Уилка для проверки на нормальность распределений (для оценки возможности использования параметрических или непараметрических критериев для сравнения рассматриваемых групп; выбор данного критерия для проверки на нормальность связан с его наибольшей мощностью);
- 2) сравнительный анализ переменных с помощью параметрического Т-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей (по результатам предшествующей проверки на нормальность; выбор данного критерия обусловлен его наибольшей мощностью для рассматриваемых групп);
- 3) дисперсионный анализ.

Для автоматизации статистической обработки использовали статистический пакет Statistica for Windows 12.5.

Таблица 1

Нормальные показатели теста на выносливость

Параметр	Мужчины (n = 30)	Женщины (n = 23)
Среднее давление покоя перед тестом на выносливость (мм рт.ст.)	43–61	41–63
Максимальное давление сокращения (мм рт.ст.)	121–227	110–178
Время падения давления на 50% при тесте на выносливость (с)	13–20	9–19
Площадь под кривой (оценка мощности сокращения) (мм рт.ст. · с)	367–873	220–682

Результаты и обсуждение

При проведении теста на выносливость по данным сфинктерометрии были изучены вышеперечисленные параметры для расчета утомляемости мышц наружного сфинктера в норме (табл. 1, рис. 1).

Кроме того, при сфинктерометрическом исследовании были получены значения указанных выше параметров утомляемости при различных степенях инконтиненции у мужчин и женщин.

При проведении однофакторного дисперсионного анализа выявлены статистически значимые различия для среднего давления покоя и максимального давления сокращения, как у мужчин, так и у женщин по сравнению с нормальными показателями. В связи с этим далее нами был проведен сравнительный анализ переменных в наблюдаемых группах пациентов с различными степенями НАС с использованием t-критерия Стюдента. В результате были выявлены статистически значимые раз-

личия наблюдаемых переменных (среднее давление покоя среднее и максимальное давление сокращения) между всеми исследуемыми подгруппами (1-й и 2-й, 1-й и 3-й, 2-й и 3-й), что позволило построить референсные интервалы.

Так, анализируя параметры давления в покое и при волевом сокращении, были выявлены различия показателей как у мужчин, так и у женщин (табл. 2, рис. 3, 4).

Следует обратить внимание, что, несмотря на полученные статистически значимые различия в параметрах давления в покое и максимальном сокращении сфинктера у мужчин и женщин при различных степенях НАС, не выявлено существенных отличий в показателях времени падения давления на 50% после достижения максимального пика при различных степенях НАС у всех пациентов. Кроме того, этот параметр статистически значимо не отличался от нормальных величин (табл. 3, рис. 5).

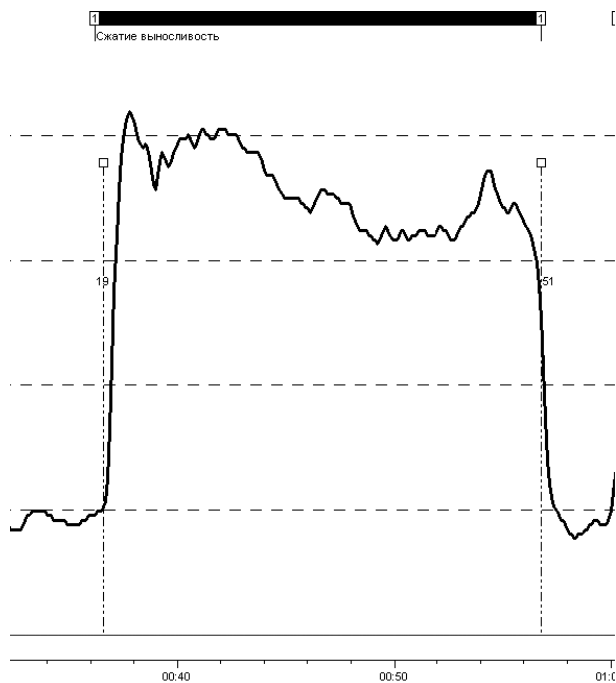


Рис. 1. Кривая утомляемости мышц наружного сфинктера в норме (пациентка Е., 57 лет, АК № 4591-15).

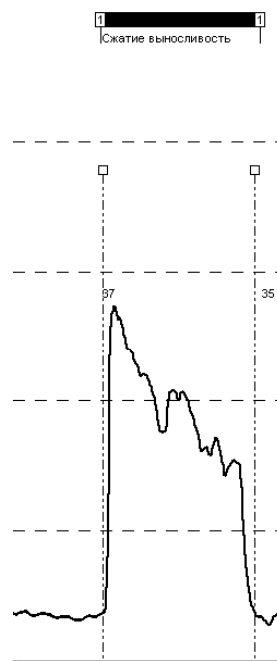


Рис. 2. Повышенная утомляемость мышц наружного сфинктера (пациент ПП., 18 лет, АК № 7951-16, диагноз — НАС II).

Таблица 2

Параметры давления в анальном канале в норме и при различных степенях НАС

Степень НАС	Манометрические показатели (мм рт. ст.)			
	Среднее давление в покое		Максимальное давление сокращения	
	Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
Норма	43–61	41–63	121–227	110–178
I (n = 109)	35–38	36–39	119–145	108–134
II (n = 63)	26–30	30–34	85–116	72–92
III (n = 26)	14–22	15–21	38–58	32–46

Примечание. Различия статистически значимы $p < 0,05$

Таблица 3

Параметры утомляемости (1*) наружного сфинктера при различных степенях НАС

Степень НАС	Время падения давления на 50%, с	
	Мужчины	Женщины
Норма	13–20	9–19
I (n = 109)	10–14	9–13
II (n = 63)	9–14	8–12
III (n = 26)	5–18	8–16

Примечание. $p > 0,05$

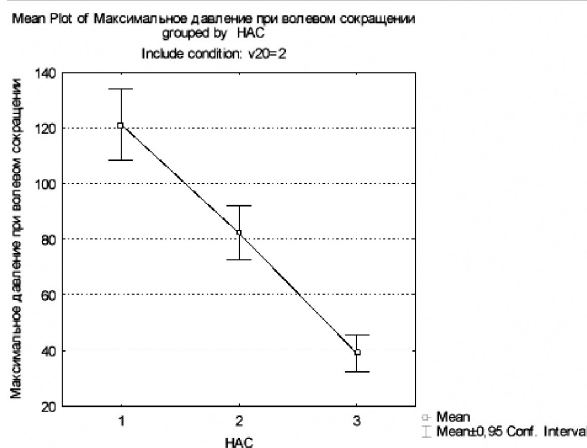
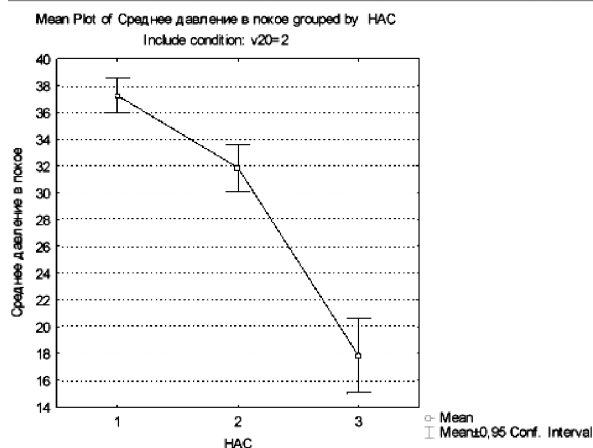
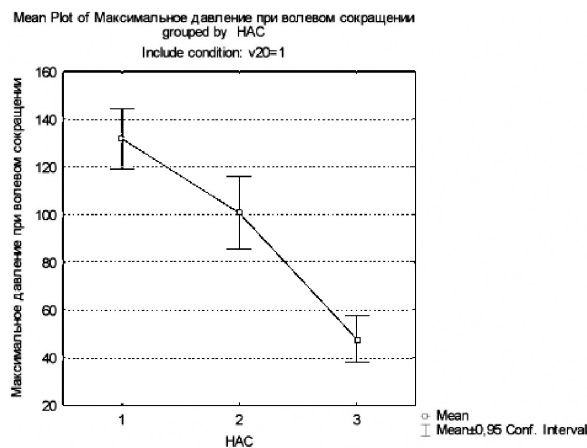
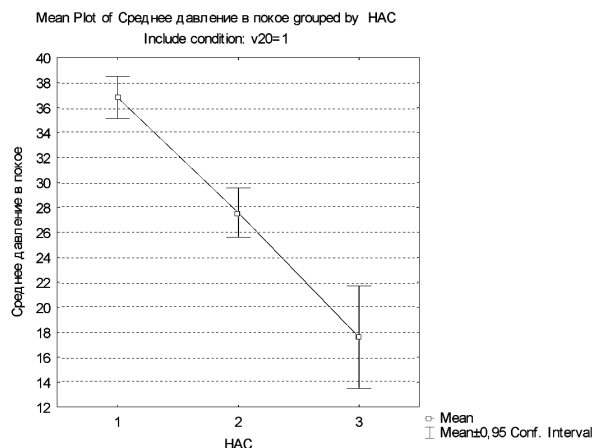


Рис. 3. Графики средних и ошибок величин среднего давления в анальном канале в покое в зависимости от степени НАС (слева мужчины, справа женщины).

Рис. 4. Графики средних и ошибок величин максимального давления при волевом сокращении в анальном канале в зависимости от степени НАС (слева мужчины, справа женщины).

Таблица 4

Параметры утомляемости (2*) наружного сфинктера при различных степенях НАС

Степень НАС	Площадь под кривой, мм рт.ст. · с	
	Мужчины	Женщины
Норма	367–873	220–682
I (n = 109)	833–1168	560–818
II (n = 63)	532–1083	324–521
III (n = 26)	175–469	158–310

Важно подчеркнуть, что в процессе работы был отмечен интересный факт при качественной оценке кривых утомляемости. Здоровые добровольцы были в состоянии удерживать произвольное сокращение в течение 20 с, и была рассчитана площадь под кривой в течение этого времени в качестве одного из параметров утомляемости в норме. У пациентов с недостаточностью анального сфинктера в ряде случаев мы видели дополнительные попытки поджатия жома заднего прохода. Были ли они связаны с невозмож-

стью удерживать сокращение в течение 20 с или неправильным выполнением пациентом теста на сегодняшний день сказать сложно. Мы рассчитали площадь под кривой для пациентов с различными степенями НАС, получили статистически значимые различия между степенями НАС, но не выявили отличий от нормальных величин (табл. 4, рис. 6).

Как видно из табл. 4, как для мужчин, так и для женщин отсутствуют значимые отличия рассматриваемого показателя от нормальных величин, при этом для

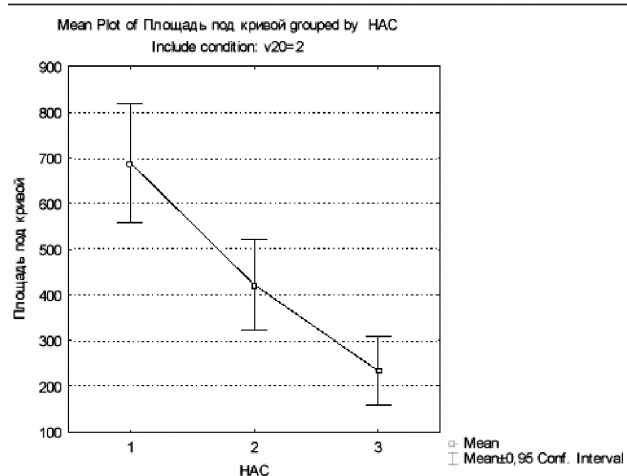
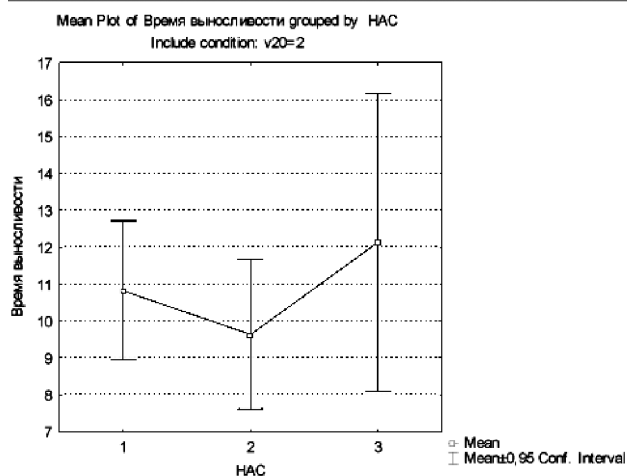
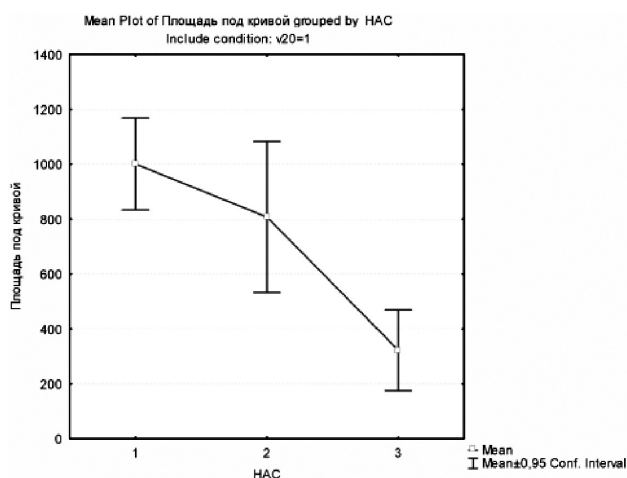
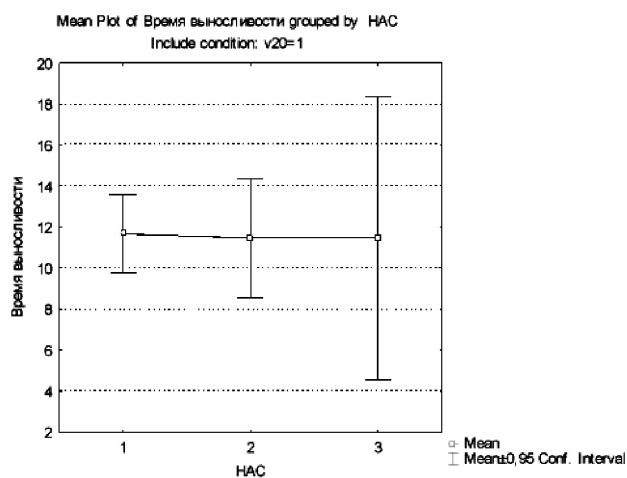


Рис. 5. Графики средних и ошибок величин падения давления на 50% от максимального в зависимости от степени НАС (слева мужчины, справа женщины).

Рис. 6. Графики средних и ошибок площади под кривой в зависимости от степени НАС (слева мужчины, справа женщины).

мужчин отсутствуют статистически значимые различия показателя между I и II степенями НАС, а вот между I и III, II и III имеются значимые различия; для женщин — имеются статистически значимые различия между I и II, между I и III, и между II и III степенями НАС.

Однако мы с осторожностью относимся к расчету данного показателя в клинической практике, и будем продолжать набор материала с максимальным акцентированием (врачом пациенту) на правильность выполнения теста сжатия в течение 20 с.

Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование позволило определить нормативные показатели теста на выносливость. При этом не было выявлено корреляции между степенью недостаточности анального сфинктера (по показателям давления в анальном канале) и параметром утомляемости (временем падения давления на 50%). Гипотетически это можно объяснить тем, что у всех обследуемых пациентов недостаточность анального сфинктера носила посттравматический характер, т.е. страдали количественные характеристики анального сфинктера, а не качественные. По нашему мнению, показатели утомляемости в первую очередь могут меняться у пациентов с функциональной НАС, так как у данной категории больных имеются нарушения нервной регуляции мышц тазового дна и анальных сфинктеров.

Исследование будет продолжено, так как, параметры мышечной утомляемости могут помочь определению истинного характера недостаточности анального сфинктера (миогенная или нейрогенная, органическая или функциональная) и, следовательно, способствовать выбору тактики лечения.

Сведения об авторах:

Шельгин Ю.А., член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф., директор ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России, зав. каф. колопроктологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Порядин Г.В., член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Титов А.Ю., доктор мед. наук, руководитель отделения общей и реконструктивной колопроктологии ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России

Берсенева Е.А., доктор мед. наук, ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России

Мудров А.А., канд. мед. наук, науч. сотр. отделения общей и реконструктивной колопроктологии ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России, ассистент каф. колопроктологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Белюсова С.В., канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клинической патофизиологии ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России

References

1. Telford K.J., Ali A.S., Lymer K., Hosker G.L., Kiff E.S., Hill J. Fatigability of the external anal sphincter in anal incontinence. *Dis Colon Rectum*. 2004; 47: 746-52.
2. Parks A.G., Porter N.H., Melzak J. Experimental study of the reflex mechanism controlling the muscles of the pelvic floor. *Dis Colon Rectum*. 1962; 5: 407-14.
3. Read M.G., Read N.W. Role of anorectal sensation in preserving continence. *Gut*. 1982; 23: 345-7.
4. Marcello P.W., Barrett R.C., Collier J.A. et al. Fatigue rate index (FRI) as a new measurement of external sphincter function. *Dis Colon Rectum*. 1998; 41: 336-43.
5. Nockolds C.L., Hosker G.L., Kiff S. Warrell Fatigue rate of the external anal sphincter. *Colorectal Disease*. 2011; 14: 1095-100.
6. Schabrun M.S., Stafford E.R., Hodges W.P. Anal Sphincter Fatigue: Is the Mechanism Peripheral or Central? *Neurourology and Urodynamics*. 2011; 999: 1-7.
7. McKenzie D.K., Biglandrichie B., Gorman R.B., Gandevia S.C. Central and peripheral fatigue of human diaphragm and limb muscles assessed by twitch interpolation. *J Physiol — London*. 1992; 454: 643-56.
8. Carrington E.V., Brokjer A., Craven H., Zarate N., Horrocks E.J., Palit S. et al. Traditional measures of normal anal sphincter function using high resolution anorectal manometry (HRAM) in 115 healthy volunteers. *Neurogastroenterol Motil*. 2014; 26(5): 625-35.
9. Komissarov I.A., Kolesnikova N.G., Glushkova V.A. Treatment of anal incontinence in children with the help of plastic gel. *Coloproctologiya*. 2013; 2 (44): 50-3. (in Russian)
10. Ilkanich A.Ya., Slepых N.V., Barbashinov V.A., Abubakirov A.S. The experience of anal swabs «koloplast» in patients with anal incontinence. *Coloproctologiya*. 2013; 4 (46): 35-7. (in Russian)
11. Fomenko O.Yu., Titov A.Yu., Biryukov O.M., Mudrov A.A., Belousova S.V., Egorova D.V. Diagnosis and conservative treatment of functional disorders of defecation. *Coloproctologiya*. 2016; 3 (57): 48-54. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2017
УДК [615.46.014.47:615.28]:546.26

Долгих В.Т.¹, Пьянова Л.Г.², Долгих Т.И.¹, Лихолобов В.А.²,
Корпачева О.В.¹, Седанова А.В.², Золотов А.Н.¹, Таран Н.И.¹

Антибактериальная активность гранулированных углеродных сорбентов

¹ ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», 644099, г. Омск, Россия, ул. Ленина, д. 12

² ФАНО «Институт проблем переработки углеводородов» СО РАН, 644040, г. Омск, Россия, ул. Нефтезаводская, д. 54

Цель исследования — изучение антибактериальной активности гранулированных углеродных сорбентов по отношению к патогенной микрофлоре в условиях различной продолжительности контакта с сорбентом. **Методика.** Исследовали антибактериальные свойства гранулированного сорбента ВНИИТУ-1, обработанного гидромеханически, окисленного и стабилизированного до нормативных значений рН и модифицированного поли-N-винилпирролидоном (ПВП) ВНИИТУ-1 по отношению к патогенным микроорганизмам: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, а также к их смесям. Все микроорганизмы представляли собой клинические штаммы, выделенные из ран пациентов. Предварительно тест-микроорганизмы были исследованы на чувствительность к современным антибиотикам. Опытным путем подбирали такие разведения и количество засеваемого материала, чтобы выросшие на чашке Петри колонии можно было сосчитать. Бактерии сорбировали из физиологического раствора с концентрацией микробных клеток 3×10^3 колониеобразующих единиц в 1 мл исследуемой пробы (КОЕ/мл). В пробирку типа Эпшендорф вносили сорбент в количестве 0,5 мл, добавляли 1 мл микробной взвеси, встряхивали для удаления пузырьков воздуха и выдерживали в термостате в течение 1, 3, 6 и 24 ч. По истечении заданного времени контакта сорбента с патогенной микрофлорой отбирали надосадочную жидкость в объеме 100 мкл, засевали на стерильные агаровые пластины чашек Петри с питательной средой ГМФ-агар. Засеянные чашки Петри помещали в CO₂-инкубатор 15АС (Япония) вверх дном и инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. При подсчете колоний, выросших на чашке Петри, учитывали только те чашки, на которых выросло более 300 изолированных колоний. **Результаты.** Гранулированный сорбент ВНИИТУ-1 обладает антибактериальным действием в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, а также их смеси. Сроки проявления антибактериального эффекта сорбента зависят от вида микроорганизмов и времени их контакта с образцом. Присутствие в составе сорбента модификатора ПВП усиливает его антибактериальные свойства. Полимермодифицированный образец обладает пролонгированным антибактериальным эффектом в отношении широкого спектра микроорганизмов (*E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* и *St. aureus*) и смеси их культур. **Заключение.** Показана возможность повышения антибактериальных свойств гранулированных углеродных сорбентов по отношению к патогенной микрофлоре путем их модификации поли-N-винилпирролидоном. Дальнейшая разработка и применение углеродных сорбентов как средств сорбционной терапии является перспективным подходом к местному лечению гнойных ран.

Ключевые слова: углеродные сорбенты гранулированные, раневая инфекция, стендовые микробиологические испытания, антибактериальная активность.

Для цитирования: Долгих В.Т., Пьянова Л.Г., Долгих Т.И., Лихолобов В.А., Корпачева О.В., Седанова А.В., Золотов А.Н., Таран Н.И. Антибактериальная активность гранулированных углеродных сорбентов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61 (3): 76–82.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.76-82

Для корреспонденции: Долгих Владимир Терентьевич, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. патофизиологии, клинической патофизиологии, e-mail: prof_dolgh@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.10.2016

Dolgikh V.T.¹, Pjanova L.G.², Dolgikh T.I.¹, Licholobov V.A.²,
Korpacheva O.V.¹, Sedanova A.V.², Zolotov A.N.¹, Taran N.I.¹

Antibacterial activity of granulated carbon sorbents

¹ Omsk State Medical University, Ministry of Public Health; 12, ul. Lenina, Omsk, 644099, Russia

² Institute for Hydrocarbon Processing, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 54, ul. Neftzavodskaja, Omsk, 644040, Russia

The purpose: Study the antibacterial activity of granulated carbon sorbents in relation to the pathogenic microflora under the conditions of different period of contact with sorbent. **Methods.** It has been investigated the antibacterial properties

of VNIITU-1 granulated sorbent, which was hydromechanically treated, oxidized and stabilized up to pH standard parameters and VNIITU-1 modified poly-N-vinylpyrrolidone (PVP) against the pathogenic micro-organisms, including *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, and their mixes. All bacteria were clinical strains derived from the wounds of patients. Dilutions and amount of inoculated material were experimentally selected for further calculation of the grown colonies on the Petri dish. Bacteria were sorbed from the saline solution with bacteria concentration of 3×10^3 of the colony forming units in 1 ml of test sample (CFU/ml). Eppendorf tube was added the sorbent 0.5 ml and bacterial suspension 1 ml; then the tube was shaken to remove the air bubbles and incubated for 1, 3, 6 and 24 hr. Upon the expiry of the target time for sorbent with pathogenic flora contact the supernatant fluid was collected in 100 μ l and inoculated on the sterile agar plates of the Petri dishes with GMF agar nutrient medium. Inoculated Petri dishes were placed upside down in CO₂ incubator 15AC (Japan) and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hours. When counting the colonies growing on the Petri dish, they took into consideration only the dishes where more than 300 isolated colonies were grown. If more than 300 colonies were grown, « $> 3 \times 10^2$ CFU/ml» was recorded in the protocol. **Results.** Granulated sorbent VNIITU-1 has an antibacterial effect against both gram-positive and gram-negative bacteria, and their mixes. Time period for manifestations of the sorbent antibacterial effect depends on the type of microorganisms and time of contact. PVP presence in sorbent composition enhances the antibacterial effect of the sorbent. Resin-modified sample has a prolonged antibacterial effect against a broad spectrum of microorganisms (*E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* and *St. aureus*) and mixtures of their cultures. **Conclusion.** It has been determined the possibility for increasing of antibacterial properties of granulated carbon sorbents against the pathogenic microflora by their modification with poly-N-vinylpyrrolidone. Further development and application of carbon sorbents as the means for sorption therapy is a perspective approach for the local treatment of purulent wounds.

Keywords: granulated carbon sorbents; wound infection; bench microbiological tests; antibacterial activity.

For citation: Dolgikh V.T., Pjanova L.G., Dolgikh T.I., Licholobov V.A., Korpacheva O.V., Sedanova A.V., Zolotov A.N., Taran N.I. Antibacterial activity of granulated carbon sorbents. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61(3): 76–82. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.76-82*

For correspondence: Vladimir T. Dolgikh, MD, PhD Dsc in Medicine, Honoured Scientist of the Russian Federation, Head of Department of the Pathophysiology, Clinical Pathophysiology of Omsk State Medical University; e-mail: prof_dolgih@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

The transparency of the study. The research had no sponsorship. Researchers nest responsibility for providing the final version of the manuscript in print.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Dolgikh V.T., <http://orcid.org/0000-0001-9034-4912>
Pjanova L.G., <http://orcid.org/0000-0002-6702-0878>
Dolgikh T.I., <http://orcid.org/0000-0001-6005-966X>
Likholobov V.A., <http://orcid.org/0000-0002-6433-6756>
Korpacheva O.V., <http://orcid.org/0000-0001-6110-3933>
Sedanova A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1832-253X>
Zolotov A.N., <http://orcid.org/0000-0002-6775-323X>
Taran N.I., <http://orcid.org/0000-0001-8321-6314>

Received 25.10.2016

Введение

В основе лечения больных с раневой инфекцией лежит этиотропная терапия. Однако применение антибактериальных препаратов обладает рядом нежелательных эффектов, увеличивает число антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, нарушает микробиоценоз [1—3]. В связи с этим лечение больных с раневой инфекцией и тяжелыми гнойно-септическими заболеваниями бактериальной природы требует поиска новых подходов и препаратов, отличающиеся по механизму действия от антибиотиков, а значит, лишенных их недостатков, и обладающих в то же

время высокой антибактериальной активностью. Одним из приоритетных направлений лечения больных с раневой инфекцией является сорбционная терапия, в частности аппликационная сорбция (вulnerable сорбция) [4, 5].

Перспективным методом создания материалов с антибактериальными свойствами представляется их модификация с помощью веществ, обладающих дезинтоксикационными и антимикробными свойствами. С этой целью используют биосовместимые полимеры, в частности низкомолекулярный поли-N-винилпирролидон (ПВП) медицинского назначения. Этот

полимер нетоксичен, хорошо растворим в воде и биологических жидкостях, обладает дезинтоксикационными, антибактериальными и антисептическими свойствами [6].

В Институте проблем переработки углеводов СО РАН на основе нанодисперсного углерода создан гранулированный с мезопористой структурой сорбент медицинского назначения ВНИИТУ-1, обладающий высокой химической чистотой, практически полным отсутствием пылевидных частиц на поверхности и в порах и высокой совместимостью с биологическими жидкостями [7]. Свойства ВНИИТУ-1 дают основания предполагать наличие у него антибактериальной активности. Подтверждение этого предположения позволит разрабатывать на его основе сорбенты медицинского назначения — средства сорбционной терапии для местного лечения больных гнойно-септическими заболеваниями бактериальной природы.

Цель исследования — изучение антибактериальной активности гранулированных углеродных сорбентов по отношению к патогенной микрофлоре в условиях различной продолжительности контакта с сорбентом.

Методика

Исследовали антибактериальные свойства гранулированного сорбента ВНИИТУ-1, обработанного гидромеханически, окисленного и стабилизированного до нормативных значений рН (образец I) и модифицированного поли-N-винилпирролидоном (ПВП) ВНИИТУ-1 (образец II) по отношению к патогенным микроорганизмам: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, а также к их смесям. Смесь I — *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, смесь II — *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Все микроорганизмы представляли собой клинические штаммы, выделенные из ран пациентов. Идентификацию бактерий проводили на тест-системах производства PLIVA (Lachema Diagnostica, Чехия) в компьютерной программе «МИКРОБ Автомат». Предварительно тест-микроорганизмы были исследованы на чувствительность к современным ан-

тибиотикам (диски с антибиотиками компании Becton Dickinson and Company, USA, производство Ireland Benex Limited).

Опытным путем подбирали такие разведения и количество засеваемого материала, чтобы выросшие на чашке Петри колонии можно было сосчитать. Контролем служили посеvy рабочих разведений испытуемых культур. Концентрацию микробных клеток определяли на приборе для исследования мутности суспензий *Densi-La-Meter* (PLIVA-Lachema, Италия). Исследуемые смеси испытуемых культур готовили смешиванием равных объемов приготовленных рабочих концентраций микробных клеток последующим перемешиванием на вортекс-встряхивателе. Бактерии сорбировали из физиологического раствора с концентрацией микробных клеток 3×10^3 колониеобразующих единиц в 1 мл исследуемой пробы (КОЕ/мл). В пробирку типа Эппендорф вносили сорбент в количестве 0,5 мл, добавляли 1 мл микробной взвеси, встряхивали для удаления пузырьков воздуха и выдерживали в термостате в течение 1, 3, 6 и 24 ч. Все работы проводили в ламинарном боксе БОВ-001-АМС.

По истечении заданного времени контакта сорбента с микрофлорой отбирали надосадочную жидкость в объеме 100 мкл, засевали на стерильные агаровые пластины чашек Петри с питательной средой ГМФ-агар (ЗАО НИЦФ, Санкт-Петербург). По истечении 1 ч контакта микрофлоры с сорбентом перед отбором надосадочной жидкости суспензии в пробирках перемешивали. Засеянные чашки Петри помещали в CO₂-инкубатор 15АС (Япония) вверх дном и инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. При подсчете колоний, выросших на чашке Петри, учитывали только те чашки, на которых выросло более 300 изолированных колоний. Если выросло более 300 колоний, то в протоколе отмечали « $>3 \times 10^2$ КОЕ/мл». Количество колоний на чашках двух параллельных испытаний суммировали и рассчитывали средний результат. Полученный результат выражали в КОЕ/мл. Если подсчет колоний на чашках оказывался невозможным, то в протоколе отмечали «сливной рост». Если количество колоний было сопоставимо и больше по сравнению с контролем, то в протоколе отмечали «сопоставим с контролем» или «выше, чем в контроле» соответственно.

Таблица

Антибактериальные свойства образцов по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам

Образцы сорбента	Контроль	Время контакта с сорбентом, ч				Контроль	Время контакта с сорбентом, ч			
		1	3	6	24		1	3	6	24
		Staphylococcus aureus, число колоний				Streptococcus agalactiae, число колоний				
I	10 ³	10 ³	>3 × 10 ²	>3 × 10 ²	2 × 10 ²	10 ³	10 ³	20	20	20
II	10 ³	10 ³	10 ³	>3 × 10 ²	0	10 ³	0	0	0	0

Результаты и обсуждение

Результаты испытаний антибактериальных свойств углеродных сорбентов по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам представлены в таблице и на рис. 1.

На снимках чашки Петри расположены по возрасту времени контакта сорбента с патогенной микрофлорой после контрольного посева (обозначен как «контроль»).

Представленные данные свидетельствуют о том, что образцы углеродного сорбента I и II обладают антибактериальным действием в отношении грамположительных бактерий. Сроки проявления антибактериального эффекта сорбентов зависят от вида микроорганизмов, времени их контакта с образцом и присутствия в составе сорбента модификатора ПВП. Так, антибактериальный эффект образца I в отношении *St. aureus* регистрируется уже после 3 ч контакта с сорбентом, а для проявления антибактериального эффекта образца II требуется продолжительность контакта не менее 6 ч. Через 24 ч после контакта образца II с тест-микроорганизмами *St. aureus* полностью подавля-

ется их рост. В отношении *St. agalactiae* оба образца оказались более эффективными: образец I подавляет рост тест-микроорганизмов по истечении 3 ч контакта, а образец II — уже через 1 ч воздействия (рис. 1).

Таким образом, стендовыми микробиологическими исследованиями установлено, что гранулированный углеродный сорбент ВНИИТУ-1 обладает антибактериальной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов. Присутствие в структуре сорбента модификатора поли-N-винилпирролидона усиливает его антибактериальный эффект.

При исследовании антибактериальных свойств образца I по отношению к смеси тест-микроорганизмов установлено (рис. 2), что при контакте со смесью культур № 1 (*E. coli* и *St. aureus*) наблюдается постепенное снижение роста колоний грамположительных бактерий *S. Aureus* по истечении 6 ч контакта. При контакте со смесью культур № 2 (*P. aeruginosa* и *St. aureus*) отмечается небольшое снижение роста колоний для *P. aeruginosa* по истечении 6 ч контакта. По истечении 24 ч контакта отмечен «скудный рост» патогенной микрофлоры обеих смесей тест-микроорганизмов (№ 1 и № 2).

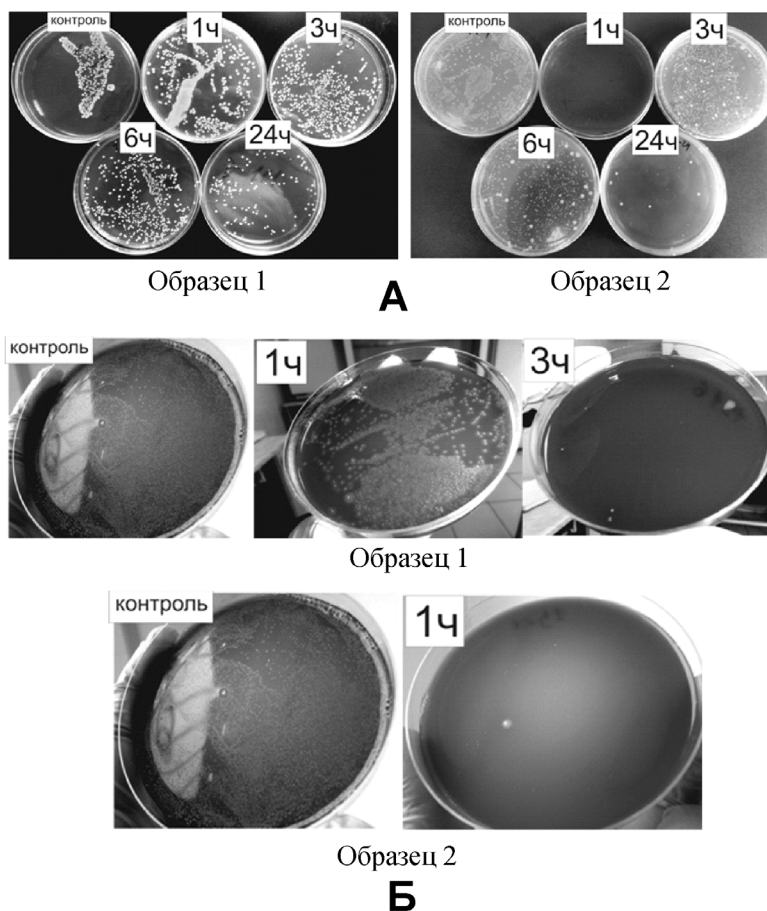


Рис. 1. Результаты исследования антибактериальных свойств образцов по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам *S. aureus* (А) и *S. agalactiae* (Б).

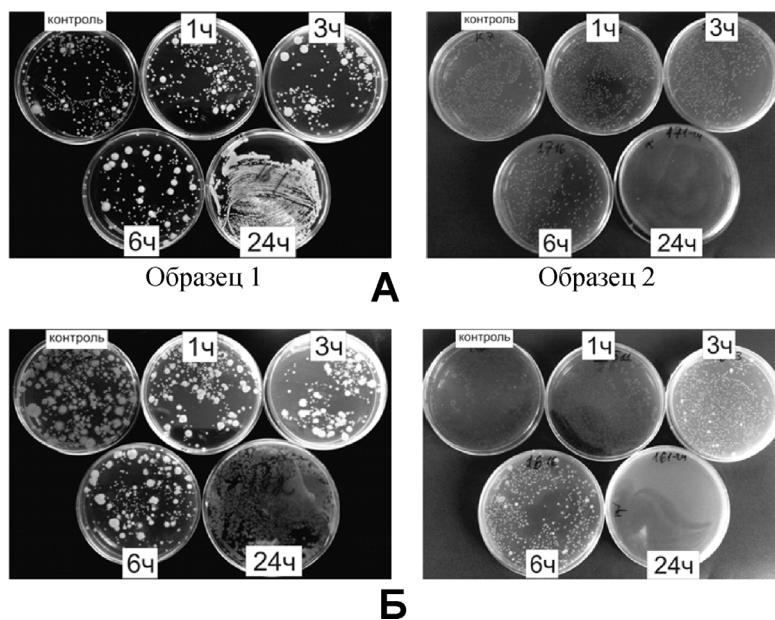


Рис. 2. Результаты исследования антибактериальных свойств образцов по отношению к смеси культур *E. coli* и *S. aureus* (А) и *P. aeruginosa* и *S. aureus* (Б).

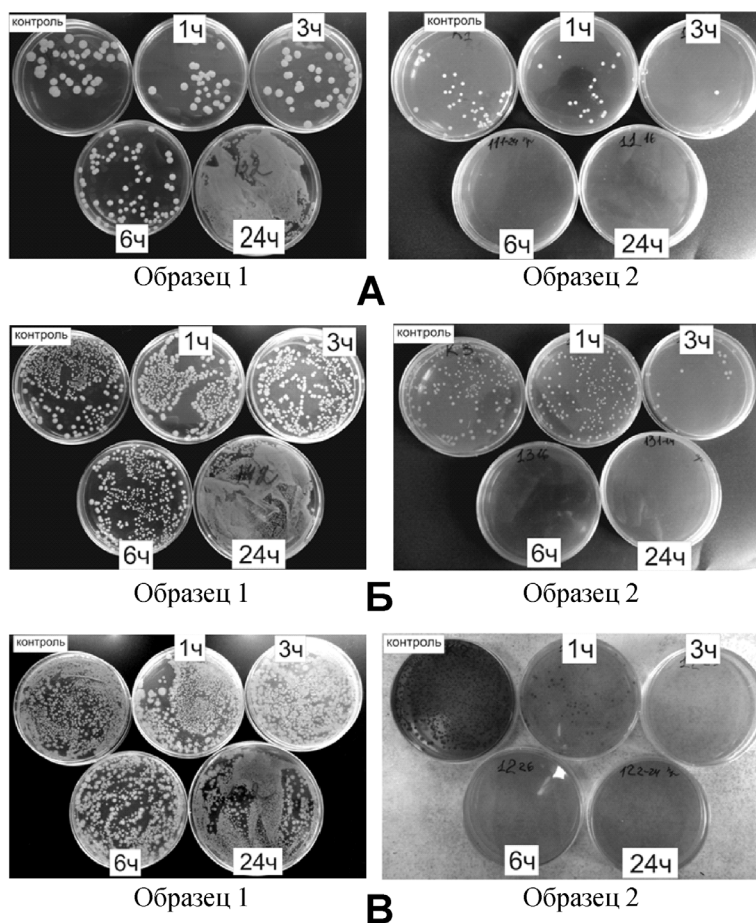


Рис. 3. Результаты исследования антибактериальных свойств образцов по отношению к грамотрицательным тест-микроорганизмам *K. pneumonia* (А), *E. coli* (Б) и *P. aeruginosa* (В).

При исследовании антибактериальных свойств образца II выявлена его выраженная антибактериальная активность по отношению к грамотрицательной микрофлоре: рост колоний тест-микроорганизмов *E. coli* отсутствовал по истечении 6 ч контакта с сорбентом, а рост *K. pneumonia* и *P. aeruginosa* прекращается уже по истечении 3 ч контакта (рис. 3). Таким образом, эффективность модифицированного образца II по отношению к грамотрицательным микроорганизмам можно расположить в ряду следующим образом: *K. pneumonia* > *P. aeruginosa* > *E. coli*.

Изучение антибактериальных свойств образца II по отношению к смеси тест-микроорганизмов подтвердило его высокую антибактериальную активность (рис. 3). Так по истечении 1-го ч контакта сорбента с микрофлорой постепенно снижается рост колоний *E. coli* (смесь культур № 1) *P. aeruginosa* (смесь культур № 2). Рост культуры *St. aureus* в составе смеси не изменяется в течение первых 6 ч контакта с сорбентом. По истечении 24 ч контакта сорбента с патогенной микрофлорой зарегистрировано отсутствие роста тест-микроорганизмов в обеих смесях культур.

Повышение антибактериальных свойств модифицированного сорбента II можно объяснить введением в его состав ПВП, который на 5—15% усиливает его антибактериальные свойства [7, 8]. Антибактериальные свойства ПВП обусловлены его строением и наличием в его структуре лактамного кольца. Бактериальные клетки взаимодействуют с атомом азота пирролидоновых циклов ПВП. Благодаря наличию гидрофобной полимерной цепи и гидрофильных карбонильных групп в структуре ПВП возможно физическое связывание бактериальных клеток с полимерной матрицей (адгезия). Кроме того, связывание может быть обусловлено кулоновским взаимодействием отрицательно заряженной мембраны бактериальной клетки и положительно заряженным протонированным атомом азота в макромолекуле полимера.

Примечательно, что ПВП и β -лактамы антибиотиков имеют схожее строение. По соответствующей классификации ПВП относится к γ -лактамам. Можно предположить, что полимермодифицированный углеродный сорбент (образец II) действует в отношении патогенной микрофлоры подобно β -лактамам антибиотикам, проявляя бактерицидные свойства.

Известно, что бактерии постепенно вырабатывают устойчивость к β -лактамам антибиотикам за счет синтеза и действия лактамаз (группа бактериальных ферментов, направленных на борьбу с β -лактамами антибиотиками). В отличие от β -лактамов антибиотиков, γ -лактамное кольцо в ПВП менее доступно для «атак» лактамаз, и количество таких центров в полимере значительно превышает концентрацию ферментов, вырабатываемых бактериями.

Подобранные условия синтеза позволили получить сорбент пролонгированного действия. С течением времени полимер при контакте с биологической средой мигрирует (десорбируется) с сорбента в виде полимерных цепей и способен в данной форме взаимодействовать с бактериальными клетками. Возможность удаления (десорбции, миграции) полимера-модификатора с поверхности образца II доказана проведенными в ИППУ СО РАН исследованиями с использованием физико-химических методов [7, 8]. Сравнение антибактериальных свойств модифицированного образца II и современных антибиотиков показало, что полимермодифицированный образец II не только может служить альтернативой антибиотикам, но и обладает заметным преимуществом перед ними [8].

На основании проведенных исследований показана возможность повышения антибактериальных свойств гранулированных углеродных сорбентов по отношению к патогенной и условно патогенной микрофлоре путем их модификации ПВП. Полимермодифицированный образец обладает антибактериальными свойствами пролонгированного действия по отношению к широкому спектру микроорганизмов (*E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* и *St. aureus*) и к смеси их культур. Дальнейшая разработка и применение углеродных сорбентов как средств сорбционной терапии является перспективным подходом к местному лечению гнойных ран в хирургии, акушерстве и гинекологии, травматологии.

References

1. Glauser M.P., Pizzo P.A. Management of infections in immunocompromised patients. *WB Saunders*. 2000: 473.
2. Schwarz V.Ya. Infection as a obesity pathogenesis factor. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58(2): 94-100. (in Russian)
3. Gordienko A.I., Beloglazov V.A., Kubyshkin A.V. Changes of humoral anti-endotoxin immunity and low-intensity inflammation in diabetes mellitus type 1 and . *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(3): 61-7. (in Russian)
4. Belik E.V., Brykalov A.V., Bostanova F.A., Gryadskikh D.A., Golovkina E.M. Fabrication and study of biologically active organosilica polymer composites used for application sorption. *Fibre Chemistry*. 2008; 40(5): 445-6.
5. Levashov P.A., Afanasieva O.I., Dmitrieva O.A., Klesareva E.V., Adamova I.Yu., Afanasieva M.I. et al. Preparation of affinity sorbents with immobilized synthetic ligands for therapeutic apheresis. *Biochemistry*. 2010; 4(3): 303-7.
6. Baklanova O.N., Pyanova L.G., Talsi V.P., Knyazheva O.F. The surface modification of carbon sorbent poly-N-vinylpyrrolidone for the application of medicine. *Physical khimiya poverkhnosti i zashchita materialov*. 2013; 49(4): 408-17. (in Russian)
7. Pyanova L.G., Baklanova O.N., Likholobov V.A., Drozdov V.A. Research of the effect of surface modification of carbon sorbents poly-N-vinylpyrrolidone complex physical-chemical and microbiological methods. *Fyzikokhimiya poverkhnosti i zashchita materialov*. 2012; 48(4): 363-9. (in Russian)

8. Dolgikh V.T., Pyanova L.G., Barinov S.V., Likhobov V.A., Dolgikh T.I., Ryabchikova E.I. et al. Efficacy of the molded carbon sorbent VNHTU-1 used in obstetric practice. *Obshchaya reanimatologiya*. 2015; 11(4); 61-72. (in Russian)

Сведения об авторах:

Пьянова Лидия Георгиевна, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр. ФАНО «Институт проблем переработки углеводов СО РАН», e-mail: medugli@mail.ru

Долгих Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, проф., руководитель ЦНИЛ ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», e-mail: prof_dolgih@mail.ru;

Лихолобов Владимир Александрович, доктор хим. наук, проф., член-корреспондент РАН, науч. руководитель ФАНО «Институт проблем переработки углеводов СО РАН», e-mail: medugli@mail.ru;

Корпачева Ольга Валентиновна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, клинической патофизиологии ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», e-mail: olgkor@mail.ru;

Седанова Анна Викторовна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. ФАНО «Институт проблем переработки углеводов СО РАН», e-mail: medugli@mail.ru;

Золотов Александр Николаевич, канд. мед. наук, ст. преподаватель каф. патофизиологии, клинической патофизиологии ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», e-mail: azolotov@mail.ru

Таран Наталья Ивановна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, клинической патофизиологии ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», e-mail: aspirantura@omsk-osma.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.155.392+612.017:616.097

Гордиенко Ан.И.¹, Кубышкин А.В.¹, Гордиенко Ал.И.², Кубышкин В.А.¹

Нарушения антиэндотоксиновой защиты у больных лейкозией и миелодиспластическим синдромом

¹ ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского», 295006, г. Симферополь, Россия, бульвар Ленина, д. 5/7

² Институт гематологии и трансфузиологии НАН Украины, 04060, г. Киев, Украина, ул. М. Берлинского, д. 12

Цель исследования — оценка состояния антиэндотоксинового иммунитета у больных лейкозией и миелодиспластическим синдромом. **Методика.** Проведено лабораторное обследование 275 больных, страдающих острой миелоидной лейкозией (ОМЛ, n = 70), хронической миелоидной лейкозией (ХМЛ, n = 75), миелодиспластическим синдромом (хроническая миеломоноцитарная лейкозия — ХММЛ, n = 23; рефрактерная анемия с избытком бластов — РАИБ, n = 18) и В-клеточной хронической лимфоцитарной лейкозией (В-ХЛЛ, n = 71). В контрольную группу вошло 37 здоровых людей, у которых в анамнезе не было каких-либо хронических заболеваний, а на момент обследования отсутствовали клинические проявления острой инфекционной патологии. По полу и возрасту контрольная группа здоровых людей соответствовала указанным выше группам больных. У всех обследованных лиц методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли уровни сывороточных антиэндотоксиновых антител классов А, М и G (анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG). Концентрацию общих иммуноглобулинов классов А, М и G в крови определяли иммунотурбидиметрическим методом. **Результаты.** Установлено, что до начала лечения у больных ХМЛ, ХММЛ, РАИБ и В-ХЛЛ уровни сывороточных анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM были статистически значимо снижены. Исключение составляли лишь данные больных ОМЛ, у которых в первом остром периоде заболевания уровни анти-ЭТ-IgA значимо не отличались от нормальных значений. Вместе с тем уровни сывороточных анти-ЭТ-IgG у больных из указанных групп были либо повышенными (больные ОМЛ в первом остром периоде заболевания, ХМЛ в фазе акселерации и ХММЛ), либо не отличались от нормы (РАИБ и В-ХЛЛ). В стадии клинко-гематологической ремиссии у больных ОМЛ и В-ХЛЛ выявлено статистически значимое возрастание уровней сывороточных анти-ЭТ-антител всех трех классов, тогда как у больных ХМЛ в хронической фазе значимо повышаются только уровни анти-ЭТ-IgM, а содержание анти-ЭТ-антител других классов существенно не меняется. При этом направленность изменений уровней анти-ЭТ-антител чаще всего не совпадает с тенденцией изменений концентрации в крови общих иммуноглобулинов этих же классов, а какие-либо значимые корреляции между этими показателями не обнаружены. **Заключение.** Нарушения гуморального антиэндотоксинового иммунитета следует учитывать при персонализированном подходе к комплексному лечению и иммунореабилитации больных, страдающих лейкозией и миелодиспластическим синдромом.

Ключевые слова: лейкозия; миелодиспластический синдром; эндотоксин; иммунный ответ; антитела.

Для цитирования: Гордиенко Ан.И., Кубышкин А.В., Гордиенко Ал.И., Кубышкин В.А. Нарушения антиэндотоксиновой защиты у больных лейкозией и миелодиспластическим синдромом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 83–90. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.83-90

Для корреспонденции: Гордиенко Андрей Иванович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., e-mail: uu4jeu@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.10.2016

Gordienko An.I.¹, Kubyshkin V.A.¹, Gordienko Al.I.², Kubyshkin V.A.¹

The humoral immune response to endotoxin in patients with leukemia and myelodysplastic syndrome

¹ «V.I. Vernadsky Crimean Federal University», «Medical Academy named after S.I. Georgievsky», 5/7 Lenin Boulevard, Simferopol, 295006, Russian Federation

² Institute of Hematology and Blood Transfusion NAS of Ukraine, 04060, Kyiv, str. M. Berlin, 12, Ukraine

The purpose. Investigate the antiendotoxin immunity in patients with leukemia and myelodysplastic syndrome. **Methods.** We examined 275 patients with acute myeloid leukemia (AML, n = 70), chronic myelogenous leukemia (CML, n = 75), myelodysplastic syndrome (chronic myelomonocytic leukemia — CMML, n = 23; refractory anemia with excess blasts — RAEB, n = 18) and B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL, n = 71). The control group included 37 healthy people

who have not a history of any chronic disease, and the clinical manifestations of acute diseases were absent at the time of the survey. By sex and age, the control group of healthy people matched to a groups of patients with leukemia and myelodysplastic syndrome. Levels of serum antibody classes A, M and G to endotoxin (anti-ET-IgA, anti-ET-IgM and anti-ET-IgG) were determined by ELISA. The concentration of total immunoglobulin classes A, M and G in the blood was determined by immuno turbidimetry. **Results.** It was found that before treatment in patients with CML, CMML, RAEB and B-CLL levels of serum anti-ET-IgA and anti-ET-IgM were significantly reduced. The only exceptions were patients with AML in the first acute stage of the disease (AML-AS) levels of anti-ET-IgA were not significantly different from the normal values. However, the levels of serum anti-ET-IgG in patients of these groups were either significantly higher (patients with AML-AS, CML in accelerated phase and CMML), or not different from the normal values (patients with RAEB and B-CLL). Under clinical remission in patients with AML and CLL showed a significant increase in the levels of serum anti-ET antibodies of all classes, while in patients with CML in chronic phase alone significantly increased levels of anti-ET-IgM, and the content of the anti-ET antibodies other classes were not significantly changed. The direction of changes in the levels of anti-LPS antibodies often do not coincide with the trend of changes in the concentration of immunoglobulins in the blood of the same classes. Any significant correlations between these parameters are not found. **Conclusion.** The results should be considered in a personalized approach to treatment and immunorehabilitation patients with these diseases.

Keywords: leukemia; myelodysplastic syndrome; endotoxin; immune response; antibodies.

For citation: Gordienko An.I., Kubyshkin V.A., Gordienko Al.I., Kubyshkin V.A. The humoral immune response to endotoxin in patients with leukemia and myelodysplastic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 83–90. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.83-90

For correspondence: Andrey I. Gordienko, Ph.D (Biological Sciences), Senior Researcher; «V.I. Vernadsky Crimean Federal University», «Medical Academy named after S.I. Georgievsky», 5/7 Lenin Boulevard, Simferopol, 295006, Russian Federation, e-mail: uu4jey@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Gordienko An.I., <http://orcid.org/0000-0002-1475-6138>

Kubyskhin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1309-4005>

Gordienko Al.I., orcid.org/0000-0002-6044-117X

Kubyskhin V.A., orcid.org/0000-0002-9400-1826

Received 04.10.2016

Введение

Одной из важных особенностей гемобластозов является формирование у пациентов тяжелого иммунодефицитного состояния, которое развивается в результате угнетения нормальных ростков кроветворения и проявляется глубокими нарушениями как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Полихимиотерапия с применением цитостатических препаратов, оставаясь главным методом лечения гемобластозов, дополнительно негативно влияет на иммунную систему больных [1, 2]. Кроме того, полихимиотерапия часто сопровождается развитием гастроэнтерологических расстройств [3 — 5]. Обусловленное этим нарушение структурно-функциональной целостности кишечного барьера ведет к усилению транслокации различных бактериальных продуктов, включая эндотоксин, из дистальных отделов желудочно-кишечного тракта в порталный и системный кровотоки [6, 7]. Если концентрация кишечного эндотоксина в крови превысит физиологически допустимые значения, возможна инициация эндотоксиновой агрессии. В настоящее время эндотоксиновая агрессия рассматривается в качестве облигатного универсального

фактора, патогенетическая роль которого верифицирована для широкого круга заболеваний и синдромов [8].

В нейтрализации биологической активности и клиренсе эндотоксина, попадающего во внутреннюю среду организма, значительное место принадлежит иммунным механизмам, реализуемым при участии специфических антител [9—11]. В связи с этим нарушения адаптивного иммунного ответа на эндотоксин энтеробактерий у больных гемобластозами могут стать причиной эндотоксиновой агрессии, клиническая манифестация которой ухудшает прогноз заболевания и снижает качество жизни пациентов [8, 12].

Цель работы — сравнительная характеристика гуморального иммунного ответа на эндотоксин энтеробактерий у больных, страдающих острой миелоидной лейкемией, хронической миелоидной лейкемией, миелодиспластическим синдромом (хроническая миеломоноцитарная лейкемия и рефрактерная анемия с избытком бластов) и В-клеточной хронической лимфоцитарной лейкемией.

Методика

В обследуемую группу были включены 44 больных хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ) в фазе акселерации до начала лечения (25 мужчин и 19 женщин, средний возраст $47,1 \pm 2,2$ года); больные миелодиспластическим синдромом до начала лечения — 23 пациента с хронической миеломоноцитарной лейкемией (ХММЛ, 10 мужчин и 13 женщин, средний возраст $58,6 \pm 2,5$ года); 18 пациентов с рефрактерной анемией с избытком бластов (РАИБ, 7 мужчин и 11 женщин, средний возраст $59,0 \pm 2,6$ года); 41 больной В-клеточной хронической лимфоцитарной лейкемией (В-ХЛЛ) до начала лечения (23 мужчины и 18 женщин, средний возраст $52,7 \pm 1,9$ года); 49 больных острой миелоидной лейкемией (ОМЛ) в первом остром периоде до начала лечения (27 мужчин и 22 женщины, средний возраст $56,3 \pm 2,5$ года).

В эту же группу включен 21 больной с острой миелоидной лейкемией (ОМЛ), в стадии клинко-гематологической ремиссии (11 мужчин и 10 женщин, средний возраст $55,2 \pm 2,2$ года) после полихимиотерапии по схеме «7+3» (цитарабин 100 мг/м^2 в сут. 1—7-й день внутривенно, дважды в сутки в виде 1-часовой инфузии; или дважды в сутки через 12 ч подкожно; доксорубин в 1—3-и сут. в виде внутривенных 30-минутных инфузий; 1—2 курса до достижения ремиссии); 31 больной ХМЛ в хронической фазе (17 мужчин и 14 женщин, средний возраст $45,7 \pm 2,6$ года) после химиотерапии гидроксимочевой (гидроксимочевина на протяжении 2—4 нед. перорально $30—50 \text{ мг/кг}$ массы тела под контролем количества лейкоцитов в крови); 30 больных В-ХЛЛ, находящиеся в ремиссии (18 мужчин и 12 женщин, средний возраст $53,4 \pm 1,8$ года) после полихимиотерапии по схеме FC (флюдарабин 25 мг/м^2 и циклофосфан 300 мг/м^2 внутривенно в течение 3 сут., курсы проводились каждые 4 нед., количество курсов от 2 до 6).

Все больные находились на стационарном лечении в гематологическом отделении заболеваний системы крови № 1 ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины» (г. Киев). Верификация диагноза проводилась согласно критериям FАВ (French-American-British) на основании результатов клинических, морфологических и иммуноцитологических исследований. Контрольную группу составили 37 условно здоровых людей, которые по полу и возрасту соответствовали указанным группам больных (19 мужчин и 18 женщин, средний возраст $54,8 \pm 1,9$ года). Материалом для исследований служила сыворотка венозной крови, которую получали общепринятым способом и хранили при -25°C . Уровни сывороточных антиэндотоксиновых антител классов А, М и G (соответственно анти-ЭТ-IgA, ан-

ти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа [13]. В качестве антигена использовали липополисахарид *Escherichia coli* K30, который был получен из бактериальной биомассы методом водно-фенольного экстрагирования [14]. Концентрацию общих иммуноглобулинов классов А, М и G в крови определяли микротурбидиметрическим методом [15].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., USA). Статистическую значимость различий между одноименными показателями в независимых выборках (указанные выше группы больных и контрольная группа) оценивали с помощью непараметрического U-критерия Mann—Whitney. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. В качестве непараметрического критерия, характеризующего наличие и силу взаимосвязей между изучаемыми параметрами, использовали коэффициент ранговой корреляции К. Спирмена.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1 и 2. Установлено, что у больных ОМЛ в первом остром периоде заболевания до начала лечения на фоне практически нормального содержания сывороточных анти-ЭТ-IgA уровни анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG в крови были в 1,68 раза ниже и в 1,76 раза выше, чем у здоровых людей соответственно. В то же время у больных ОМЛ в периоде клинко-гематологической ремиссии (ОМЛ-ПР) уровни анти-ЭТ-IgA в среднем статистически значимо не отличались от нормального значения этого показателя, тогда как содержание анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG повышалось в среднем на 39,5 и 71,9% соответственно, в результате чего уровень анти-ЭТ-IgM в среднем уже существенно не отличался от значений этого показателя у здоровых людей, а уровень анти-ЭТ-IgG даже превышал нормальные значения в среднем в 3,03 раза.

Концентрация общих IgA, IgM и IgG в крови больных ОМЛ в первом остром периоде заболевания была статистически значимо выше в среднем на 17,9; 35,7 и 18,7% соответственно по сравнению с концентрацией этих иммуноглобулинов в крови здоровых людей. У больных ОМЛ-ПР отмечено значимое снижение концентрации общих IgA, IgM и IgG в крови по сравнению с острым периодом заболевания в среднем соответственно на 19,8; 30,2 и 18,0%, в результате чего указанные показатели у этих больных статистически значимо не отличались от своих нормальных значений.

Таблица 1

Уровни сывороточных антиэндотоксиновых антител разных классов у больных лейкоемией и миелодиспластическим синдромом (M ± m)

Группа	Антиэндотоксиновые антитела разных классов, усл. ед.		
	IgA	IgM	IgG
ОМЛ, первый острый период, n = 49	0,373 ± 0,032 p>0,05 p1<0,05	0,205 ± 0,024 p<0,05 p1<0,05	0,482 ± 0,033 p<0,01 p1<0,01
ОМЛ-ПР, n = 21	0,463 ± 0,026 p<0,01	0,286 ± 0,042 p>0,05	0,829 ± 0,073 p<0,001
ХМЛ-ФА, n = 44	0,269 ± 0,023 p<0,05 p1>0,05	0,145 ± 0,021 p<0,001 p1<0,01	0,442 ± 0,020 p<0,01 p1>0,05
ХМЛ-ХФ, n = 31	0,301 ± 0,029 p>0,05	0,221 ± 0,035 p<0,01	0,484 ± 0,027 p<0,01
ХММЛ, n = 23	0,195 ± 0,024 p<0,01	0,097 ± 0,018 p<0,001	0,502 ± 0,039 p<0,01
РАИБ, n = 18	0,109 ± 0,017 p<0,001	0,171 ± 0,030 p<0,01	0,320 ± 0,024 p>0,05
В-ХЛЛ, n = 41	0,114 ± 0,015 p<0,001 p1<0,01	0,093 ± 0,010 p<0,001 p1<0,01	0,343 ± 0,031 p>0,05 p1<0,01
В-ХЛЛ-Р, n = 30	0,242 ± 0,026 p<0,05	0,207 ± 0,015 p<0,01	0,680 ± 0,042 p<0,01
Здоровые люди, n = 37	0,371 ± 0,042	0,345 ± 0,035	0,274 ± 0,017

Примечание. Здесь и в табл. 2 статистическая значимость различий обозначена следующим образом:
 p — по сравнению с контрольной группой здоровых людей,
 p1 — по сравнению с одноименной группой больных в периоде ремиссии или хронической фазе.

Таблица 2

Концентрация общих иммуноглобулинов разных классов в крови больных лейкоемией и миелодиспластическим синдромом (M ± m)

Группа	Общие иммуноглобулины, г/л		
	IgA	IgM	IgG
ОМЛ, первый острый период, n = 49	2,63 ± 0,12 p<0,01 p1<0,01	2,32 ± 0,15 p<0,01 p1<0,01	12,49 ± 0,34 p<0,01 p1<0,01
ОМЛ-ПР, n = 21	2,11 ± 0,07 p>0,05	1,62 ± 0,21 p>0,05	10,24 ± 0,20 p>0,05
ХМЛ-ФА, n = 44	2,03 ± 0,14 p>0,05 p1>0,05	2,45 ± 0,12 p<0,01 p1<0,01	9,90 ± 0,07 p<0,05 p1<0,05
ХМЛ-ХФ, n = 31	1,82 ± 0,13 p<0,05	1,40 ± 0,07 p<0,05	10,36 ± 0,24 p>0,05
ХММЛ, n = 23	3,43 ± 0,23 p<0,001	2,57 ± 0,18 p<0,001	13,27 ± 0,29 p<0,001
РАИБ, n = 18	2,45 ± 0,12 p<0,05	2,13 ± 0,11 p<0,01	10,66 ± 0,35 p>0,05
В-ХЛЛ, n = 41	1,44 ± 0,11 p<0,01 p1<0,01	1,23 ± 0,09 p<0,05 p1<0,05	9,51 ± 0,25 p<0,05 p1<0,01
В-ХЛЛ-Р, n = 30	2,17 ± 0,09 p>0,05	1,52 ± 0,04 p<0,05	10,32 ± 0,22 p>0,05
Здоровые люди, n = 37	2,23 ± 0,06	1,71 ± 0,05	10,52 ± 0,23

У больных ХМЛ в фазе акселерации до начала лечения (ХМЛ-ФА) уровни анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM были в среднем соответственно в 1,38 и в 2,38 раза ниже, чем у здоровых людей, тогда как уровни анти-ЭТ-IgG были в среднем в 1,61 раза выше нормальных значений. У больных ХМЛ в хронической фазе (ХМЛ-ХФ) по сравнению с больными ХМЛ-ФА прослеживается тенденция к повышению уровней анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG, а также зарегистрировано статистически значимое увеличение уровней анти-ЭТ-IgM (в среднем на 52,4%). Однако значимых различий между содержанием в крови анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG у больных ХМЛ-ХФ и больных ХМЛ-ФА не обнаружено. В то же время по сравнению со здоровыми людьми у больных ХМЛ-ХФ уровни сывороточных анти-ЭТ-IgM продолжали оставаться сниженными в среднем в 1,56 раза, а уровни анти-ЭТ-IgG — повышенными в среднем в 1,77 раза, тогда как уровни анти-ЭТ-IgA в среднем статистически значимо не отличались от нормальных значений для этого показателя.

Концентрация общего IgA в крови больных ХМЛ-ФА находилась в пределах диапазона нормальных значений. У этих же больных концентрация общего IgG была хотя и незначительно (в среднем на 5,9%), но статистически значимо снижена по сравнению с здоровыми, в то время как концентрация общего IgM — повышена в среднем на 43,3%. По сравнению с больными ХМЛ-ФА у больных ХМЛ-ХФ отмечено статистически значимое увеличение концентрации общего IgG в крови (в среднем на 4,7%), что свидетельствовало о нормализации данного показателя, а также отмечено статистически значимое снижение концентрации общих IgM и IgA (в среднем соответственно на 10,3 и 42,9%). В итоге содержание общих IgM и IgA в крови больных ХМЛ-ХФ стало в среднем соответственно на 18,4 и 18,1% ниже, чем у здоровых людей.

Группу больных миелодиспластическим синдромом составили пациенты, страдающие ХММЛ и РАИБ. Установлено, что у больных ХММЛ уровни сывороточных анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM были в среднем соответственно в 1,90 и в 3,56 раза ниже, чем у здоровых людей, тогда как уровни анти-ЭТ-IgG были в среднем в 1,83 раза выше своего нормального значения. У больных РАИБ также отмечено статистически значимое снижение уровней сывороточных анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM (эти показатели были в среднем соответственно в 3,40 и в 2,02 раза ниже, чем у здоровых людей), в то время как среднее содержание анти-ЭТ-IgG находилось в пределах диапазона нормальных значений для этого показателя.

Что касается состояния В-клеточного звена иммунитета у пациентов с миелодиспластическим синдромом в целом, то следует отметить, что у больных ХММЛ концентрация общих IgA, IgM и IgG была статистически значимо выше (в среднем соответственно на 53,4; 50,3 и 26,1%), чем у здоровых людей. У больных РАИБ содержание общего IgG в крови значимо не отличалось от нормального значения для этого показателя, тогда как концентрация общих IgA и IgM была в среднем на 9,9 и 24,6% выше, чем у здоровых людей.

Больные с В-ХЛЛ также были разделены на 2 клинические группы: пациенты с впервые поставленным диагнозом до лечения (В-ХЛЛ) и пациенты после полихимиотерапии в стадии клинико-гематологической ремиссии (В-ХЛЛ-Р). У больных В-ХЛЛ на фоне практически нормального содержания анти-ЭТ-IgG в крови уровни сывороточных анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM были в среднем соответственно в 3,25 и в 3,71 раза ниже, чем у здоровых людей. По сравнению с больными В-ХЛЛ у больных В-ХЛЛ-Р зарегистрировано почти двукратное статистически значимое возрастание уровней антиэндотоксиновых антител всех 3 классов: уровни анти-ЭТ-IgA увеличились в 2,12 раза, анти-ЭТ-IgM — в 2,23 раза и анти-ЭТ-IgG — в 1,98 раз. Это привело к некоторому нивелированию отрицательного дисбаланса уровней анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM, которые у больных В-ХЛЛ-Р, тем не менее, оставались ниже нормальных значений для этих показателей в 1,53 и в 1,67 раза соответственно. В то же время уровни анти-ЭТ-IgG у больных В-ХЛЛ-Р стали в среднем в 2,48 раза выше, чем у здоровых людей.

У больных В-ХЛЛ концентрация общих IgA, IgM и IgG в крови была статистически значимо ниже, чем у здоровых людей (в среднем соответственно на 35,4; 28,1 и 9,6%). По сравнению с больными В-ХЛЛ у больных В-ХЛЛ-Р зарегистрировано статистически значимое увеличение содержания IgA, IgM и IgG в крови (в среднем соответственно на 50,7; 23,6 и 8,5%). Вследствие этого концентрация общих IgA и IgG в крови этих больных значимо не отличалась от нормальных значений для этих показателей, тогда как концентрация общего IgM оставалась существенно более низкой (в среднем на 11,1%), чем у здоровых людей.

Корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции К. Спирмена показал, что статистически значимые взаимосвязи между уровнями сывороточных антиэндотоксиновых антител разных классов и концентрацией в крови общих иммуноглобулинов этих же классов у больных всех обследованных групп отсутствуют.

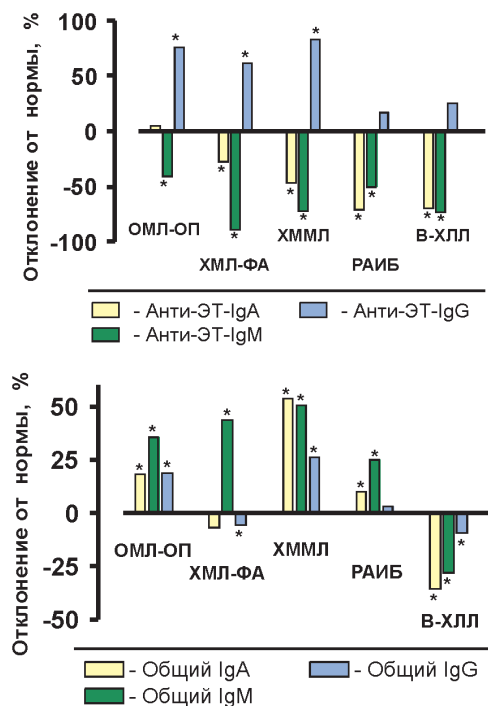


Рис. 1. Дисбаланс уровней сывороточных антиэндотоксиновых антител разных классов и концентрации общих IgA, IgM и IgG в крови у больных лейкемией и миелодиспластическим синдромом до начала лечения. * — отклонения от нормы статистически значимы.

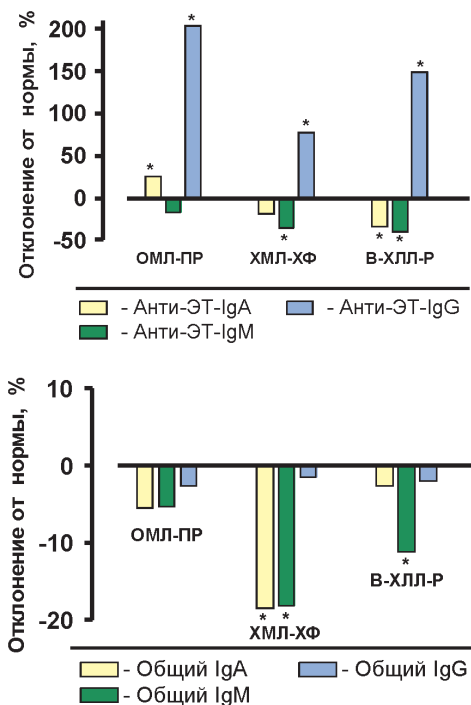


Рис. 2. Дисбаланс уровней сывороточных антиэндотоксиновых антител разных классов и концентрации общих IgA, IgM и IgG в крови у больных ОМЛ и В-ХЛЛ в периоде ремиссии (ОМЛ-ПР и В-ХЛЛ-Р) и у больных ХМЛ в хронической фазе (ХМЛ-ХФ). * — отклонения от нормы статистически значимы.

Итак, в результате проведенных исследований установлено, что у больных с гемобластозами миелоидного (ОМЛ, ХМЛ, ХММЛ и РАИБ) и лимфоидного (В-ХЛЛ) происхождения наблюдается выраженный дисбаланс показателей, характеризующих гуморальный ответ на эндотоксин энтеробактерий. До начала лечения (рис. 1) это проявляется в виде статистически значимого снижения уровней сывороточных анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM. Исключение составляли лишь больные ОМЛ в первом остром периоде заболевания, у которых уровни анти-ЭТ-IgA значительно не отличались от нормальных значений. Вместе с тем, уровни сывороточных анти-ЭТ-IgG у больных указанных групп были либо статистически значимо выше (больные ОМЛ в первом остром периоде заболевания, ХМЛ-ФА и ХММЛ), либо не отличались от нормальных величин этого показателя (больные РАИБ и В-ХЛЛ).

В стадии клинко-гематологической ремиссии у больных ОМЛ и В-ХЛЛ выявлено статистически значимое возрастание уровней сывороточных антиэндотоксиновых антител всех 3 классов, тогда как у больных ХМЛ в хронической фазе статистически значимо повышаются только уровни анти-ЭТ-IgM, а содержание антиэндотоксиновых антител классов А и G существенно не меняется (рис. 2). Вследствие этого дисбаланс по уровням сывороточных анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM несколько выравнивается, тогда как уровень анти-ЭТ-IgG, напротив, еще более усугубляется. По-видимому, наблюдаемая динамика показателей является прямым следствием проведенной полихимиотерапии. С одной стороны, высокодозовая полихимиотерапия из-за побочного негативного воздействия на желудочно-кишечный тракт [14] может способствовать нарушению целостности кишечного барьера, усилению транслокации и попаданию в кровотоки избыточного количества эндотоксина, что повышает уровень антигенной нагрузки организма. С другой стороны, обусловленная полихимиотерапией эрадикация опухолевых клеток оказывает, по-видимому, позитивный эффект на иммунореактивность организма в целом, о чем свидетельствует увеличение продукции антиэндотоксиновых антител разных классов, и в первую очередь, анти-ЭТ-IgG.

Развитие иммунной недостаточности при гемобластозах может сопровождаться снижением концентрации в крови общих иммуноглобулинов разных классов, и в случае параллельного падения уровней антител к облигатным антигенам условно-патогенной микрофлоры считается неблагоприятным фактором. В частности, у таких больных существенно возрастает риск развития инфекционно-воспалительных осложнений, которые относятся к одной из ведущих причин летального исхода при гемобластозах [2, 16—18]. По

данным литературы, после проведения полихимиотерапии у больных гемобластозами наблюдается существенное угнетение всех звеньев иммунного ответа, обеспечивающего противогрибковую резистентность [19], а примерно у 10% пациентов развивается септический шок [1]. С учетом этого можно полагать, что дефицит сывороточных анти-ЭТ-IgM у больных указанных выше групп создает предпосылки не только для инфекционных осложнений, этиологическим фактором которых являются условно-патогенные энтеробактерии, но и для эндотоксиновой агрессии, обусловленной транслокацией эндотоксина из дистальных отделов желудочно-кишечного тракта. При этом крайним и наиболее неблагоприятным проявлением эндотоксиновой агрессии может быть эндотоксиновый шок [8]. Особенно неблагоприятная ситуация в этом отношении складывается у больных В-ХЛЛ, у которых дефицит анти-ЭТ-IgM сочетается с одновременным падением концентрации в крови общих IgM, причем это наблюдается как до начала лечения, так и после полихимиотерапии. Вместе с тем, следует подчеркнуть, что у обследованных больных направленность изменений показателей, характеризующих гуморальный иммунный ответ на эндотоксин энтеробактерий, чаще всего не совпадает с трендом изменений концентрации в крови общих иммуноглобулинов этих же классов, а какие-либо значимые корреляции между этими показателями не обнаружены. По-видимому, при указанных видах патологии дисбаланс изучаемых показателей антиэндотоксинового иммунитета не имеет непосредственной связи с интегральными нарушениями В-клеточного звена иммунитета.

Таким образом, полученные результаты указывают на необходимость дальнейшей разработки подходов к персонализированному лечению и реабилитации больных гемобластозами. Помимо изучения активности гуморального звена антиэндотоксинового иммунитета, лабораторное обследование таких пациентов должно включать оценку системной эндотоксинемии (СЭЕ), что предполагает определение концентрации кишечного эндотоксина в общей гемоциркуляции [20]. При выявлении у пациентов устойчивых нарушений антиэндотоксинового иммунитета на фоне превышения показателями СЭЕ верхней границы нормы целесообразно применение лечебных процедур и лекарственных препаратов, способствующих снижению концентрации эндотоксина в крови. Отечественными учеными уже начат поиск эффективных способов нормализации уровня эндотоксина в общей гемоциркуляции, которые войдут в «антиантиэндотоксиновую составляющую» лечения и профилактики заболеваний. Проведенные ими исследования показали, что включение компонентов «антиантиэндотоксиновой составляющей» лечения в применяемую схему лечеб-

но-профилактических мероприятий позволяет существенно поднять результативность лечения целого ряда заболеваний, патогенез которых ассоциирован с эндотоксиновой агрессией [20—22]. Есть все основания полагать, что обоснование показаний к применению «антиантиэндотоксиновой составляющей» лечения в комплексной схеме терапии больных гемобластомами может стать важным шагом на пути к повышению эффективности лечения и улучшению качества жизни таких пациентов.

References

1. Vorob'ev A.I., Vorob'ev I.A., Kravchenko S.K., Kremenetskaya A.M., Krivolapov Yu.A., Frank G.A. Hematological malignancies — a special area of the blood system pathology. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2007; 7: 5-10. (in Russian)
2. O'Brien S.N., Blijlevens N.M., Mahfouz T.H., Anaisie E.J. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2003: 438-72.
3. Toucheffeu Y., Montassier E., Nieman K., Gastinne T., Potel G., Bruley des Varannes S. et al. The role of the gut microbiota in chemotherapy — or radiation-induced gastrointestinal mucositis — current evidence and potential clinical applications. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014; 40(5): 409-21.
4. Sivak L.A., Maidanovich N.N., Lyalkin S.A., Aleksik E.M., Askolskiy A.V., Klimanov M.Y. et al. The toxic effects of chemotherapy on the gastrointestinal tract. *Lik. Sprava*. 2012; (3-4): 25-30.
5. Hunter T.B., Bjelland J.C. Gastrointestinal complications of leukemia and its treatment. *Am. J. Roentgenol.* 1994; 142(3): 513-8.
6. Balzan S., de Almeida Quadros C., de Cleve R., Zilberstein B., Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 22(4): 464-71.
7. Permyakov N.K., Yakovlev M.Yu. Pathology of the digestive organs and systemic endotoxemia. *Arkhiv patologii*. 2003; 12: 74-9. (in Russian)
8. Yakovlev M.Yu. Endotoxin Aggression as a Premorbid State or Universal Pathogenesis Factor of Human and Animal Diseases. *Uspekhi sovr. biol.* 2003; 123(1): 31-40 (in Russian)
9. Rietschel E.T., Brade H., Holst O., Brade L., Muller-Loennies S., Mamat U. et al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 216: 39-81.
10. Muller-Loennies S., Brade L., Brade H. Neutralizing and cross-reactive antibodies against enterobacterial lipopolysaccharide. *Int. J. of Med. Microbiol.* 2007; 297: 321-40.
11. Likhoded V.G., Yakovlev M.Yu., Mosezhnyy A.E., Kochurko L.I. Endotoxin immunity in human physiology and pathology. *Meditisina ekstremal'nykh situatsiy*. 1999; 1: 22-6. (in Russian)
12. Anikhovskaya I.A., Menyasheva E.M., Chizhikov N.V., Yakovlev M.Yu. Endotoxin aggression in the pathogenesis of the endotoxemia in patients with various cancers. *Volgogradskiy nauchno-meditisinskiy zhurnal*. 2005; 1: 19-23. (in Russian)

13. Gordienko A.I. New approach to an increase of specificity in determination of antibodies to lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *Ukr. biokhim. zhurn.* 2004; 76(6): 130-5. (in Russian)
14. Gordienko A.I. Optimization of separation and purification of enterobacterial lipopolysaccharides. *Imunologiya ta alergologiya.* 2006; 1: 39-41. (in Russian)
15. Gordienko An.I., Beloglazov V.A., Gordienko Al.I. Microturbidimetry method for the determination of human IgG, IgM, IgA. *Imunologiya ta alergologiya.* 2000; 1: 12-5. (in Russian)
16. Domnikova N.P., Bryakotnina E.V., Il'ina V.N., Evs-tropov A.N. The frequency of isolation and antibiotic sensitivity of Gram-negative microflora in patients with hematological malignancies. *Zhurn. mikrobiol.* 2004; 3: 3-6. (in Russian)
17. Belevtsev M.V., Bortkevich L.G., Buglova S.E., Migal' N.V., Potapnev M.P. The value of serum immunoglobulin class M, G, A and IgG subclasses in acute lymphoblastic leukemia in children. *Immunoonkologiya.* 2003; 3: 149-53. (in Russian)
18. Mel'nik E.A., Rybal'skaya A.P. The immunoglobulins of the main classes in the serum of patients with leukemia. *Lab. diagnostika.* 2007; 42(4): 34-8. (in Russian)
19. Frolova E.V., Shadrivova O.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., Volkova A.G., Popova M.O. et al. Immune status of hematological patients with invasive aspergillosis. *Zhurn. infektologii.* 2012; 4(4): 59-64. (in Russian)
20. Okorokov P.L., Anikhovskaya I.A., Yakovleva M.M., Lazareva S.I., Melamud A.A., Meshkov M.V. et al. Nutritional Factors of Inflammation Induction or Lipid Mechanism of Endotoxin Transport. *Fiziologiya cheloveka.* 2012; 38(6): 105-12. (in Russian)
21. Chernikhova E.A., Anikhovskaya I.A., Gataulin Yu.K., Zakirova D.3., Ivanov V.B., Savel'ev A.A. et al. Enterosorption as an important means of eliminating chronic endotoxin aggression. *Fiziologiya cheloveka.* 2007; 33(3): 135-6. (in Russian)
22. Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Mayskiy I.A., Markelova M.M., Salakhov I.M., Yaovlev M.Yu. The search direction means for reducing endotoxin concentration in the general haemocirculation. *Patogenez.* 2014; 12(4): 25-30. (in Russian)

Сведения об авторах:

Кубышкин Анатолий Владимирович, доктор мед. наук, проф., зам. директора по научной работе

Гордиенко Алла Ивановна, доктор биол. наук, зав. лаб. онкогематологии

Кубышкин Владимир Анатольевич, канд. мед. наук, доцент каф. лучевой диагностики и лучевой терапии

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Маркелова М.М.^{1,2}, Рюмина И.И.¹, Салахов И.М.^{2,3}, Яковлев М.Ю.²⁻⁴

Системная эндотоксинемия и показатели жирового обмена у новорожденных детей: одномоментное исследование

¹ ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии» им. В.И. Кулакова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, ул. Академика Опарина, д. 4

² ФБГНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

³ ООО Клинико-Диагностическое Общество, «Институт общей и клинической патологии» РАЕН, 127083, г. Москва, Россия, ул. Нижняя Масловка, д. 19

⁴ ФБГОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Введение. Установлено, что ожирение сопровождается высоким провоспалительным фоном и повышенным содержанием эндотоксина (ЭТ) у взрослых. Одним из факторов риска развития ожирения у взрослых является низкий вес при рождении и чрезмерная прибавка массы тела в раннем возрасте. **Цель.** Определение взаимосвязи между показателями системной эндотоксинемии (СЭЕ) и жирового обмена у новорожденных детей. **Методика.** Обследовано 44 ребенка, находившихся в отделении патологии новорожденных и недоношенных детей Научного Центра Акушерства, Гинекологии и Перинатологии им. Кулакова в июле 2016 года. Определяли концентрацию ЭТ в плазме крови; антител к ЭТ; липидный профиль; состав тела методом воздушно-заместительной плевтизографии. **Результаты.** У детей с патологией, по сравнению с контрольной группой, концентрация ЭТ и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) были выше ($2,31 \pm 0,15$ против $1,2 \pm 0,13$ ЕУ/ml и $1,15 \pm 0,05$ против $0,69 \pm 0,1$ ммоль/л соответственно), а содержание антител к ЭТ и холестерина были ниже 122 ± 9 против 202 ± 36 у.е.о.п. и ($1,97 \pm 0,34$ против $2,91 \pm 0,09$ мг/дл). Обратная корреляция обнаружена между уровнем ЭТ в крови и процентным содержанием жира в организме и между уровнем ЭТ и индексом атерогенности. Прямая корреляция была между уровнем ЭТ и ЛПВП. **Заключение.** Феномен системной эндотоксинемии сопровождает период новорожденности, что свидетельствует об участии кишечного ЛПС в адаптации к постнатальному периоду жизни, а избыточный уровень ЭТ в общем кровотоке сопутствует или предшествует развитию неонатальной патологии. Недостаточное содержание жира в организме новорожденного может являться причиной ограниченного депонирования ЛПС и повышенного содержания его в крови.

Ключевые слова: эндотоксин; эндотоксиновая агрессия; липополисахарид; липидограмма; жировой обмен; состав тела; недоношенность.

Для цитирования: Маркелова М.М., Рюмина И.И., Салахов И.М., Яковлев М.Ю. Системная эндотоксинемия и показатели жирового обмена у новорожденных детей: одномоментное исследование. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61 (3): 91–96. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.91-96

Для корреспонденции: Маркелова Марина Михайловна, врач-неонатолог отд-ния патологии новорожденных и недоношенных детей ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, науч. сотр. лаб. системной эндотоксинемии и шока ФБГНУ НИИОПП, e-mail: marinayakovleva@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.01.2017

Markelova M.M.^{1,2}, Ryumina I.I.¹, Salakhov I.M.^{2,3}, Yakovlev M.Yu.²⁻⁴

Systemic endotoxemia and fat metabolism in newborns: a cross-sectional study

¹ Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology», Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 117997, Moscow, Oparina st., 4

² Institute of General Pathology and Pathophysiology Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 125315, Moscow Baltiyskaya st., 8

³ Ltd. Clinical Diagnostics Society, Institute of General and Clinical Pathology of Natural Sciences, 127083, Moscow, Nizhnaya Maslovka st., 19

⁴ Federal State Budget Institution of Higher Education Russian National Research Medical University named after NI Pirogov, 117997, Moscow, Ostrovityanova st., 1

Background. It is established that obesity is accompanied by a low-grade inflammation and increased Endotoxin (ET) content in adults. Low birth weight and excessive weight gain in early infancy are associated with an increased risk of obesity,

metabolic syndrome, cardiovascular disease in adults. **Objective.** To determine the relationship between systemic endotoxemia and fat metabolism in newborn infants. **Materials and methods.** Cross-sectional study included 44 infants who were at the department of newborn pathology of Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology in July 2016. The concentration of ET in the blood plasma, ET antibodies, lipid profile, body composition using air-displacement plethysmography were assessed. **Results.** In children with pathology in comparison with the control group the concentration of ET and high density lipids (HDL) were higher ($2,31 \pm 0,15$ vs. $1,2 \pm 0,13$ EU/ml and $1,15 \pm 0,05$ vs. $0,69 \pm 0,1$ mmol/l respectively), while ET antibodies level was lower (122 ± 9 vs. 202 ± 36 O.D.) The inverse correlation observed between the ET plasma level and body fat percentage and between the ET plasma level and atherogenic index. Direct correlation between the ET and HDL levels was found. **Conclusion.** The phenomenon of systemic endotoxemia accompanies the neonatal period, which indicates the involvement of ET to postnatal adaptation, and excess levels of ET in the general circulation is accompanied or proceed to development of neonatal pathology. Lack of fat in the body of the newborn may be a reason for the limited deposit of ET and its high content in the blood.

Keywords: endotoxin; endotoxin aggression; lipopolysaccharide; lipid profile; fat metabolism; body composition; prematurity.

For citation: Markelova M.M., Ryumina I.I., Salakhov I.M., Yakovlev M.Yu. Systemic endotoxemia and fat metabolism in newborns: a cross-sectional study (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61(3): 91—96. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.91-96

For correspondence: Marina M. Markelova, Md, Reseacher at Institute of General Pathology and Pathophysiology Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 125315, Moscow Baltiyskaya st.,8, neonatologist at Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology», Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 117997, Moscow, Oparina st., 4; e-mail: marinayakovleva@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors: Markelova M.M. <http://orcid.org/0000-0002-0316-4153>

Received 15.01.2017

Введение

Более четверти века назад в крови новорожденных был обнаружен эндотоксин (ЭТ), уровень которого был значительно выше у новорожденных с явлениями дезадаптации: показатели концентрации ЭТ в гемоциркуляции и оценка состояния по шкале Апгар находились в обратной зависимости, что подтвердило предположение об участии кишечного ЭТ в гомеостазе и патологических состояниях в раннем неонатальном периоде [1—3]. Этот спорный (на тот период времени) тезис нашёл своё подтверждение открытием рецептора врождённого иммунитета (TLR4) [4, 5] и способностью средств снижающих содержание ЭТ в крови [6] значительно повышать эффективность лечения больных хроническими воспалительными (в том числе вирусными) заболеваниями [7—12], сокращать частоту рецидивов [13]. Эндотоксиновая агрессия (ЭА) кишечного происхождения обнаружена и в перинатальной патологии, в частности, при септических состояниях [14] и антифосфолипидном синдроме [15]. Результаты этих исследований поставили ряд вопросов, в том числе: имеются ли возрастные различия в нормативных показателях системной эндотоксинемии (СЭЕ), каковы механизмы транспорта кишечных липополисахаридов (ЛПС) в портальный и общий кровоток, что может являться депо ЛПС в организме? Оказалось, что концентра-

ция ЭТ с возрастом (в диапазоне от 2 до 60 лет) неуклонно возрастает, а антитела к гидрофильной (полной) и гидрофобной (без полисахаридной части) молекулы ЛПС снижаются [16], содержание ЭТ в общем кровотоке увеличивается при физическом и психоэмоциональном стрессе [17, 18], а в механизме транспорта кишечного ЛПС портальный кровоток принимает участие липидный фактор [19]. Более того, было получено первое косвенное подтверждение тому, что жировая ткань может являться депо гидрофобной формы молекулы ЛПС [8, 19, 20].

Известно, что жировая ткань в организме ребенка выполняет различные функции, но, прежде всего, является энергетическим субстратом, обеспечивая незамедлительное покрытие энергозатрат, в том числе энергозатраты на рост и развитие ребенка. Исследование состава тела новорожденных показало, что содержание жира в организме новорожденного ребенка прямо зависит от срока гестации, на котором произошли роды: чем выше гестационный возраст, тем больше жировая масса и процентное содержание жира в организме ребенка [21]. У недоношенного ребенка незрелость желудочно-кишечного тракта и ограниченные жировые запасы являются серьезным препятствием к его нормальной адаптации в постнатальной жизни. Современные концепции вскармливания недоношенных новорожденных (парентерального и энтерального), так называемое «агрессивное» или

«форсированное» вскармливание учитывают их высокую потребность в пластическом материале и энергии для обеспечения гармоничного физического развития [22, 23]. В то же время избыточное поступление нутриентов и высокие темпы прибавки массы тела в неонатальном периоде ведут к развитию метаболического синдрома и повышают риск таких заболеваний, как ожирение, сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия в последующей жизни [24—26].

Цель исследования — определение взаимосвязи между показателями СЭЕ (системной эндотоксинеми) и жирового обмена у новорожденных детей с различной патологией.

Методика

Обследовано 44 ребенка различного гестационного возраста (22 девочки и 22 мальчика), находившихся на стационарном лечении (с конца июня по начало августа 2016 г.) в отделении патологии новорожденных и недоношенных детей (ОПНиНД) ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ. Из 44 детей 21 ребенок родился доношенным и 23 — недоношенными, из них 10 детей родились в 36—34 недель гестации с массой тела при рождении (МТР) 2266 ± 103 г, 7 детей — в 33—31 нед. — с МТР 1824 ± 112 г и 6 — в 30—27 нед. — с МТР 1101 ± 175 г (4 ребенка были с экстремально низкой массой тела и 1 с очень низкой массой тела при рождении). Детей, рожденных «малымы» к сроку гестации было 7 (5 недоношенных и 2 доношенных), крупновесных — 4 (3 доношенных и 1 недоношенный). Все новорожденные были разделены на 2 группы. 1-ю группу составили 6 доношенных новорожденных без клинических признаков инфекции («условно здоровых»), переведенных в ОПНиНД с целью уточнения диагноза (2 ребенка с врожденными пороками сердца без недостаточности кровообращения, 2 новорожденных с поражением головного мозга, осложненным синдромом мышечной дистонии, 1 ребенок с синдромом Дауна и 1 новорожденный с нарушением терморегуляции в периоде ранней адаптации). 2-ю группу составили 38 детей с различными патологическими состояниями: врожденная пневмония — 15, респираторный дистресс-синдром — 5, транзиторное тахипноэ новорожденных — 5, гемолитическая болезнь новорожденных по АВО-системе — 3, локальная инфекция — 7 (острый катаральный отит, дакриоцистит, инфекция мочевых путей, инфекция, специфичная для перинатального периода неуточненная), врожденный сепсис — 1, реакция дез-

адаптации — 2 (транзиторная гипертермия, неонатальная гипогликемия).

Концентрацию ЭТ в сыворотке крови определяли при помощи микро-ЛАЛ-теста (авторской модификации LAL-теста (Limulus Amoebocyte Lysate test), адаптированного к клиническим условиям, позволяющим определять концентрацию всех ЛПС в сыворотке крови, поскольку взаимодействует с общим фрагментом молекулы ЭТ — липидом-А). Для оценки активности антиэндотоксинового иммунитета (АЭИ) применялся метод «СОИС-ИФА» (скрининг-оценки иммунного статуса), основанный на определении титров антител (АТ) к общему антигену молекулы всех ЭТ — гидрофобному (ГФОБ) липиду-А и к гидрофильной (ГФИЛ) части молекулы ЭТ в условных единицах оптической плотности (у.е.о.п.) Липидограмма — липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), общий холестерин (ОХС), триглицериды (ТГ) и индекс атерогенности (ИА) — определяли с помощью стандартных биохимических методов. Состав тела измеряли с помощью аппарата «ReaPod» методом воздушно-заместительной плетизмографии (LMi, USA) [патент US 6702764 B2]. Статистическую значимость различий между изучаемыми показателями оценивалась по величине t-критерия Стьюдента. Для анализа взаимосвязей между количественными показателями использовался параметрический корреляционный метод Пирсона, определенный при помощи компьютерной программы MS Excel 2010 (Vers.14.0.7015.1000).

Результаты и обсуждение

У всех 44 новорожденных в крови обнаружен ЛПС, концентрация которого варьировала в очень широком диапазоне, цифровые показатели активности АЭИ и оценки состояния по шкале Апгар также имели большой разброс (табл. 1).

Общегрупповые средние показатели СЭЕ значительно отличались от нормативных всех иных возрастных групп [16]: более высоким (в 2 раза) содержанием ЭТ и очень низкой (втрое меньшей) активностью АЭИ (нормативные показатели СЭЕ у детей до 1 года до настоящего времени не определены). В связи с этим представлялось крайне важным сравнить межгрупповые различия изучаемых показателей, которые оказались статистически значимыми по концентрации ЛПС, содержанию антител к гидрофильной форме молекулы ЭТ (табл. 2), а также холестерина и ЛПВП (табл. 3).

Таким образом, у новорожденных с патологически протекающим неонатальным периодом (2-я группа) имеет место эндотоксиновая агрессия (двукратное по-

вышение уровня ЛПС в крови при двукратном снижении активности АЭИ), которая сопровождается существенным увеличением ЛПВП (рис. 1, 2). Более высокая концентрация ЛПВП при наличии ЭА может носить компенсаторный характер, поскольку эта фракция липопротеинов крови обладает высоким сродством к ЛПС и снижает его биологические свойства. Ранее нами было высказано предположение, что ЛПНП представляют собой комплекс ЭТ с ЛПВП [8, 19], но по результатам настоящего исследования оно не находит прямого подтверждения, поскольку различие между концентрациями ЛПНП в сравнива-

емых группах статистически незначимо, хотя это может быть и следствием их большего потребления для синтетических нужд, что косвенно подтверждает обнаруженная нами обратная корреляция между концентрацией ЭТ в крови и коэффициентом атерогенности (рис. 3).

Ранее нами были получены данные, которые позволили предположить, что жировая ткань может быть естественным депо гидрофобной части молекулы ЛПС [8, 19]. Для проверки этого тезиса всех обследованных разделили на две выборки: с концентрацией ЭТ от 0,6 до 0,9 EU/ml (группа А) и с уров-

Таблица 1

Общегрупповые показатели системной эндотоксинемии и оценки состояния по шкале Апгар

Показатель	Цифровые величины показателей	
	Диапазон	Средние
Липополисахариды (ЛПС), EU/ml	0,6 – 4,8	2,15 ± 0,14
Антитела к гидрофобной форме ЛПС, у.е.о.п.	6 – 236	66,6 ± 3,2
Антитела к гидрофильной форме ЛПС, у.е.о.п.	27 – 391	139,6 ± 8,2
АПГАР, баллы на 1-й мин жизни	2 – 8	7,1 ± 0,15
АПГАР, баллы на 5-й мин жизни	4 – 9	8 ± 0,12

Примечание. Расшифровку аббревиатур в табл. 1, 2 и рис. 1 см. в разделе "Методика".

Таблица 2

Сравнительная характеристика средних показателей системной эндотоксинемии условно здоровых детей (1-я группа) и новорождённых с патологическим течением неонатального периода (2-я группа)

Показатель	Концентрация ЛПС, EU/ml	Концентрация антител, у.е.о.п.	
		к ГФОБ ЛПС	к ГФИЛ ЛПС
Нормативные показатели у взрослых	0 – 1	200	400
1-я группа			
Диапазон показателей	0,9 – 1,8	38 – 118	94 – 320
Средние показатели	1,2 ± 0,13	67 ± 11	202 ± 36
2-я группа			
Диапазон показателей	0,6 – 4,8	6 – 239	27 – 391
Средние показатели	2,31 ± 0,14	65 ± 4	122 ± 9
Достоверность различий между средними показателями	p < 0,05	p > 0,05	p < 0,05

Таблица 3

Сравнительная характеристика средних показателей липидограммы условно здоровых детей (1-я группа) и новорождённых с патологическим течением неонатального периода (2-я группа)

Показатель	ЛПВП, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ОХС, мг/дл	ИА
Нормативные показатели	0,9–1,8	0–3,9	0,39–0,93	1,8–4,9	1,8–4,9
1-я группа					
Средние показатели	0,69 ± 0,1	1,02 ± 0,17	1,1 ± 0,25	1,97 ± 0,34	1,93 ± 0,6
2-я группа					
Средние показатели	1,12 ± 0,05	1,26 ± 0,06	1 ± 0,06	2,91 ± 0,09	1,95 ± 0,1
Различия	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p > 0,05

нем ЛПС от 1,2 до 4,8 EU/ml (группа Б), поскольку предполагалось, что у новорождённых, как и у взрослых, будет обнаружена прямая корреляция между концентрацией ЛПС в общем кровотоке и массой жировой ткани [8, 19, 20]. Концентрация ЭТ была независимо связана с содержанием жира с поправкой на традиционные факторы риска (пол, уровень С-реактивного белка, функцию почек). Однако, вопреки нашим предположениям, результаты настоящего исследования свидетельствуют об обратном (рис. 4, 5): обнаружена обратная корреляция между уровнем ЭТ в крови и процентным содержанием жира в организме, в группе А процент жировой ткани ($15,3 \pm 2,7\%$) в 1,5 раза превышал ($p < 0,05$) таковую у детей в группе Б ($10,6 \pm 0,6\%$). Другими словами, чем выше процент жировой ткани у новорождённых, тем меньше концентрация ЭТ в общей гемодинамике. Каким образом можно объяснить этот факт? Если у взрослых людей с нормальным или избыточным содержанием жира, исходя из предположения, что жировая ткань является депо ЛПС, это может быть обусловлено липолизом с освобождением в общий кровоток депонированного ЭТ, то у недоношенных детей существенное снижение жировой массы может быть причиной ограниченного депонирования ЛПС и повышенного содержания его в крови.

Заключение

Результаты предпринятого исследования свидетельствуют о том, что СЭЕ является облигатным для периода новорожденности явлением, что свидетельствует об участии кишечного ЛПС в адаптации новорождённого к постнатальному периоду жизни, а избыточный уровень ЭТ в общем кровотоке (ЭА) сопутствует или, согласно эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека, предшествует развитию самой различной неонатальной патологии. Если у взрослого человека, страдающего ожирением, одной из причин высокого содержания ЛПС в крови может быть липолиз, то у новорождённых, особенно у недоношенных детей с относительно низким содержанием жира в организме обнаруженная нами обратная зависимость между процентным содержанием жира и концентрацией ЭТ в общем кровотоке может быть обусловлена невозможностью депонирования повышенного содержания ЭТ вследствие низкой массы жира. В дальнейшем необходимо расширение протокола исследования, с включением в него определения активности липаз и кортизола, поскольку стресс повышает уровень СЭЕ [17, 18], активизирует липолитические процессы, а жировую ткань представляется возможным рассматривать как вполне вероятное депо гидрофобной части молекулы ЛПС.

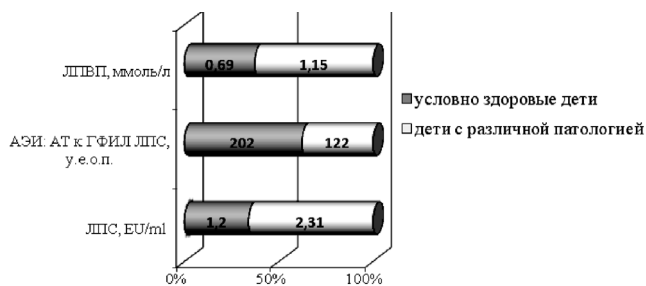


Рис. 1. Интегральные показатели концентрации эндотоксина, анти-эндотоксинового иммунитета и уровень содержания липопротеидов высокой плотности в сыворотке крови у условно здоровых новорождённых и у новорождённых детей с различной патологией.

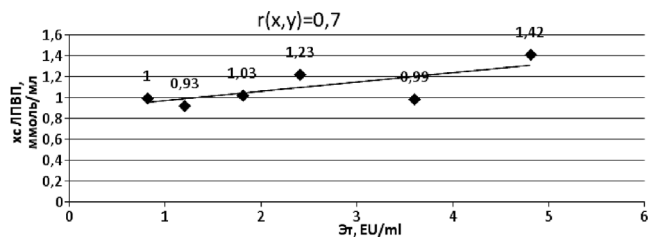


Рис. 2. Прямая высокая корреляция между уровнем ЭТ и ЛПВП в крови.

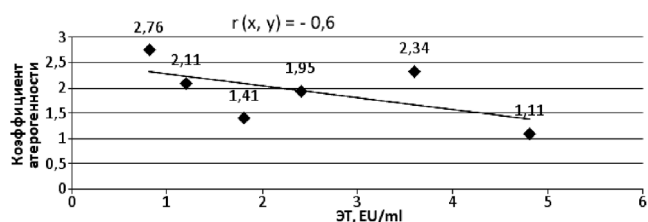


Рис. 3. Обратная заметная корреляция между коэффициентом атерогенности и содержанием ЭТ в крови.

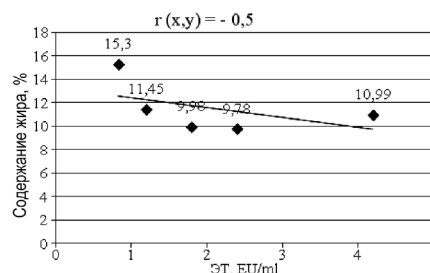


Рис. 4. Обратная заметная корреляция между содержанием жира в организме и уровнем ЭТ в крови.

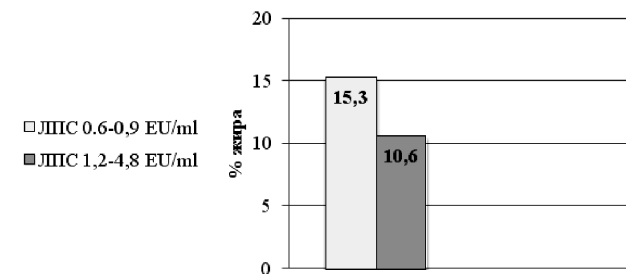


Рис. 5. Процентное содержание жира в организме у детей в группах А (с концентрацией ЭТ от 0,6 до 0,9 EU/ml) и Б (с уровнем ЛПС от 1,2 до 4,8 EU/ml).

References

1. Urazaev R.A., Krupnik A.N., Yakovlev M.Yu. Endotoxemia in the early period of adaptation of newborns and in their mothers. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 1992; 2: 114. (in Russian)
2. Yakovlev, M.Yu. Endotoxin shock. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 1987; 3: 207-211. (in Russian)
3. Yakovlev, M.Yu. The role of the intestinal microflora and the failure of the barrier function of the liver in the development of endotoxemia and inflammation. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 1988; 5: 127-8. (in Russian)
4. Medzhitov R., Janeway C.A Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol*. 1997; 9: 4-9.
5. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P, Janeway C.A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388:394-7.
6. Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Maisky I.A., Markelova M.M., Salakhov I.M., Yakovlev M.Yu. The search direction means for reducing endotoxin concentration in the general haemocirculation. *Patogenez*. 2014; 4: 25-30. (in Russian)
7. Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Khasanova G.R., Yakovlev M.Yu. Endotoxin component of the pathogenesis of chronic viral infections. *Fiziologiya Cheloveka*. 2015; 3: 118-26. (in Russian)
8. Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Yakovlev M.Yu. Endotoxin theory of atherosclerosis. *Fiziologiya Cheloveka*. 2015 ;41(1): 106-16. (in Russian)
9. Beloglazov V.A., Klimuk A.V. Effect of dry extract of artichoke and lactulose on antiendotoxin immunity and systemic inflammation in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Tavricheskiy Mediko-Biologicheskiy Vestnik*. 2014; 1: 18-24. (in Russian)
10. Meshkov M.V., Gataullin Yu.K., Ivanov V.B., Yakovlev M.Yu. Endotoxin aggression as a cause of postoperative complications in pediatric surgery (new perspectives for prevention). [Endotoksinovaya agressiya kak prichina posleoperatsionnykh oslozheniy v detskoj khirurgii (novye perspektivy profilaktiki)]. Moscow: Seriya Novye lechebno-diagnosticheskie tekhnologii. Kniga 2; 2007. (in Russian)
11. Meshkov M. V., Fayzulin A. K., Gataullin Yu. K., Anikhovskaya I. A., Mayskiy I. A., Salakhov I. M. et al. Antiendotoxin component in the prevention of postoperative complications in children with obstructive uropathy. *Detskaya khirurgiya*. 2012; 2: 37-41. (in Russian)
12. Enukidze G.G., Anikhovskaya I.A., Marachev A.A., Yakovlev M.Yu. Antiendotoxin component in the treatment of chronic inflammation and female infertility. [Antiendotoksinovoe napravlenie v lechenii khronicheskogo vospaleniya i zhenskogo besplodiyaj]. Moscow: Moskovskie uchebniki SiDiPress, Novye lechebno-diagnosticheskie tekhnologii, Kniga 3; 2007. (in Russian)
13. Vyshegurov Ya.Kh., Anikhovskaya I.A., Batmanov Yu.E., Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin in the pathogenesis of the inflammatory pathology of the eye and the antiendo-
- toxic component of its treatment. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2007; 1: 12-4. (in Russian)
14. Tabolin V.A., Yakovlev M.Yu., Bel'chik Yu.F., Il'ina A.Ya., Lazareva S.I. Modern approaches to the treatment of toxic-septic conditions in newborns. *Pediatriya. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 2002; 1: 31-5. (in Russian)
15. Tabolin V.A., Lazareva S.I., Il'ina A.Ya., Yakovlev M.Yu. Antiphospholipid syndrome: the possible role of endotoxin aggression in pathogenesis. *Pediatriya. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 2001; 5: 80-4. (in Russian)
16. Salakhov I.M., Anikhovskaya I.A., Maysky I.A., Markelova M.M., Okorokov P.L., Hasanova G.R. et al. The normative data of systemic endotoxemia as the basic element of role definition of lipopolysaccharides of gut organisms in general pathology. *Patogenez*. 2015; 1: 18-27. (in Russian)
17. Anikhovskaya I.A., Oparina O.N., Yakovleva M.M., Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin as a universal factor of adaptation and pathogenesis of the general adaptation syndrome. *Fiziologiya cheloveka*. 2006; 32(2): 87-91. (in Russian)
18. Anikhovskaya I.A., V.G.Dvoenoso, R.I.Zhdanov, A.A.Kubatiev, I.A.Mayskiy, M.Yu.Yakovlev. Psychoemotional stress as a clinical model of the initial phase of the general adaptation syndrome. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*, 2015; 59(4): 87-92. (in Russian)
19. Okorokov P.L., Anychovskaya I.A., Yakovleva M.M., Lazareva S.I., Melamud A.A., Meshkov M.V. et al. Nutritional Factors of Inflammation Induction or Lipid Mechanism of Endotoxin Transport. *Human Physiology*. 2012; 38(6): 105-12.
20. Mariann I. Lassenius, Aila J. Ahola, ValmaHarjutsalo, Carol Forsblom, Per-Henrik Groop, Markku Lehto. Endotoxins are associated with visceral fat mass in type 1 diabetes. *Sci Rep*. 2016; 6: 38887.
21. Hawkes CP, Haurihane JO, Kenny LC, Irvine AD, Kiely M, Murray DM. Gender-and gestational age-specific body fat percentage at birth. *Pediatrics*. 2011; 128: 645-65.
22. Adamkin D.H. *Nutritional Strategies for the Very Low Birthweight Infant*. Translated From English. Ed. E.N. Baybarina, Moscow. Geotar-Media; 2013. (in Russian)
23. Narogan M.V., Ryumina I.I., Grosheva E.V. Basic principles of enteral feeding in premature infants. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics)*. 2014; 59(3): 120-8. (in Russian)
24. Nicolas Stettler, Babette S. Zemel, Shiriki Kumanyika, Virginia A. Stallings. Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter cohort study. *Pediatrics*. 2002; 109: 194-9.
25. Ken K L Ong, Marion L Ahmed, Pauline M Emmett, Michael A Preece, Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort studies. *BMJ*. 2000; 320: 967-71.
26. Terence J. Wilkin, Bradley S. Metcalf, Michael J. Murphy, Joanne Kirkby, Alison N. Jeffery, Linda D. Voss. The relative contribution of birth weight, weight change and current weight to insulin resistance in contemporary 5-year-olds. *Diabetes*. 2002; 51(12): 3468-72.

Сведения об авторах:

Рюмина Ирина Ивановна, доктор мед. наук, проф., руководитель отд.—ния патологии новорожденных и недоношенных детей ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, e-mail: iryumina@mail.ru

Салахов Ильшат Мазгарович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. системной эндотоксинемии и шока ФБГНУ НИИОПП, e-mail: 7261314@rambler.ru

Яковлев Михаил Юрьевич, доктор мед. наук, проф., акад. РАЕН, зав. лаб. системной эндотоксинемии и шока ФБГНУ НИИОПП, проф. каф. патологической анатомии РНИИМУ им. Н.И. Пирогова, директор института «Общей и Клинической патологии» КДО РАЕН, e-mail: yakovlev-lps@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2017

УДК 615.9:36-085.27:[547.854.4:661.743.24]-092.9

Мышкин В.А.¹, Еникеев Д.А.², Срубиллин Д.В.², Репина Э.Ф.¹,
Гимадиева А.Р.³, Габдрахманова И.Д.²

Защита печени оксиметилурацилом и производными янтарной кислоты при воздействии в эксперименте тетрахлорметана

¹ ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», 450106, г. Уфа, Россия, ул. Ст. Кувыкина, д. 94

² ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, 450008, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3

³ ФГБУН Уфимский институт химии РАН, 450054, г. Уфа, Россия, просп. Октября, д. 71

Цель. Сравнительная оценка гепатопротекторных свойств комплексного соединения «оксиметилурацил + натрия сукцинат» и отдельных его составляющих на экспериментальной модели острого токсического поражения печени, индуцированного тетрахлорметаном (ТХМ). **Результаты.** Исследуемое комплексное соединение в дозе 50 мг/кг оказывало максимальный гепатозащитный эффект, ограничивая выраженность некроза и сохраняя метаболизм печени за счет положительного влияния на активность ферментов (урокиназы, АсАТ, ЩФ), показатели уровня билирубина и триглицеридов, а также на состояние перекисно-антиперекисной системы — ПОЛ-АОС (ДК, ТК, СОД, КАТ), восстановленного глутатиона, уровня SH-групп. В группах крыс, получавших отдельно оксиметилурацил и натрия сукцинат по 25 мг/кг по лечебно-профилактической схеме, выявлена нормализация функционирования ПОЛ-АОС, в меньшей степени было выражено влияние на функциональную активность печени и ее морфологическую структуру. **Заключение.** Целесообразность одновременного назначения оксиметилурацил и натрия сукцината подтверждалась более высокой выживаемостью крыс при введении комплексного соединения «оксиметилурацил + натрия сукцинат» после введения летальной дозы ТХМ.

Ключевые слова: оксиметилурацил; натрия сукцинат; комплексное соединение оксиметилурацила с натрия сукцинатом; перекисное окисление липидов; антиоксидантная защита; тетрахлорметан; гепатозащитное действие.

Для цитирования: Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Срубиллин Д.В., Репина Э.Ф., Гимадиева А.Р., Габдрахманова И.Д. Защита печени оксиметилурацилом и производными янтарной кислоты при воздействии в эксперименте тетрахлорметана. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 97—102.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.97-102

Для корреспонденции: Еникеев Дамир Ахметович, доктор мед. наук, зав. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: enikeev@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.11.2016

Myshkin V.A.¹, Enikeev D.A.², Srubilin D.V.², Repina E.F.¹,
Gimadieva A.R.³, Gabdrakhmanova I.D.²

Protection of the liver by oxymethyluracil and derivatives of succinic acid at influence of tetrachlormethane in the experiment

¹ Ufa Research Institute of Occupational Health and Hyman Ecology, 94 Kuvykina Str., Ufa 450106

² Bashkir State Medical University, 3 Lenina str., Ufa 450008

³ Ufa Institute Of Chemistry of RAS, 71 prosp. Oktyabrya, Ufa 450054

The effect of a new complex compound «oxymethyluracil + sodium succinate» on the morphological state and AOS of the liver damaged by tetrachloride has been studied using 50 experimental white male rats. **Purpose.** Comparative assessment of hepatoprotective properties of the «oxymethyluracil + sodium succinate» compound with OMU and sodium succinate using the experimental model of acute toxic damage of the liver induced by TCR. **Results.** The complex compound studied has been shown to produce maximal hepatoprotective effects at a dose of 50 mg/kg through limiting TCR necrosogenic effect, preserving metabolic activity of the liver due to beneficial effects of enzymes (urokaninase, AcAT), levels of bilirubin and triglycerides as well as the POL-AOS system (DK, TK, SOD, KAT), reduced glutathione, SH-group levels. In the rat groups, with oxymethyluracil and sodium succinate administered separately at a dose of 25 mg/kg for treatment and prevention, POL-AOS functioning has also been normalized, while the liver functional activity

and its morphological structure — to a lesser degree. **Conclusion.** The usefulness of simultaneous administration of oxymethyluracil and sodium succinate is confirmed by a higher survival rate of the rats which received the complex compound «oxymethyluracil + sodium succinate» in case of poisoning with TCR at a lethal dose.

Keywords: oxymethyluracil, sodium succinate, complex compound of oxymethyluracil and sodium succinate, lipid peroxidation, antioxidant protection, tetrachlormethane, hepatoprotective effect.

For citation: Myshkin V.A., Enikeev D.A., Srubilin D.V., Repina E.F., Gimadieva A.R., Gabdrakhmanova I.D. Protection of the liver by oxymethyluracil and derivatives of succinic acid at influence of tetrachlormethane in the experiment. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 97–102 (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.97-102

For correspondence: Damir A. Enikeev, Doctor of Medical Sciences, enikeev@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsor ship.

Information about authors:

Gimadieva A.R., <http://orcid.org/0000-0002-2995-310X>

Received 02.11.2016

Введение

Проживание людей в зонах риска техногенных катастроф, в экологически неблагоприятных регионах требует поиска новых подходов к фармакопрофилактике поражений печени. Один из таких подходов основан на своевременном использовании новых фармакологических комплексов, обладающих антиоксидантной и энергокорректирующей активностью. По нашим данным [1], перспективны антиоксиданты пиримидиновой структуры и препараты, содержащие сукцинат или его производные, действующие на пластический и энергетический обмен. Могут быть использованы как комбинации препаратов, так и комплексные соединения, удовлетворяющие всем необходимым требованиям для лекарственных форм данной фармакологической группы [2]. Оксиметилурацил (5-гидрокси-6-метилурацил) оригинальный отечественный препарат, обладающий широким спектром фармакологического действия: иммуномодулирующее, репаративное, противовоспалительное, антитоксическое и выраженное антиоксидантное [3]. При этом препарат имеет низкую токсичность (DL 50 > 8000 мг/кг). Сукцинат и препараты, содержащие янтарную кислоту, находят широкое применение в качестве антиоксидантных и энергокорректирующих средств. Последние представляют собой комплексные цитопротекторы, оказывающие свое действие через различные рецепторные, ферментные и медиаторные системы [4]. Оксиметилурацил и сукцинаты отличаются высоким уровнем влияния на печеночный метаболизм и в виде комплексных соединений, вероятно, могут выступать как эффективные гепатопротекторы. В то же время, отсутствуют работы о влиянии указанных комплексов на функционально-метаболическое состояние и морфологиче-

скую структуру печени при ее токсическом повреждении.

Цель — изучение влияния комплексного соединения «МГ» (оксиметилурацил + натрия сукцинат), синтезированного в Уфимском институте химии Российской академии наук, на морфофункциональное состояние и антиокислительную систему печени при воздействии тетрахлорметана.

Методика

Эксперименты выполнены на 50 белых беспородных крысах-самцах массой 180—200 г. Животных содержали на обычном рационе питания. Токсическое поражение печени вызывали подкожным введением 50%-ного масляного раствора тетрахлорметана (ТХМ) в дозе 2 г/кг на протяжении 4 сут. [5—7]. Комплексное соединение «МГ» (синтезировано к.х.н. А.Р. Гимадиевой в Уфимском институте химии РАН) в качестве действующего вещества содержит эффективное количество смеси оксиметилурацила и натрия сукцината при массовом соотношении компонентов 1:1. Указанная фармакологическая композиция оказывает антитоксическое, антиоксидантное и антигипоксическое действие [1]. Комплексное соединение МГ вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг 3 раза в день на протяжении первых 4 сут., а в последующем — 1 раз в сут. на протяжении всего эксперимента. Действие комплекса МГ сравнивали с действием отдельных его составляющих — оксиметилурацила и натрия сукцината. Препараты в дозе 25 мг/кг вводили крысам по аналогичной схеме за 1 ч до введения ТХМ.

Животных разделили на 5 групп:

- 1-я группа — контроль (ТХМ);
- 2-я группа — оксиметилурацил + ТХМ;
- 3-я группа — сукцинат натрия + ТХМ;

- 4-я группа — комплексное соединение МГ + ТХМ;

- 5-я группа — интактные.

Материал для исследования брали на 7-е сут. эксперимента. Состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) исследовали методом прямой спектрометрии — путем определения содержания в гомогенатах печени количества диеновых конъюгатов (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК) [8, 9]. Одновременно с процессами ПОЛ регистрировали активность антиоксидантной системы — супероксиддисмутазы (СОД) [10] и каталазы (КАТ) [11]. Проведена оценка показателей, характеризующих функциональное состояние печени: активность урканиназы (УРН) [12], аспарагиновой аминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), определявшихся по кинетическому методу Ненгу на биохимическом анализаторе согласно прилагаемым инструкциям, исследовали также содержание в печени восстановленного глутатиона, концентрацию SH-групп, билирубина и триглицеридов [13, 14]. Взятие материала для морфологических исследований проводили на 7—8-е сут. после заключительного введения ТХМ. Печень крыс извлекали и фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезвоживали и заливали в парафин по стандартной методике приготовления гистологических препаратов [15]. Серийные срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином и изучали в светооптическом микроскопе Leica DMD 108 (Германия) при $\times 200$ - и $\times 400$ -кратном увеличении. Результаты биохимических исследований обрабатывали статистически. Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производилась по двустороннему *t*-критерию Стьюдента для независимых групп. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Токсическое поражение печени, вызванное введением ТХМ, сопровождается признаками цитолиза, холестаза, нарушением детоксицирующей и липосинтезирующей функции, а также повреждением структуры печени, активацией процессов ПОЛ и подавлением антиоксидантной системы (АОС). Эксперименты проведены в 2 этапа. На первом этапе исследовали активность процессов ПОЛ, систему антиоксидантной защиты и функционально-метаболическое состояние печени при поражении ее ТХМ. В отдельной серии экспериментов изучали влияние исследуемых препаратов на выживаемость крыс в условиях острого отравления летальной дозой ТХМ. Как следует из данных, представленных в табл. 1, при токсическом повреждении печени происходит накопление

продуктов ПОЛ в ткани органа. Содержание ДК и ТК увеличивается почти 2 раза. Накопление продуктов ПОЛ сопровождается снижением активности антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы и каталазы соответственно в 2,4 и 1,5 раза. Нарушения в системе ПОЛ-АОС протекают при одновременном снижении в печени уровня общих тиоловых групп и восстановленного глутатиона, который к 7-м сут. достигает 53% и 55,3% соответственно от показателей интактных животных. Это может быть обусловлено неферментативной реакцией SH-групп со свободными радикалами липидов в результате активации ПОЛ. Токсическое поражение печени вызывает увеличение концентрации билирубина и триглицеридов (табл. 2). В крови животных значительно повышается активность печеночно-специфического фермента — урканиназы, а также активность АсАТ и ЩФ в 2,19 и 1,49 раза соответственно. При исследовании гистологических препаратов печени крыс, которым вводили ТХМ, были выявлены нарушения морфологической структуры органа — обширные области некротизированных и морфологически измененных гепатоцитов, в основном вокруг центральных вен. Выявлены признаки зернистой, гидропической вакуольной (с просветлением цитоплазмы клеток вследствие расширения эндоплазматической сети) и балонной дистрофии. В отдельных печеночных клетках дистрофические изменения усиливались до парциального некроза и полного распада клеточных органелл с потерей радиальной структуры паренхимы печени. Выявлялись ступенчатые и массивные мостовидные некрозы. Зоны некрозов сопровождалась массивными кровоизлияниями и инфильтрацией клеток (рис. 1).

Антиоксидантный эффект препарата МГ сопровождался существенным снижением количества продуктов ПОЛ — диеновых и триеновых конъюгатов, сохранением в ткани печени активности СОД и КАТ, уровня восстановленного глутатиона и концентрации SH-групп (табл. 1, 2). Морфологические нарушения органа были менее выражены по сравнению с контролем (ТХМ), сохранялась структурная организация гепатоцитов, активность деструктивных процессов была низкой, дистрофия гепатоцитов практически не выражена (рис. 2). Можно предположить существенное торможение некротических процессов у животных, которым вводили комплекс МГ по профилактической схеме в сравнении с животными контрольной группы. В то же время, введение крысам оксиметилурацила, также как и натрия сукцината, практически не влияло на активность щелочной фосфатазы и концентрацию в крови триглицеридов, хотя и было эффективным по показателям активности УРН, АсАТ и количеству общего билирубина. Концентрация SH-групп и уровень восстановленного глутатиона

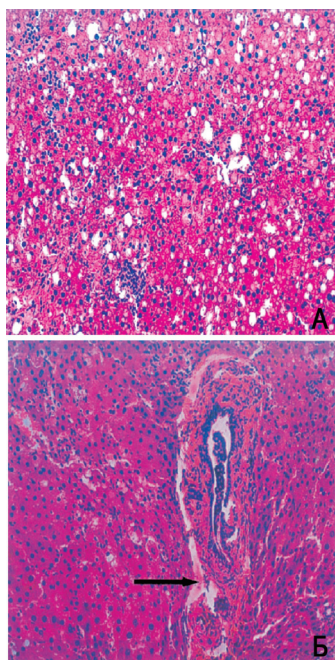


Рис. 1. Структура паренхимы печени крыс после отравления тетрахлолорметаном:

А – некроз гепатоцитов с воспалительными инфильтратами на 7-е сут. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x200; Б – явления ступенчатого некроза гепатоцитов (→) вокруг портального тракта на 7-е сут. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x200.

у животных 2-й группы также статистически значимо не различались с контролем. В то же время, у животных, защищенных препаратами, сохранялся баланс между количеством продуктов ПОЛ (ДК и ТК) и активностью каталазы (табл. 1). Установлен антиоксидантный эффект у крыс 3-й группы, которым вводили натрия сукцинат. Эффект подтвержден снижением уровня ТК, относительно высокой активностью каталазы и частичным сохранением тиол-дисульфидного статуса гепатоцитов. Метаболический эффект препаратов проявлялся снижением активности АсАТ и концентрации общего билирубина.

Результаты исследований влияния препаратов на выживаемость крыс представлены в табл. 3. Они свидетельствуют о том, что при внутрижелудочном введении ТХМ в дозе 1 DL₅₀ (7500 мг/кг) летальность крыс существенно не изменялась у животных, которым оксиметилурацил и натрия сукцинат вводили отдельно. В то же время, защитный эффект получен от совместного введения оксиметилурацила и натрия сукцината (препарат «МГ»), что нашло отражение в снижении летальности крыс (35—40%) относительно показателя в контрольной группе (80%). Повышение выживаемости животных при сочетанном введении соединений с выраженными антигипоксиче-

Таблица 1

Влияние оксиметилурацила, натрия сукцината и комплекса МГ на функциональное состояние системы ПОЛ-АОС при поражении печени крыс тетрахлолорметаном (M ± m)

Показатели	Группы животных (n = 10)				
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	5-я группа
ДК (λ = 232) усл. ед./г ткани	2,5 ± 0,18	1,2 ± 0,2*	2,2 ± 0,33	1,6 ± 0,22*	1,3 ± 0,09*
ТК (λ = 278) усл. ед./г ткани	2,2 ± 0,13	1,0 ± 0,02*	1,2 ± 0,1*	1,36 ± 0,05*	1,08 ± 0,05*
СОД, усл. ед. на г белка	2,0 ± 0,17	3,8 ± 0,66	3,9 ± 1,0*	3,3 ± 0,9*	4,8 ± 0,66*
КАТ, моль в мин на г белка	160,4 ± 17,0	202 ± 15*	200 ± 13*	217 ± 12*	244,6 ± 18*
Восстановленный глутатион, мг%	49 ± 10	62,3 ± 12*	60,5 ± 6,6*	64,5 ± 9,0*	88,5 ± 9*
SH-группы, мкг/мг белка	10,3 ± 0,5	18,5 ± 3,3*	17,8 ± 2,3*	17,0 ± 3,3*	19,4 ± 0,1*

Примечание. * — различия значимы в сравнении с 1-й группой, p<0,05

Таблица 2

Влияние оксиметилурацила, натрия сукцината и комплекса МГ на функционально-метаболическое состояние печени при воздействии тетрахлолорметана (M ± m)

Показатели	Группы животных (n = 10)				
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	5-я группа
УрН, ммоль/г л	38,4 ± 7,6	20,9 ± 8,0*	32,5 ± 6,6	11,5 ± 3,4*	0,89 ± 0,04*
АсАТ, ммоль/г л	23,5 ± 4,4	17,8 ± 3,6*	12,4 ± 6,6*	13,6 ± 0,23*	10,7 ± 0,18*
ЩФ, ммоль/г л	22,5 ± 1,06	17,3 ± 11,2	16,3 ± 10,0	17,4 ± 4,3*	15,1 ± 3,4*
Билирубин, мкмоль/л	16,3 ± 8,5	8,3 ± 0,9*	2,0 ± 0,65*	0,38 ± 0,1*	0,23 ± 0,07*
Триглицериды, ммоль/л	2,8 ± 0,18	2,0 ± 0,9	0,30 ± 0,65	0,38 ± 0,1*	0,23 ± 0,07*

Примечание. * — различия значимы в сравнении с 1-й группой, p<0,05

Таблица 3

Выживаемость при введении оксиметилурацила и натрия сукцината крысам, подвергнутым воздействию тетрахлорметана

Препараты	Доза, мг/кг	Эффект выживания, особей / %
Контроль + ТХМ	7500	(2 из 10) 20%
ТХМ + оксиметилурацил	25	(3 из 10) 30%
ТХМ + натрия сукцинат	25	(2 из 8) 25%
ТХМ + оксиметилурацил + натрия сукцинат	50	(7 из 10) 70%

скими и антиоксидантными свойствами в условиях смертельного отравления тетрахлорметаном показано также другими исследователями [16].

Заключение

Гепатопротекторное действие комплекса МГ, оксиметилурацила и натрия сукцината реализуется на структурно-метаболическом уровне. Метаболический эффект препаратов проявляется в снижении цитолиза, холестаза, а также уровня билирубина в крови. Установлено, что комплекс МГ при совместном профилактическом применении способствует сохранению структуры печени, значительно снижает интенсивность и распространенность дистрофических и некротических процессов, оказывает благоприятное влияние на систему ПОЛ-АОС (диеновые и триеновые конъюгаты, активность супероксиддисмутазы и каталазы, уровень восстановленного глутатиона и SH-групп в ткани печени). Целесообразность одновременного назначения препаратов в дозах по 50 мг/кг подтверждается более высокой выживаемостью крыс, отравленных тетрахлорметаном. Проведенные исследования позволяют рассматривать комбинацию оксиметилурацила с производными янтарной кислоты как перспективное направление для дальнейшего исследования в клинике при острых токсических повреждениях печени некрозогенными ядами и дальнейшего доклинического изучения при ее хронических поражениях. Экспериментальные исследования комплексного соединения МГ целесообразно продолжить на других моделях токсического поражения печени.

References

1. Myshkin V.A., Enikeev D.A. *Overcoming hepatotoxicity antioxidants: reality and prospects. [Preodolenie gepatotoksichnosti antioksidantami: real'nost' i perspektivy]*. Ufa; 2014. (in Russian)
2. Kozhoka T.G. *Drugs in pharmacotherapy pathology of the cell, the problems of production and providing the population. [Lekarstvennye sredstva v farmakoterapii patologii kletki, problemy proizvodstva i obespecheniya naseleniya]*. Moscow; 2007. (in Russian)

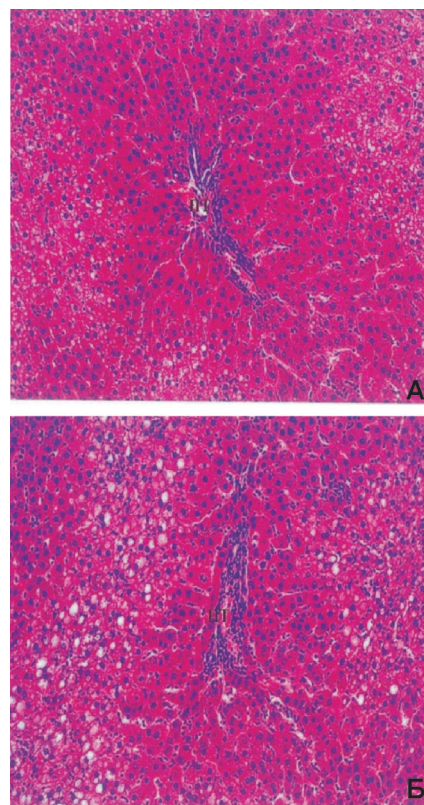


Рис. 2. Комплекс МГ-2 (50 мг/кг) внутрибрюшинно: А — структура печени в области портального тракта на 7-е сут. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. x200; Б — сохранность структуры гепатоцитов вокруг портального тракта на 7-е сут. Окраски гематоксилином и эозином. Увел. x200.

3. Chereshev V.A., Myshkin V.A., Enikeev D.A. *Hepatoprotective under chemical influences. [Gepatoprotektsiya pri khimicheskikh vozdeystviyakh]*. Moscow-Ufa; 2012. (in Russian)
4. Sukhanov D.S., Kovalenko Kh.L., Romantsov M.G., Petrov A.Yu. i dr. *Cytoprotective activity of succinate containing drugs on the functional activity of the liver in the experiment. [Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya]*. 2010; 73(8): 35-8. (in Russian)
5. Vengerovskiy A.I., Markova I.V., Saratikov A.S. *Guidelines for the study of hepatoprotective activity of pharmacological substances. In: Khabriev R.U., eds. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow: Meditsina; 2005: 683-91. (in Russian)

6. Gonskiy Ya.I., Korda M.M., Klishch I.N. The influence of acetylcysteine on the antioxidant system in experimental toxic liver injury. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1991; 54(5): 44-8. (in Russian)
7. Skakun N.P. *Liver damage by carbon tetrachloride. [Porazhenie pecheni chetyrekhkhlorigim uglerodom]*. Moscow: NIITEKHAM; 1989. (in Russian)
8. Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.A., Kolesnikov O.L., Tselikman V.A. *Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism. [Eksperimental'noe modelirovanie i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma]*. Chelyabinsk, 2000. (in Russian)
9. Gavrilov V.B., Gavrilov A.R., Khmara L.F. The measurement of diene conjugates in blood plasma by UV absorption heptanoic and isopropanol extracts. *Laboratornoe delo*. 1985; 2: 60-4. (in Russian)
10. Chevri S., Chaba I., Sekey I. Role of superoxidodismutase in the oxidation processes of cell and the method of its determination in biological membranes. *Laboratornoe delo*. 1985; 11: 678-80. (in Russian)
11. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova N.N., Tokarev V.V. Method of determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)
12. Burobin V.A., Likhacheva N.V., Abgaforova G.E. Determination of the activity of urokinase in serum and liver tissue. Micromethod. *Laboratornoe delo*. 1978; 11: 650-3. (in Russian)
13. Kolb V.G., Kamyshnikov V.S. *Clinical biochemistry. [Klinicheskaya biokhimiya]*. Minsk, 1976. (in Russian)
14. Rubina Kh.M., Romanchuk D.A. Quantitative determination of SH groups in whole and protein-free blood using spectrophotometry. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1961; 7(6): 652-5. (in Russian)
15. Merkulov G.A. *Course of the histopathological techniques [Kurs patogistologicheskoy tekhniki]*. Moscow: Meditsina, 1969. (in Russian)
16. El'kin A.I., Elizarov D.P., Ivanov V.B., Terekhin G.A. Evaluation of the antitoxic properties of the compounds with pronounced antihypoxic and antioxidant activity during intoxication with chlorinated hydrocarbons. *Toksikologicheskij vestnik*. 2003; 3: 19-24. (in Russian)

Сведения об авторах:

Мышкин Владимир Александрович, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. отд. токсикологии ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»

Срублин Дмитрий Витальевич, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Репина Эльвира Фаритовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., руководитель отдела токсикологии, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»

Гимадиева Альфия Раисовна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакофорных циклических систем УФИХ РАН

Габдрахманова Инга Данировна, врач-невролог РКБ № 2 г. Уфы, заочный аспирант каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

© Коллектив авторов, 2017
УДК 615.015.23

Венгерович Н.Г.¹, Юдин М.А.¹, Чепур С.В.¹, Иванов И.М.¹, Строкина Е.И.², Колесников А.М.¹

Исследование функции дыхания при применении тримеперидина в составе комбинированной рецептуры на модели экспериментальной взрывной травмы

¹ ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины»

Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Санкт-Петербург, Россия, ул. Лесопарковая, д. 4

² ООО Инновационная фармацевтическая компания «Сильвер Фарм», 195279, Санкт-Петербург, Россия, Индустриальный пр., д. 45, лит. А

Цель исследования — изучение функции внешнего дыхания при изолированном применении тримеперидина и в составе комбинированной рецептуры в различных дозах на модели экспериментальной взрывной травмы. **Методика.** Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 200—240 г. В качестве анальгетиков использовали субстанцию тримеперидина (опиатный наркотический анальгетик) и дексмететомидина (селективный α -2-адреномиметик). Для изучения влияния анальгетической комбинации на показатели дыхания в условиях травматического шока препараты вводили внутримышечно через 15 мин после моделирования травмы. Дозы тримеперидина при монотерапии составили 1,7 (1 ED₉₉) и 13,6 мг/кг (8 ED₉₉), а в комбинации — 0,574 (1 ED₉₉) и 4,592 (8 ED₉₉) мг/кг при совместном введении с дексмететомидином в дозах 2,8 и 22,4 мкг/кг соответственно. В группе контроля осуществлялось введение физиологического раствора. В динамике у животных регистрировали функцию внешнего дыхания, определяли частоту дыхания (ЧД) и дыхательный объем (ДО), которые фиксировали до травмы (фон) и сразу после повреждения, а также спустя 15, 30 мин, 1, 2 и 24 ч после введения анальгетиков. Также исследовали динамику показателей сатурации кислорода крови (SpO₂) и частоты сердечных сокращений (ЧСС). Регистрацию данных производили в сроки, аналогичные изучению функции дыхания, через 10—15 с после стабилизации пульсовой волны. В работе использовали оригинальную модель взрывной травмы, позволяющую получить у лабораторных животных помимо обширных разрушений мягких тканей развитие общего контузионно-комозионного синдрома. **Результаты.** Показано, что взрывная травма приводит к росту минутного объема дыхания за счет резкого повышения частоты с одновременным сохранением значений дыхательного объема. Назначение тримеперидина в максимально суточной дозе сокращает минутный объем дыхания в 5 раз в сравнении с группой контроля. Введение препарата сопровождалось развитием острой дыхательной недостаточности III степени тяжести у большинства животных и гибелью половины особей в группе. Применение комбинированных обезболивающих рецептур позволяет существенно снизить дозу наркотического анальгетика, повышает безопасность проведения лечебно-эвакуационных мероприятий. **Заключение.** Применение экспериментальной комбинированной анальгетической комбинации тримеперидина и дексмететомидина способствовало сохранению параметров минутного объема дыхания, в основном за счет сохранения частоты дыхательных движений, препятствовало прогрессированию артериальной гипоксемии и предупреждало гибель животных.

Ключевые слова: функция внешнего дыхания; тримеперидин; дексмететомидин; комбинация; взрывная травма.

Для цитирования: Венгерович Н.Г., Юдин М.А., Чепур С.В., Иванов И.М., Строкина Е.И., Колесников А.М. Исследование функции дыхания при применении тримеперидина в составе комбинированной рецептуры на модели экспериментальной взрывной травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 103—109.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.103-109

Для корреспонденции: Венгерович Николай Григорьевич, канд. мед. наук, заместитель начальника отдела ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, e-mail: nickolai@vengerovich.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.02.2016

Vengerovich N.G.¹, Judin M.A.¹, Chepur S.V.¹, Ivanov I.M.¹, Strokina E.I.², Kolesnikov A.M.¹

The study of respiration function under trimeperidine treatment in composition of combined formulation in a model of experimental blast injury

¹ State Scientific Research Test Institute of Military Medicine (The Russian Federation Department of Defense);

4, ul. Lesoparkovaja, St. Petersburg, 195043, Russia

² ООО «Innovative pharmaceutical company «SilverPharm», 45A, Industrial'nyj pr., St. Petersburg, 195279, Russia

The purpose is to study respiratory function in isolated use of trimeperidine and as a part of a combined formulation in various doses in a model of experimental blast trauma. **Methods.** Experiments were carried out in a model of white non-linear male rats weighing 200—240 g. The substance of trimeperidine and dexmedetomidine was used as analgetics. To study the influence of analgesic combination on respiration characteristics following traumatic shock the drugs were injected intramuscularly 15 min following trauma modelling. Doses of trimeperidine in monotherapy were 1,7 (1 ED₉₉) and 13,6 mg/kg (8 ED₉₉) and in combination — 0,574 (1 ED₉₉) and 4,592 (8 ED₉₉) with 2,8 и 22,4 mg/kg of dexmedetomidine respectively. The control group got saline. In dynamics the respiratory function of animals was registered as well as respiratory rate and volume which were also recorded before trauma (background), immediately following injury and 15, 30 min, 1, 2 and 24 hour following analgetics administration. The dynamics of oxygen saturation in blood (SpO₂) and heart rate were also studied. Data registration was carried out in time-limits similar to study of respiration function 10—15 sec following pulse wave stabilization. The original model of blast trauma was used in this research. It allows having both extensive injuries of soft tissues in laboratory animals as well as general commotiocontusionale syndrome. **Results.** It was shown that blast trauma leads to an increase of volume of breath per minute due to rapid rate decrease with simultaneous retention of level of respiratory volume. The administration of trimeperidine in maximum daily dose induces 5-fold reduction of volume of breath per minute in comparison with controls. The injection of the drug was accompanied by the development of an acute respiratory failure (III degree) in majority of animals and death of the half of the group. The application of combined analgesic formulations allows decreasing a dose of narcotic analgetics and enhancing safety of analgesic aid in a system of medical-evacuation measures. **Conclusion.** The application of experimental combined analgesic combination of trimeperidine and dexmedetomidine enables to preserve minute lung volume parameters mainly due to retention of respiratory movement rate; it also inhibits the progression of arterial hypoxemia and prevents from death of the animals.

Keywords: function of external respiration; trimeperidine; dexmedetomidine; combination; blast injury.

For citation: Vengerovich N.G., Judin M.A., Chepur S.V., Ivanov I.M., Strokina E.I., Kolesnikov A.M. The study of respiration function under trimeperidine treatment in composition of combined formulation in a model of experimental blast injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 103—109. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.103-109

For correspondence: Nikolai G. Vengerovich, PhD, Deputy Head of Department of State Scientific Research Test State Scientific Research Test Institute of Military Medicine (The Russian Federation Department of Defense); 4, ul. Lesoparkovaja, St. Petersburg, 195043, Russian Federation, e-mail: nickolai@vengerovich.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Vengerovich N.G., orcid.org/0000-0003-3219-341X

Received 05.02.2016

Введение

Взрывные поражения как особая разновидность боевой травмы [1] представляют собой сочетанную травму, возникающую в результате импульсного воздействия комплекса поражающих факторов взрыва минного боеприпаса и характеризующуюся взаимозависимым и взаимоотягощающим влиянием как глубоких и обширных разрушений тканей, так и общего контузионно-коммоционного синдрома [2]. Частота травм такого рода, к сожалению, возрастает и в мирное время.

В структуре санитарных потерь пострадавшие от минно-взрывного оружия занимают одно из основных мест. Так, если в период войны в Афганистане минно-взрывная травма составляла 25% [3], то, по данным литературы, в отдельные периоды при проведении контртеррористических операций её частота достигала 76%. По сведениям лечебных учреждений внутренних войск МВД России, летальность от минно-взрывных травм составила 28—37%, при этом

значительное число раненых умирало уже после введения их из шока, а у большинства выживших возникали различного рода осложнения.

Тяжелая взрывная травма служит причиной образования массива некробиотически измененных тканей, в которых продолжают действовать устойчивые по отношению к гипоксии ноцицепторы. Аfferентация вследствие возбуждения данных рецепторов имеет сугубо патогенное значение и служит причиной вторичного дефицита тормозных механизмов в популяции нейронов, составляющих генераторы аномально усиленного возбуждения [4]. Ограничение аfferентного входа в ноцицептивную систему и разрывы дуг патологических рефлексов обезболиванием — одна из целей лечения боли после тяжелых ранений и травм [5].

Известно, что в остром периоде после тяжелых ранений индуктором раневой болезни наряду с другими причинами является патологическая боль [6]. После взрывных травм быстрые нейродистрофические

расстройства охватывают все отделы ЦНС и периферические образования, что связывают со структурным закреплением патологических нейрональных интеграций. Анальгетическое пособие в качестве превентивной патогенетической терапии предупреждает стабилизацию патологической алгической системы, что диктует необходимость применения наркотических обезболивающих средств на догоспитальных этапах медицинской эвакуации [7].

Купирование болевого синдрома у раненых и пострадавших является важнейшей задачей для передовых этапов медицинской эвакуации. На сегодняшний день основными обезболивающими средствами для оказания само- и взаимопомощи раненым и пораженным остаются наркотические анальгетики «Тримеперидина гидрохлорид» («Промедол»), 1 мл 2% раствора в шприц-тюбике или ампуле или «Бупренорфин» (0,03% раствор для инъекций по 1 мл в ампуле). Характерным побочным эффектом данных препаратов является угнетение дыхания. В условиях развития травматического шока применение анальгетиков, как правило, сопровождается более выраженным проявлением побочных реакций. Прогрессирующие нарушения функции внешнего дыхания способствуют развитию жизнеугрожающих состояний, что осложняет дальнейшее оказание медицинской помощи и может привести к гибели пострадавших.

Таким образом, необходимость минимизации риска развития нарушений дыхания при условии адекватного обезболивания на фоне тяжелой раневой болезни остается актуальной задачей практической медицины.

Цель исследования — изучение функции внешнего дыхания при изолированном применении тримеперидина и в составе комбинированной рецептуры в различных дозах на модели экспериментальной взрывной травмы.

Методика

Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 200—240 г (питомник Рапполово, Ленинградская область), содержащихся в стандартных условиях вивария. Исследование проводили в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012) и «Правилами лабораторной практики» (2010).

В качестве анальгетиков использовали субстанцию тримеперидина (опиатный наркотический анальгетик, 1,2,5-триметил-4-фенил-4-пиперидинол пропаноат) и дексмететомидина (селективный α_2 -адреномиметик, 4-[*S*]-1-(2,3-диметилфенил)этил]-1H-имидазола гидрохлорид). По результатам ранее проведенных

экспериментов, дозы для компонентов комбинации (тест отдергивания хвоста от объекта теплового излучения) составили для агониста опиоидных рецепторов тримеперидина (промедола) и α_2 -адреномиметика дексмететомидина 0,6 мг/кг и 2,8 мкг/кг соответственно. Использованные дозы не только обеспечивали достижение стойкой анальгезии (1 ED₉₉), но и потенцировали обезболивающий эффект. В указанных дозах в составе одной комбинации препараты оказывали статистически значимо меньшее влияние на функцию внешнего дыхания в сравнении с монотерапией, которую проводили препаратами в одной эффективной или в максимальной суточной дозах 8 ED₉₉ (экстраполяция животным дозировок, рекомендованных человеку). Для изучения влияния анальгетической комбинации на показатели дыхания в условиях травматического шока препараты вводили внутримышечно через 15 мин после моделирования травмы. Дозы тримеперидина при монотерапии составили 1,7 (1 ED₉₉) и 13,6 мг/кг (8 ED₉₉), а в комбинации — 0,574 (1 ED₉₉) и 4,592 (8 ED₉₉) мг/кг при совместном введении с дексмететомидином (2,8 и 22,4 мкг/кг) соответственно. В группе контроля осуществляли введение физиологического раствора.

Функцию внешнего дыхания у животных регистрировали на приборе «ecgTUNNEL» (Emka Technologies, Франция). Определяли частоту дыхания (ЧД) и дыхательный объем (ДО), которые фиксировали до травмы (фон) и сразу после повреждения, а также спустя 15, 30 мин, 1, 2 и 24 ч после введения анальгетиков.

При исследовании динамики показателей сатурации кислорода крови (SpO₂) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) использовали пульсоксиметр «PhysioSuite Monitor for Mice and Rats» (Kent Scientific Corp., США). Для измерения показателей животным в состоянии покоя накладывали универсальный инфракрасный датчик на левую заднюю лапу. Регистрацию данных производили в сроки, аналогичные изучению функции дыхания, через 10—15 с после стабилизации пульсовой волны.

В работе использовали оригинальную модель взрывной травмы [8], позволяющую получить у лабораторных животных помимо обширных разрушений мягких тканей развитие общего контузионно-комоционного синдрома.

Статистический анализ данных выполняли с помощью пакета программ Statistica 12. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0,05. В случае превышения достигнутого уровня значимости статистического критерия этой величины принимали нулевую гипотезу. Проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с использованием

критерия Шапиро—Уилка. Для сравнения центральных параметров групп использовали непараметрические методы (критерии Уилкоксона и Краскела—Уоллиса). Количественные переменные, характеризующие функцию внешнего дыхания, представляли в относительных величинах (% от фона). Для количественных признаков в сравниваемых группах производили оценку средних арифметических и стандартного отклонения ($M \pm SD$).

Результаты и обсуждение

В 1-й серии экспериментов исследовали влияние введения анальгетиков и их комбинации на функцию внешнего дыхания у крыс после взрывной травмы. Динамика изменений ЧД представлена в табл. 1. Различия во всех экспериментальных группах статистически значимы в сравнении с фоном при $p < 0,05$.

После моделирования взрывной травмы у животных отмечали выраженное тахипноэ (увеличение ЧД на 87—96% от исходных значений), сохранявшееся не менее 2 ч после повреждения. В контрольной группе спустя 1 сут. от начала эксперимента регистрировали относительную стабилизацию ЧД (до 123% относительно фоновых значений). При введении тримеперидина в одной эффективной дозе (1,7 мг/кг) каких-либо статистически значимых отличий от показателей контрольной группы отмечено не было. Напротив, при введении агониста опиоидных рецепторов в максимальной суточной дозе (13,6 мг/кг) наблюдали резко выраженное угнетение функции внешнего дыхания — ЧД уже через 15 мин после введения анальгетика составляла $59,7 \pm 4,9\%$ от фоновых показателей. Статистически значимое снижение числа дыхательных движений в группе по сравнению конт-

ролем и с группой введения препарата в дозе 1,7 мг/кг сохранялось на протяжении всего срока наблюдения. Введение опиоидного анальгетика в максимальной дозе на фоне взрывной травмы завершалось летальным исходом. Так, через 1 ч после введения промедола в максимальной суточной дозе отмечалась гибель половины животных в группе.

При оценке влияния на ЧД комбинации средств в дозе 1 ED₉₉ установлено отсутствие статистически значимых различий по сравнению с группой контроля на всех сроках наблюдения. Через 15 мин после введения комбинации промедола и дексметомидина в дозе 8 ED₉₉ регистрировали снижение ЧД до $72,8 \pm 11,5\%$ от фона. Спустя 60 мин от начала эксперимента отмечали уменьшение сдвигов показателей функции внешнего дыхания, что выражалось в статистически значимых отличиях от группы с введением тримеперидина в дозе 13,6 мг/кг. Спустя 1 сут. от начала эксперимента показатели ЧД были сопоставимы с данными группы контроля. Важно отметить, что при введении комбинированной рецептуры, помимо более раннего восстановления функции внешнего дыхания, гибель животных не наблюдалась.

При регистрации ДО статистически значимые различия показателя отмечали через 60 мин после введения препаратов (табл. 2). Введение тримеперидина как в варианте монотерапии, так и в составе комбинации, в дозе 1 ED₉₉ не вызывало статистически значимых различий в сравнении с группой контроля. Через 15 мин после введения тримеперидина на фоне взрывной травмы у крыс фиксировали резкое падение ДО на 45% от фона. В этой группе погибло 50% животных. В остальных экспериментальных группах отличий от группы контроля зарегистрировано не было.

Таблица 1

Влияние однократного внутримышечного введения анальгетических средств на частоту дыхания крыс после взрывной травмы, % от фона (n = 12, M ± SD)

Время	Экспериментальная группа				
	Контроль	Тримеперидин		Комбинация	
		1 ED ₉₉	8 ED ₉₉	1 ED ₉₉	8 ED ₉₉
Фон	100 ± 5,7	100 ± 5,7	100 ± 6,4	100 ± 7,8	100 ± 5,9
После травмы	196,2 ± 10,4	192,9 ± 22,5	181,6 ± 11,3	187,4 ± 19,9	198,2 ± 13,3
15 мин	197,4 ± 9,7	145,1 ± 13,6	59,67 ± 4,9 ■▲	196,8 ± 19,4 ▲	72,76 ± 11,5 ■●
30 мин	202,6 ± 13,4	164,6 ± 12,1	54,18 ± 4,1 ■▲ (n = 8)	191,5 ± 17,4 ▲	59,87 ± 11,5 ■●
1 ч	190,3 ± 12,9	155,1 ± 12,5	53,22 ± 5,6 ■▲ (n = 6)	193,3 ± 20,3 ▲	86,24 ± 4,5 ■●◇
2 ч	177,4 ± 8,9	159,8 ± 15,3	66,83 ± 6,4 ■▲ (n = 6)	190,43 ± 18,3	86,72 ± 5,1 ■●◇
24 ч	123,1 ± 7,0	149,6 ± 23,7	81,21 ± 9,5 ■▲ (n = 6)	144,6 ± 19,4	135,1 ± 25,2 ●◇

Примечание. ▲ — различия с группой введения тримеперидина в 1 ED₉₉ значимы при $p < 0,05$; ● — различия с группой введения комбинации в 1 ED₉₉ значимы при $p < 0,01$; ◇ — различия с группой введения тримеперидина в 8 ED₉₉ значимы при $p < 0,05$; ■ — различия с группой контроля значимы при $p < 0,05$.

Таким образом, по результатам исследования функции внешнего дыхания при моделировании взрывной травмы установлено, что за счет резкого повышения ЧД с одновременным сохранением ДО в контрольной группе возрастал минутный объем дыхания (МОД). При введении тримеперидина в дозе 8 ED₉₉ МОД снижался в 5 раз в сравнении с группой контроля, что, вероятно, и обуславливало декомпенсацию внешнего дыхания и гибель животных. В группе с введением комбинации средств МОД снижался в 2,5 раза, а спустя 2 ч от начала эксперимента приближался к значениям контрольной группы и групп с введением анальгетиков в одной эффективной дозе.

С целью выявления степени тяжести дыхательной недостаточности, развивающейся после применения анальгетиков на модели взрывной травмы, исследовали насыщение артериальной крови кислородом

(SaO₂) методом пульсоксиметрии с одновременной регистрацией ЧСС. Показано увеличение ЧСС после травмы на всех сроках наблюдения во всех экспериментальных группах (в среднем на 30% от фона, табл. 3).

Выявленные изменения могли свидетельствовать о развитии травматического шока II степени тяжести. В группе с введением комбинированной рецептуры в дозе 8 ED₉₉ отмечена тенденция (статистически незначимая) к снижению ЧСС, что может быть связано с прямым влиянием дексмететомидина на гемодинамику. Результаты определения SpO₂ представлены на рисунке.

Данные пульсоксиметрии указывали на прогрессирование острой дыхательной недостаточности (ОДН) до II степени тяжести и нарушений функции сердечно-сосудистой системы в течение не менее 2 ч после моделирования взрывной травмы. Спустя 1 сут.

Таблица 2

Влияние однократного внутримышечного введения анальгетических средств на дыхательный объем крыс после взрывной травмы, % от фона (n = 12, M ± SD)

Время	Экспериментальная группа				
	Контроль	Тримеперидин		Комбинация	
		1 ED ₉₉	8 ED ₉₉	1 ED ₉₉	8 ED ₉₉
Фон	100 ± 9,0	100 ± 6,9	100 ± 4,8	100 ± 9,3	100 ± 7,9
После травмы	88,46 ± 4,3	90,3 ± 8,0	73,51 ± 4,6*	84,79 ± 6,9	72,1 ± 9,3*
15 мин	95,54 ± 9,3	89,1 ± 5,5	55,0 ± 4,1*▲■	79,12 ± 5,8*	73,99 ± 8,2*
30 мин	83,42 ± 8,6	103,97 ± 9,8	72,96 ± 5,1* (n = 8)	91,83 ± 8,5	76,24 ± 8,9*
1 ч	80,71 ± 7,4*	104,28 ± 7,7	75,12 ± 8,5* (n = 6)	100,64 ± 9,0	88,88 ± 10,2
2 ч	95,21 ± 12,7	100,19 ± 11,8	94,51 ± 7,3 (n = 6)	103,9 ± 9,4	99,6 ± 7,8
24 ч	112,68 ± 9,3	119,64 ± 10,6	110,73 ± 9,5 (n = 6)	97,0 ± 5,4	111,04 ± 28,7

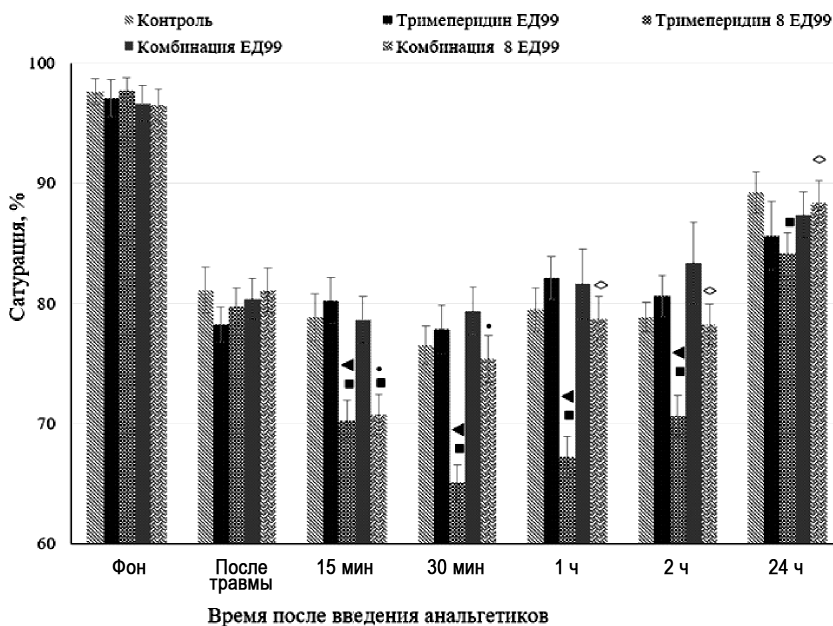
Примечание. * — различия с фоновыми значениями значимы при p<0,05; ▲ — различия с группой введения тримеперидина в дозе 1 ED₉₉ значимы при p<0,05; ■ — различия с группой контроля значимы при p<0,01.

Таблица 3

Влияние однократного внутримышечного введения анальгетических средств на частоту сердечных сокращений у крыс, удары/мин (n = 12, M ± SD)

Время	Экспериментальная группа				
	Контроль	Тримеперидин		Комбинация	
		1 ED ₉₉	8 ED ₉₉	1 ED ₉₉	8 ED ₉₉
Фон	347,7 ± 16,02	348,2 ± 27,41	351,8 ± 21,7	351,5 ± 23,1	350,6 ± 27,5
После травмы	458,7 ± 25,1	474,3 ± 30,1	461,1 ± 17,7	460,8 ± 24,1	459,1 ± 26,1
15 мин	468,8 ± 28,2	455,1 ± 24,5	473,1 ± 19,2	471,1 ± 29,2	420,2 ± 38,5
30 мин	463,2 ± 28,6	430,2 ± 26,2#	460,6 ± 23,2 (n = 8)	461,5 ± 22,3	415,8 ± 34,1#
1 ч	449,6 ± 20,2	452,75 ± 17,5	451,6 ± 24,8 (n = 6)	449,7 ± 25,1	439,2 ± 34,5#
2 ч	431,8 ± 23,3	430,2 ± 15,3#	432,2 ± 25,6# (n = 6)	430,5 ± 33,7#	427,8 ± 27,1#
24 ч	400,6 ± 17,7	402,4 ± 20,6#	402,6 ± 23,7# (n = 6)	403,2 ± 19,3#	392,1 ± 20,2#

Примечание. # — различия со значениями после травмы статистически значимы при p<0,05. Различия во всех группах статистически значимы в сравнении с фоном при p<0,05.



Влияние однократного внутримышечного введения анальгетических средств на SpO₂ у крыс (n = 12, M ± SD), %. По оси абсцисс — время после введения анальгетиков (мин). По оси ординат — сатурация кислорода (%). Различия статистически значимы в сравнении с фоном при p<0,05: ▲ — различия с группой введения тримеперидина в дозе 1 ED₉₉ значимы при p<0,05; ● — различия с группой введения комбинации в дозе 1 ED₉₉ значимы при p<0,01; ◇ — различия с группой введения тримеперидина в дозе 8 ED₉₉ значимы при p<0,05; ■ — различия статистически значимы по отношению к группе контроля при p<0,05.

от начала эксперимента в контрольной группе отмечали рост сатурации кислорода, что свидетельствовало об уменьшении степени тяжести ОДН. Динамику, схожую с показателями контрольной группы регистрировали и после введения исследуемых анальгетиков в дозе 1 ED₉₉. В группе с введением тримеперидина в дозе 8 ED₉₉ через 15 мин у большинства крыс регистрировали ОДН III степени тяжести со снижением сатурации до 70,25 ± 1,67% и последующим ее падением до 65—57% на 30 мин и 1 ч соответственно. При введении комбинированной анальгетической рецептуры в больших дозах, несмотря на падение SpO₂ через 15 мин, на последующие сроки отмечали статистически значимое повышение сатурации в сравнении с группой введения тримеперидина в дозе 13,6 мг/кг. Остальные данные не отличались от показателей контрольной группы.

Полученные данные позволили заключить, что при экспериментальном моделировании взрывной травмы у животных развивается ОДН II степени тяжести, что подтверждается результатами измерений функции внешнего дыхания и пульсоксиметрией. Возникающая вследствие травмы патологическая вариабельность вентиляционно-перфузионных отношений в легких, обуславливает артериальную гипоксемию, усугубляющуюся на фоне применения агонистов опиоидных рецепторов на примере тримеперидина. Установлено, что введение тримеперидина в максимальной суточной до-

зе на модели взрывной травмы вызывает гибель 50% животных в группе. Применение комбинированных обезболяющих рецептур позволяет существенно снизить дозу наркотического анальгетика, повышает безопасность оказания анальгетического пособия в системе лечебно-эвакуационных мероприятий. Проведенное исследование подтверждает целесообразность рассмотрения комбинированных обезболяющих рецептур на основе агонистов опиоидных рецепторов и центральных α₂-адреномиметиков в качестве перспективных анальгетических средств.

References

1. Gumanenko E.K., Samokhvalov I.M., eds. *Military field surgery of local wars and armed conflicts: a guide for physicians. [Voenno-polevaya hirurgiya lokal'nyh voyn i vooruzhennykh konfliktov: rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
2. Bisenkov L.N., ed. *Surgery mine-explosive injuries. [Hirurgiya minno-vzryvnykh raneniy]*. Saint-Petersburg: Akropol'; 1993. (in Russian)
3. Bogomolov B.N., Pantelev A.B., Polushin Ju.S. Reanimatological equipment in blunt trauma. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 1998; 2: 11-6. (in Russian)
4. Kryzhanovskiy G.N. General pathophysiology of the nervous system. *[Obshhaya patofiziologiya nervnoy sistemy]*. Moscow: Meditsine; 1997. (in Russian)
5. Popov V.A. *Physiological bases military-field and emergency surgery. [Fiziologicheskie osnovy voenno-polevoy i neotlozhnoy hirurgii]*. Saint-Petersburg: ELBI-SPb; 2003. (in Russian)

6. Shanin V.Ju. *Pathophysiology of critical conditions. [Patofiziologiya kriticheskikh sostojaniy]*. Saint-Petersburg: EL-BI-SPb.; 2003. (in Russian)

7. Samohvalov I.M. *Guidance on military surgery. [Ukazaniya po voenno-polevoj hirurgii]*. Moscow: MMMD DoD RF; 2013. (in Russian)

8. Shperling I.A., Vengerovich N.G., Shipanov S.G. Modelling of explosive injuries of soft tissues in small laboratory animals for evaluating the effectiveness of regenerative therapy. *Vestnik BGTU: Innovatsionnye tehnologii i tehnicheskie sredstva special'nogo naznacheniya*. 2015; 23: 173-7.

Сведения об авторах:

Юдин Михаил Анатольевич, доктор мед. наук доцент, начальник отдела ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации

Чепур Сергей Викторович, доктор мед. наук, проф., начальник ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации

Иванов Игорь Михайлович, канд. мед. наук, заместитель начальника отдела ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации

Строкина Елена Игоревна, науч. сотр. ООО Инновационная фармацевтическая компания «Сильвер-Фарм»

Колесников Александр Маратович, науч. сотр. отдела ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации

© Пальцын А.А., 2017
УДК 616-092

Пальцын А.А.

Матриксные протеиназы при инсульте

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8
ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», 123995, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

Матриксные металлопротеиназы — ферментный комплекс, необходимый для сохранения гомеостаза. Он участник нормальной, постоянно текущей реконструкции всех живых тканей. Действие патогенных факторов нарушает слаженную работу этого комплекса. Часто нарушение выражается излишней активностью ферментов, усиливающей патогенное действие. Однако и заживление, форсированное новообразование тканевых элементов, может происходить только при повышенной, в сравнении с нормой, активности металлопротеиназ. Такая ситуация требует от медицины умения разумно вмешиваться в работу ферментной системы. В статье представлены некоторые результаты этих вмешательств.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы; инсульт; гематоэнцефалический барьер; терапия инсульта.

Для цитирования: Пальцын А.А. Матриксные протеиназы при инсульте *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(3): 110—115. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.110-115

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. Института общей патологии и патофизиологии РАН, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАПО, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.12.2016

Paltsyn A.A.

Matrix metalloproteinases in stroke

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia
Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

Matrix metalloproteinases — enzyme complex necessary for maintenance of the homeostasis. He is a participant of normal, constantly current reconstruction of all living tissues. Action of pathogenic factors breaks harmonious work of this complex. Often violation is expressed by the excessive activity of enzymes amplifying pathogenic action. However and healing, which is accelerated new growth of tissue elements, can happen only at raised, compared with norm, metalloproteinase activity. Such situation demands from medicine of ability participate reasonably in work of enzyme system. The article presents some of the results of these actions.

Keywords: matrix metalloproteinases; stroke; blood brain barrier; stroke care.

For citation: Paltsyn A.A. Matrix metalloproteinases in stroke. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 110—115. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.110-115

For correspondence: Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru

Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 11.12.2016

В последние годы появилось много статей [1, 2] о наблюдаемом после инсульта и травмы мозга разрушении гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), обусловленном действием матриксных металлопротеиназ (ММП). ММП — семейство (24 фермента у человека) кальций-зависимых, содержащих цинк эндопептидаз, способных расщеп-

лять все компоненты внеклеточного матрикса (ВМ), включая коллаген, ламинин, фибронектин и другие [3]. Есть сообщения и о более широком списке расщепляемых ММП субстратов: молекулы клеточной поверхности, хемокины, цитокины, рецепторы цитокинов, факторы роста и их рецепторы, ферменты [4—7].

Соответственно теме этой статьи нас более всего интересуют структуры ВМ, которые участвуют в образовании ГЭБ. Меньшая (сравнительно с другими капиллярными сетями) проницаемость капиллярной стенки мозга, создающая эффект ГЭБ, обеспечивается слоем эндотелиальных клеток, соединенными между собой плотными контактами. Среди белков плотных контактов различают claudin-1, claudin-5, occludin [8]. Плотные контакты — не единственная особенность эндотелиоцитов мозга — в них снижен трансцитоз (пиноцитоз), повышено содержание митохондрий, существенно отличается набор мембранных рецепторов. С внешней стороны слой эндотелиоцитов окружен базальной мембраной. Базальная мембрана, благодаря заряду и компановке входящих в её состав белков, представляет собой молекулярный фильтр. В базальную мембрану встроены перициты. Так устроены все сосуды тела, но в мозге перициты имеют особенности. Многие структурно-функциональные характеристики ГЭБ зависят от перицитов. Особое положение и значение перицитов, входящих в ГЭБ, иллюстрируется уже их повышенным содержанием. В ЦНС отношение перициты/эндотелиоциты бывает 1/1—1/3, тогда как в других участках тела, например в мышце: 1/10—1/100. Морфологическая особенность, присущая только ГЭБ, заключается в том, что базальная мембрана снаружи охватывается ножками астроцитов. Это анатомическое свойство обеспечивает особо тесное взаимодействие нервной и циркуляторной систем и служит основанием для формулирования понятия о нейроваскулярном комплексе (neurovascular unit) [9]. В связях между перицитами и астроцитами участвуют рецепторы — интегрины. Будучи одним из видов ВМ, базальная мембрана капилляров мозга расщепляется при активации ММП, расщепляются интегрины и белки плотных контактов эндотелиальных клеток [10]. Нарушается плотность контактов между эндотелиоцитами [11].

Наиболее часто описывают при инсульте желатиназу (коллагеназу IV) ММП-9. Она участвует не только в разрушении ГЭБ и развитии отека после инсульта, но и в геморрагических осложнениях, случающихся при терапии ишемического инсульта тканевым активатором плазминогена (tPA) [12].

Очевидно, что эволюция не сохранила бы и не развивала миллионы лет ферментную систему, способную только на усугубление повреждающего действия инсульта, травмы мозга и многих осложнений при действии других этиологических факторов. Конечно, эволюционная успешность комплекса ММП обусловлена их благотворным действием, способностью динамически ремоделировать ВМ и поэтому, быть необходимым элементом процессов роста, развития,

миграции клеток, ангиогенеза, регенерации, заживления ран. Таким образом, интерес к ММП для медико-биологических исследований заключается в том, что зная механизмы работы этой системы и научившись разумно вмешиваться в них, можно ослаблять патогенное действие болезни и усиливать регенераторные способности организма. Область регулирования активности ММП очень привлекательна для исследований как перспектива терапии многих заболеваний. В настоящее время найдены ингибиторы для ММП -1, -2, -3, -7 и -9, однако не известны регуляторы активности ММП -15, -18, -21, и -24 [13].

Активность ММП контролируется на трех стадиях их «производственного цикла»:

- 1) транскрипции;
- 2) активации;
- 3) ингибиции [13].

В организме млекопитающих в норме транскрипция ММП происходит повсеместно, но на низком уровне [14]. Обнаружены конститутивно транскрибируемые ММП-2 и ММП-14 и индуцибельно транскрибируемые ММП-3 и ММП-9 [8]. Их равновесие в гомеостазе поддерживается секрецией в неактивной форме, что защищает внутреннюю среду организма от повреждения ими. Опасная возможность их активации в норме быстро блокируется четырьмя тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (tissue inhibitors metalloproteinases TIMPs) [13, 15]. Индукцию металлопротеиназы-9 можно подавить и искусственно дексаметазоном [16]. Нормальная степень конститутивной активации ММП пространственно ограничена базальной мембраной, обеспечивает её стабильное в отношении толщины состояние. Иными словами, протеиназы блокируют увеличение массы ВМ. Индуцибельные ММП либо не транскрибируются, либо остаются в неактивном состоянии до повышения концентрации активаторов: ионов Ca^{2+} [17], провоспалительных цитокинов, реактивных форм кислорода (reactive oxygen species — ROS), оксида азота, гипоксии [14, 18]. Будучи активированными индуцибельные ММП не ограничивают свое действие местом активации, а вызывают распространенную перестройку или разрушение ВМ. В зависимости от временного параметра активации часто меняется её биологическое значение. Это может быть:

- 1) поддержание гомеостаза в процессах развития;
- 2) повреждение, чаще в начальной стадии болезни;
- 3) регенерация на поздней стадии.

Эти особенности следует учитывать при терапии неврологических расстройств [19]. Продукция ММП-3 и ММП-9 при инсультах может быть индуцирована [20] в нейронах, олигодендроцитах, эндотелиоцитах, астроцитах, микроглиоцитах, макрофагах и нейтрофилах (если они присутствуют в очаге).

Наиболее известные индукторы цитокины TNF- α и IL- β , но, конечно, свою лепту вносят и другие биологически активные молекулы очага. Действие ММП повышает проницаемость ГЭБ, вызывает отек мозговой ткани, эксайтотоксичность, оксидативный стресс, нарушение репаративного синтеза ДНК, не всегда, но часто лейкоцитарную инфильтрацию [21]. Проницаемость ГЭБ и отек мозга часто способствуют появлению кровоизлияний [22]. Важными для современной клинической практики оказались данные о том, что неудачи позднего (после 3 ч от начала болезни) тромболизиса обусловлены тем, что tissue plasminogen activator (tPA) активирует ММП-9 [2, 23]. При достаточной выраженности этих изменений развивается некроз ткани мозга.

Роль ММП в патогенезе очаговых поражений мозга исследовали разными способами. При травме мозга у нокаутных по гену ММП-9 мышей наблюдали меньшую проницаемость ГЭБ, уменьшение размера очагов, большее сохранение двигательной функции и белого вещества сравнительно с дикими мышами [21]. В других экспериментах исследовали роль тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 (ТИМП-1). Он с высокой аффинностью связывает ММП-9 и тем блокирует её действие. У мышей с трансгенно форсированной экспрессией ТИМП-1 сравнительно с дикими мышами после 2 ч фокальной ишемии мозга обнаружили сниженный уровень ММП-9, менее выраженный отек и меньший объем очага через 24 ч [25]. Противоположные результаты были получены у нокаутных по ТИМП-1 мышей: увеличение экспрессии ММП-9, желатинолитической активности, ишемических повреждений, апоптоза нейронов [26].

Лечение тканевыми ингибиторами ММП или нейтрализующими ММП антителами уменьшает повреждение ГЭБ и размер ишемического очага [27].

Оказалось, что примерно одинаково благотворное действие на исход экспериментального инсульта оказывают ингибитор ММП (BB1101) и нормобарическая оксигенация (95% O₂). Снижается содержание ММП-9, уменьшается потеря белка плотных контактов окклюдина, уменьшается объем экстравазатов в ишемизированном полушарии [28].

Развитием этого направления (изучение патогенеза по действию экспериментальной терапии) стала работа [29]. Авторы исследовали комбинированное и изолированное действие двух ингибиторов ММП после 90-минутной окклюзии средней мозговой артерии. Изучали влияние нормобарической оксигенации (95% O₂), снижающей ишемическую индукцию ММП и действие миноциклина (производное тетрациклина), ингибирующего активацию ММП. Применение изолированной оксигенации уменьшало объем

очагов ишемии на 36%. Изолированное применение миноциклина уменьшало объем очагов на 30%. При комбинированном применении ингибиторов объем очагов уменьшался на 68%, снижалась индукция ММП-2/9 и активация каспазы-3 и -9. В большей степени, чем при одиночном ингибировании сохранялся окклюдин. В эксперименте, выполненном по той же схеме, но с применением метиленового синего вместо миноциклина, обнаружено, кроме уменьшения объема очага, более быстрое восстановление функции, нежели при использовании лишь одного из ингибиторов [30].

Сравнительно недавно обнаружено, что так называемые матриксные металлопротеиназы не только матриксные, т.е. осуществляющие протеолиз экстрацеллюлярного белка.

Оказалось, что они могут располагаться в различных интрацеллюлярных зонах, в том числе в ядре [31]. После 2-часовой окклюзии средней мозговой артерии у крыс авторы наблюдали в центральной зоне инсульта совмещение желатиназной активности ядра с маркером зрелых нейронов NeuN. Авторы подают это наблюдение как обусловленную действием желатиназы гибель нейронов. Думаю, такие находки не стоит считать доказательствами гибели нейрональных ядер под действием ММП. В центре очага инсульта много губительных факторов. Однако в дальнейшем эти наблюдения были развиты. В 2010 г. Y. Yang с сотр. из университета штата Нью-Мексико [32] обнаружили после окклюзии средней мозговой артерии и в культуре нейронов, что метка ММП ядер предшествует мечению цитоплазмы и на 20 ч опережает фрагментацию ДНК в ядрах. Ядерные ММП разрушали белки репаративного синтеза ДНК и ускоряли появление апоптоза. Применение ингибитора ММП — BB1101 существенно снижало деструкцию ядер. Увеличение внутриядерной экспрессии ММП находили и в образцах мозга, полученных из клиники. Через 2 года из этого же учреждения вышла работа с целью проверки и уточнения предыдущих результатов на культуре корковых нейронов [33]. В качестве модели ишемии/реперфузии применили кислород-глюкозную депривацию культуры в течение 2 ч. Сразу после реоксигенации увеличивалась внутриядерная активность желатиназы (увеличивался уровень как ММП-2, так и ММП-9 в ядерном экстракте) и оставалась максимальной в течение 24 ч. Внеклеточный уровень желатиназы не изменялся. Статистически значимо снижалась экспрессия двух белков репаративного синтеза ДНК. Обработка нейронов ММП-2/9 ингибитором значительно снижала желатинозную активность, сохраняла ферменты репарации ДНК и жизнеспособность нейронов после кислород-глюкозной депривации.

Группа Yang'a из университета Нью-Мексико провела ориентированные на терапию исследования роли ММП при экспериментальном инсульте [34]. Для большего сходства с болезнью человека работали со спонтанно гипертензивными крысами (фактор риска). Производили 90-минутную окклюзию средней мозговой артерии и исследовали материал на различных сроках после начала реперфузии. После однократного в начале ишемии применения ингибитора ММП — GM6001 наблюдали статистически значимо более благоприятное течение процесса заживления инсульта. Размер некротической зоны через 3—4 нед. был заметно меньше, чем в контроле. Увеличивалось через 3 нед. число новообразованных (NG2 и Ki67 позитивных) сосудов в перинфарктной зоне и экспрессия в них белков плотных контактов. Экспрессия таких белков, а также VEGF обнаруживалась в эндотелиоцитах, перицитах и астроцитах. Описывают это наблюдение как экстраэндотелиальное формирование плотных контактов и участие ММП (синтезированных эндотелиоцитами, перицитами и астроцитами) в восстановлении ГЭБ. Появление NG2⁺ перицитов способствует миграции и морфогенезу эндотелиоцитов при неоваскуляризации. Считают, что кратковременное ингибирование ММП на раннем сроке после инсульта способствует регенерации нейроваскулярного комплекса на позднем сроке. Одно из объяснений нейропротективного действия раннего ингибирования ММП — снижение проницаемости ГЭБ, а следовательно, притока нейротоксичных компонентов крови и, прежде всего нейтрофилов, продуцирующих ММП-9.

Развивая экспериментальную работу по ММП опосредованной терапии инсульта, тот же коллектив опубликовал статью, целью которой было изучение механизма действия уже применяющегося в клинике [35] ингибитора ММП — миноциклина [36]. Инсульт воспроизводили так же, как описано в предыдущей [34] публикации. В начале реперфузии крысы получали одну внутривенную инъекцию миноциклина 3 мг/кг. В контроле вводили растворитель. Через 2—4 нед. в опыте наблюдали (магнитно-резонансная томография) уменьшение зоны инфаркта, увеличение кровотока, меньшую проницаемость ГЭБ, более высокую экспрессию белков плотных контактов. Через 4 нед. обнаружено увеличение содержания ММП-2 и ММП-3, увеличение экспрессии маркера активации микроглии/макрофагов. Микроглиоциты/макрофаги экспрессируют как провоспалительные, так и противовоспалительные факторы. Миноциклин значительно снижал уровень экспрессии провоспалительных (TNF- α и IL-1 β) и увеличивал уровень экспрессии противовоспалительных (TGF- β и IL-10) факторов.

В итоговом обзоре авторы из университета Нью-Мексико [37], имея в виду разрушительную роль внеклеточной и внутриядерной активности ММП, подчеркивают привлекательность терапевтического использования ингибиторов ММП на ранних сроках после инсульта. Они считают, что доклиническое изучение вопроса представило настолько однозначный материал, что можно рекомендовать клинические испытания. В то же время продолжительное (7 и более суток после инсульта) использование ингибиторов ММП может осложнять течение инсульта, уменьшать число сохранившихся нейронов, тормозить ангиогенез. Считают разумным краткосрочное использование в качестве ингибитора миноциклина в остром периоде с заменой его в дальнейшем препаратами, не нарушающими развитие васкуляризации.

Следует отметить, что адресованную клиницистам рекомендацию экспериментаторов из Нью-Мексико не стоит принимать как признак того, что клиника ещё не обращала внимания на ММП. Уже в 2010 г. были опубликованы [38] результаты клинического испытания терапии инсульта миноциклином на 60 больных (средний возраст $65 \pm 13,7$ года). Период полувыведения миноциклина был около 24 ч. Внутривенные инъекции начинали не позднее 6 ч после появления симптомов. Дозы от 3 до 10 мг/кг однократно в сутки в течение 3 дней. Высшую дозу — 10 мг/кг получил 41 больной. У 60% больных лечение миноциклином сочеталось с введениями tPA и такое сочетание не осложнялось кровоизлияниями. Больных наблюдали в течение 90 дней. Миноциклин называют «идеальным» партнером tPA при лечении инсульта.

Есть и другое направление в ММП опосредованной экспериментальной терапии инсульта. Оно основывается на принципе *патологией активируемой терапии* (pathologically activated therapy — PAT) [39]. Создается лекарственный препарат, который связывается с молекулой — мишенью через участок, открывающийся только в патологических условиях, например, при оксидативном стрессе. Нормализация патологии закрывает участок связывания. Вторым вариантом действия PAT препарата: подбор такой скорости ассоциации-диссоциации с мишенью, чтобы блокировались не все мишени, а только их избыток. В 2012 г. появилась статья большого коллектива авторов с описанием результатов PAT экспериментального инсульта [40]. Исследовали препарат SB-3CT, который авторы называют селективным ингибитором ММП. Инсульт создавали закупоркой средней мозговой артерии эмболом аутокрови. SB-3CT вводили внутривенно в дозе 25 мг/кг, в первый день через 2 и 4 ч после эмболии, затем однократно с 1-х по 6-е сут. Оценку результатов производили через 7

сут. Лечение уменьшало объемы инфаркта, и кровоизлияний, улучшало двигательную активность животных (через 1 сут. она была хуже, чем в контроле), снижало уровень ММП-9, увеличивало экспрессию ламинина и белков плотных контактов, обеспечивало большее сохранение ламинин-положительных перicyтов и эндотелиоцитов, уменьшало апоптоз нейронов.

Первостепенное значение расстройств и восстановления циркуляции для исхода инсульта обуславливает перспективность дальнейших исследований, направленных на регулирование ингибированием-активацией ММП патогенеза и саногенеза инсульта. Как отмечалось выше, ингибирование ММП в начале болезни способно уменьшать деструктивные изменения в очаге. В то же время, для развития восстановительных процессов необходима активность ММП. Ангиогенез может начинаться только от уже присутствующих в очаге сосудов и только с помощью ММП. Они необходимы для частичной деградации базальной мембраны «старых» сосудов и перестройки окружающего ВМ, для нарушения связей между эндотелиоцитами, чтобы они и перicyты могли отделяться от «старого» сосуда и смещаться в окружающую ткань, для высвобождения ангиогенных факторов роста и проангиогенных интегринов, связанных с ВМ [41]. Формирующиеся и сформировавшиеся сосуды становятся основой регенерации всего тканевого комплекса мозга: дендритогенеза, синаптогенеза, глиогенеза, нейрогенеза (там, где он возможен — например, в гиппокампе). Сосудистая сеть не только обеспечивает обменные процессы комплекса, но и служит направляющей для миграции нейральной стволовой клетки — прародительницы глиоцитов и нейронов [8].

References

1. Turner R.J., Sharp F.R. Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front. Cell. Neurosci.* 2016; 04 March.
2. Abdul-Muneer P.M., Pfister B.J., Haorah J., Chandra N. Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol.* 2015; Nov 5.
3. Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Rudd P.M., Dwek R. A., Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2002; 37: 375-536.
4. Rodríguez D., Morrison C.J., Overall C.M. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803: 39-54.
5. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003; Jul; 200(4): 448-64.

6. Shkorik E.V., Markelova E.V., Silaev A.A., Geltser B.I., Semenikhin A.A., Fedjanina L.N. Matrix metalloproteinases-1, 8, 9 and the risk of cardiovascular complications in patients with CHD before and after myocardial revascularization. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2017; 61 (2): 37-45. (in Russian)

7. Akhmedov V.A., Dolgikh V.T., Naumov D.V., Nechiporenko N.A. The participation of matrix metalloproteinase-9 and TIMP-1 in formation of atrial fibrillation paroxysms in patients with metabolic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2013; 57 4: 46-50. (in Russian)

8. Yang Y., Rosenberg G.A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res.* 2015; Oct 14; 1623: 30-8.

9. Zlokovic B.V. Neurodegeneration and the neurovascular unit. *Nature medicine.* 2010; December; 16(12): 1370-1.

10. Yang Y., Estrada E.Y., Thompson J.F., Liu W., Rosenberg G.A. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27: 697-709.

11. Baeten K.M., Akassoglou K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol.* 2011; Nov; 71(11): 1018-39.

12. Lapchak P.A., Chapman D.F., Zivin J.A. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke.* 2000; 31: 3034-40.

13. Mittal R., Patel A.P., Debs L.H., Nguyen D., Patel K., Grati M. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol.* 2016; May 17.

14. Rempe R.G., Hartz A.M., Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016; Jun 20.

15. Hartmann C., El-Gindi J., Lohmann C., Lischper M., Zeni P., Galla H.J. TIMP-3: a novel target for glucocorticoid signaling at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390: 182-6.

16. Nam S.I., Kwon T.K. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression in cochlear cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2014; 7: 175-80.

17. Surin A.M., Krasilnikova I.A., Pinelis V.G., Khodorov B.I. Study of the relationship between glutamate-induced delayed calcium deregulation, mitochondrial depolarization and subsequent neuronal death. *Pathogenesis.* 2014; 4: 40-6.

18. Deem T.L., Cook-Mills J.M. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood.* 2004; 104: 2385-93.

19. Yang Y., Hill J.W., Rosenberg G.A. Chapter 6 — multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011; 99: 241-63.

20. Lakhani S.E., Kirchgessner A., Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 2009; Nov 17; 7:97.

21. Chaturvedi M., Kaczmarek L. MMP-9 Inhibition: a Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol.* 2014; 49(1): 563-73.

22. Zhao B.Q., Wang S., Kim H.Y., Storrie H., Rosen B.R., Mooney D.J. et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med.* 2006; 12(4): 441-5.

23. Sumii T., Lo E.H. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke*. 2002; 33(3): 831-6.
24. Ramos-Fernandez M., Bellolio M.F., Stead L.G. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2011; 20(1): 47-54.
25. Tejima E., Guo S., Murata Y., Arai K., Lok J., van Leyen K. et al. Neuroprotective effects of overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-1. *J Neurotrauma*. 2009; 26(11): 1935-41.
26. Fujimoto M., Takagi Y., Aoki T., Hayase M., Marumo T., Gomi M. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(10): 1674-85.
27. Rosenberg G.A., Estrada E.Y., Dencoff J.E. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998; 29, 2189-95.
28. Liu W., Hendren J., Qin X.J., Shen J., Liu K.J. Normobarichyperoxia attenuates early blood-brain barrier disruption by inhibiting MMP-9-mediated occludin degradation in focal cerebral ischemia. *J. Neurochem*. 2009; 108, 811-20.
29. Jin X., Liu J., Liu K.J., Rosenberg G.A., Yang Y., Liu W. Normobarichyperoxia combined with minocycline provides greater neuroprotection than either alone in transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2013; Feb; 240: 9-16.
30. Rodriguez P., Zhao J., Milman B., Tiwari Y.V., Duong T.Q. Methylene blue and normobarichyperoxia combination therapy in experimental ischemic stroke. *Brain Behav*. 2016; May 4; 6(7):e00478.
31. Amantea D., Corasaniti M.T., Mercuri N.B., Bernardi G., Bagetta G. Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience*. 2008; 152, 8-17.
32. Yang Y., Candelario-Jalil E., Thompson J.F., Cuadrado E., Estrada E.Y., Rosell A. et al. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2010; Jan; 112(1): 134-49.
33. Hill J.W., Poddar R., Thompson J.F., Rosenberg G.A., Yang Y. Intranuclear matrix metalloproteinases promote DNA damage and apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation in neurons. *Neuroscience*. 2012; Sep 18; 220: 277-90.
34. Yang Y., Thompson J.F., Taheri S., Salayandia V.M., McAvoy T.A., Jeff W. et al. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013; 33(7): 1104-14.
35. Fagan S.C., Cronin L.E., Hess D.C. Minocycline Development for Acute Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2011; Jun 1; 2(2): 202-8.
36. Yang Y., Salayandia V.M., Thompson J.F., Yang L.Y., Estrada E.Y., Yang Y. Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood-brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *Journal of Neuroinflammation*. 2015; 12: 26.
37. Kimura-Ohba S., Yang Y. Oxidative DNA Damage Mediated by Intranuclear MMP Activity Is Associated with Neuronal Apoptosis in Ischemic Stroke. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 6927328.
38. Fagan S.C., Waller J.L., Nichols F.T., Edwards D.J., Pettigrew L.C., Clark W.M. et al. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. *Stroke*. 2010; Oct; 41(10): 2283-7.
39. Lipton S.A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(10): 803-8.
40. Jiankun C., Shanyan Ch., Chunyang Z., Fanjun M., Wei W., Rong H. et al. Inhibition of MMP-9 by a selective gelatinase inhibitor protects neurovasculature from embolic focal cerebral ischemia. *Mol Neurodegener*. 2012; 7: 21.
41. Rundhaug J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005; Apr-Jun; 9(2): 267-85.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 612.822.1:616-006.6

Бочаров Е.В.¹, Кучеряну В.Г.², Бочарова О.А.¹

Функциональные грани дофаминергической системы и рак (часть 1)

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 24

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

Обзор посвящен многогранности дофаминергической системы. Дофамин синтезируется в центральной нервной системе и желудочно-кишечном тракте. В первой части обзора представлены современные данные литературы о роли дофамина в процессе старения. Обсуждаются также механизмы, лежащие в основе депрессивного расстройства с точки зрения участия дофаминергической системы в плане объединения некоторых концепций: моноаминергической, воспалительной, эпигенетической, нейротрофинной и анти-апоптической.

Ключевые слова: дофаминергическая система; дофаминовые рецепторы; старение; депрессивное расстройство; болезнь Паркинсона.

Для цитирования: Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О.А. Функциональные грани дофаминергической системы и рак (часть 1). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(3): 116—126.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.116-126

Для корреспонденции: Бочаров Евгений Валерьянович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунофармакологии, e-mail: imufarm@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.01.2017

Bocharov E.V.¹, Kucheryanu V.G.², Bocharova O.A.¹

Functional facets of dopaminergic system and cancer.

Part 1

¹ Federal State Budgetary Institution «N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russia

² The Institute of general pathology and pathophysiology. 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia

The review is devoted to multifunctional properties of dopaminergic system. Dopamine is synthesized in the central nervous system and gastrointestinal tract. The first part of the review presents the current literature data on the role of dopamine in the aging process. We also discuss the mechanisms underlying depressive disorder in terms of participation of the dopaminergic system to bring together some concepts: monoaminergic, inflammatory, epigenetic, neurotrophins and anti-apoptotic.

Keywords: dopaminergic system; dopamine receptors; aging; stress; depression; Parkinson's disease.

For correspondence: Bocharov E.V., Senior Researcher Federal State Budgetary Institution «N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russia, E-mail: imufarm@rambler.ru

For citation: Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Bocharova O.A. Functional facets of dopaminergic system and cancer. Part 1. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 116—126. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.116-126

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Bocharov E.V., <http://orcid.org/0000-0003-2342-9881>

Kucheryanu V.G., <http://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

Bocharova O.A., <http://orcid.org/0000-0002-6365-2888>

Received 10.01.2017

Список сокращений

БП — болезнь Паркинсона
 ГВК — гомованилиновая кислота
 ГНС — гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
 ГНТФ — глиальный нейротрофический фактор
 ДА — дофамин, 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламин
 ДАТ — дофаминовый транспортёр
 ДОФА — диоксифенилуксусная кислота
 ДР — депрессивное расстройство
 МАО — моноаминоксидаза
 МНТФ — мозговой нейротрофический фактор
 НА — норадреналин
 ОФЭКТ — однофотонная эмиссионная компьютерная томография
 ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография
 ТГ — тирозингидроксилаза
 ФРН — фактор роста нервов
 D — дофаминовый рецептор
 FOXO3A — фактор транскрипции, усиливающий экспрессию белков Bcl-2
 GR — глюкокортикоидные рецепторы
 5-НТ — серотонин
 5-HT₁ — рецепторы серотонина
 L-ДОФА — L-дигидроксифенилаланин
 SN — substantia nigra, черная субстанция
 VEGF — фактор роста эндотелия сосудов
 ФРФ — фактор роста фибробластов

В современном мире мы постоянно подвержены стрессу. В то время как острый стресс может иметь положительное воздействие на организм, постоянное стрессирование как правило наносит вред здоровью, приводя к серьезным заболеваниям, в том числе к раку, который считают болезнью старения. К тому же, учитывая «адгезионную» концепцию возникновения новообразований, онкологическое заболевание можно расценивать как стремительное старение клеток органа [1]. В связи с этим использование препаратов-геропротекторов и антидепрессантов может быть актуально при онкологических заболеваниях. Поскольку данные литературы говорят в пользу того, что недостаток дофамина не только играет существенную роль при старении и стрессе, но также усиливает развитие опухолей [2], нами выдвигается гипотеза о роли центральных нейрональных процессов с участием дофаминергической системы в стрессорных пусковых механизмах развития злокачественных новообразований.

Роль дофамина в процессе старения

В течение 50 лет, с момента открытия, дофаминергические нейроны являются одними из наиболее широко изучаемых структур головного мозга. Несмотря на то, что некоторые нейроны могут жить более 100 лет, а процесс нейрогенеза способен заменять погибшие нейроны, в течение жизни все же происходит функциональное угасание дофаминергической системы. Дофаминергические нейроны полагают основными факторами старения, а функциональное подавление дофаминергической системы может быть одним из основных механизмов этого процесса [3—6].

Старение отражает снижение когнитивных и двигательных функций, связанных с многими подтипами нейронов. Участки мозга, вовлеченные в регуляцию двигательных функций, очень чувствительны к окислительному стрессу, который усугубляется с возрастом [7, 8]. Снижение двигательной функции (брадикинезия) является серьезным признаком старения, которое отражает качественные и количественные изменения функции дофамина (ДА) в substantia nigra (SN) и стриатуме [9]. Нигростриатная система наиболее восприимчива к потере функции дофаминергических нейронов при старении [10]. В молодом возрасте у людей обнаруживают чрезвычайно большое число ДА-ергических нейронов в SN. Установлено, что в SN мозга новорожденных насчитывается около 400 000 таких нервных клеток. К 60 годам их число уменьшается до 250 000. Пожилой возраст является основным фактором риска развития, например, болезни Паркинсона (БП), которая характеризуется десятикратно ускоренной потерей nigralных дофаминергических нейронов [11, 12], в результате чего их число колеблется между 60 000 и 120 000 [13].

Мезолимбическая система, которая менее чувствительна к нарушениям, отвечает за снижение когнитивных, мотивационных и эмоциональных функций. В процессе повреждения и потери дофаминергических нейронов при старении участвуют следующие механизмы, усиливающие развитие окислительного стресса: образование свободных радикалов с помощью моноаминоксидаз (МАО), что приводит к образованию токсичных продуктов дофаминового метаболизма; низкий уровень антиоксидантной защиты в мозге (особенно каталазы); низкая экспрессия нейротрофических факторов в области высокой уязвимости ДА-ергических нейронов (например, SN); высокий уровень ионов железа, связанный с возможным нарушением регуляции гема; обилие окисляемых ненасыщенных жирных кислот [14, 15]. Кроме того, фермент тирозингидроксилаза (ТГ), участвующий в образовании ДА, может быть ингибирован окислением [16]. С увеличением возраста в дофаминергических нейронах SN также обнаружен высокий уровень мутаций в митохондриальной ДНК [17].

Потерю дофаминергических нейронов в качестве ключевого фактора связывают с угасанием когнитивных и моторных функций. Снижение уровня ДА нейронов с возрастом выявлено в различных исследованиях в нигростриатных и участках гиппокампа [18]. В SN крыс в возрасте 24 мес обнаружено снижение активности фермента тирозингидроксилазы на 55%, обусловленное увеличением белковых карбониллов на 59% [19]. По некоторым данным, уровни метаболитов ДА — гомованилиновой (ГВК) и диоксифенилуксусной (ДОФУК) кислот — также снижаются с увеличением возраста в нигростриатных, мезокортикальных и гиппокампальных областях мозга крыс [20].

У старых крыс снижение активности фермента дофадекарбоксилазы в нигростриатной и мезолимбической областях приводило к падению уровня ДА на 37%. В мезолимбической системе дегенерация аксонов была связана с агрегацией фосфорилированного ТГ и альфа-синуклеина. Дегенерация аксонов способствовала потере ТГ, L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА) и уровня ДА (на 51%) в вентральном стриатуме. В норме старение оказывает влияние на ДА-ергические нейроны мезолимбической системы более интенсивно, чем на аналогичные нейроны нигростриатной системы, в отличие от болезни Паркинсона, где наблюдается обратная тенденция [21].

Синтез ДА также снижается с возрастом. Вместе с тем, падает активность ТГ, которая может быть и полностью потеряна. В результате, в нейронах накапливается нейромеланин в качестве конечного продукта деградации ДА. При этом работоспособность дофаминового транспортера (ДАТ) с возрастом снижается более интенсивно, чем активность ТГ.

Первые морфологические признаки старения мозга наблюдают в белом веществе уже к 20—40 годам, а к 40—50 годам и в сером веществе. [22]. С увеличением возраста людей от 50 до 90 лет вес мозга снижается на 2—3% за десятилетие. При оценке уровня пигментированных (нейромеланином) нейронов с возрастом установлено, что их потеря составляет примерно 10% за десятилетие, что приводит к максимальному снижению, примерно, на 80% в пожилом возрасте. Кроме того, наблюдается также потеря маркеров ДА (в том числе ТГ, ДАТ и дофаминовых рецепторов), которая составляет 6—10% за десятилетие с кульминацией потери 40—50% в возрасте 88 лет [7, 23].

С помощью метода позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) обнаружено возрастное снижение активности дофаминовых рецепторов D1, D2, а также ДАТ [24, 25]. Анализ ДАТ методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии

(ОФЭКТ) позволил обнаружить возрастные потери от 8% за десятилетие в период от 18 до 83 лет с максимальным снижением на 51%. Последующее исследование методом ОФЭКТ выявило снижение ДАТ на 6,6% за десятилетие в возрасте от 18 до 88 лет. Это приводит к потере ДАТ на 48% в хвостатом ядре и на 45% в скорлупе [26].

Применение физических упражнений, диетического ограничения, эстрогенов и пролактина приводит к увеличению активности дофаминовых рецепторов. В целом, данные свидетельствуют о том, что меры, усиливающие передачу ДА, предотвращают возрастное снижение двигательных и познавательных функций мозга [7].

Уменьшение содержания дофамина, который является 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламин, и его предшественника тирозина обуславливает дегенеративные процессы аксонов. Дегенерацию аксонов вместе с тем связывают с агрегацией фосфорилированной тирозингидроксилазы и альфа-синуклеина [21].

Выявлено также, что потеря ДА-ергических нейронов опосредована воспалительными процессами в микроглии. Последняя может быть активирована нейротоксинами, патогенами, фрагментами белков и клетками с экспрессией маркеров апоптоза. Активированная микроглия элиминирует нейроны, в том числе, с помощью продукции свободных радикалов и цитокинов [27, 28]. У пожилых людей (около 80 лет) выявлена значимая реактивность микроглии в SN головного мозга, что способствует гибели ДА нейронов [24].

Изучение распределения дофаминовых рецепторов в различных структурах мозга с помощью ПЭТ показало, что в SN и гипоталамусе присутствуют дофаминовые рецепторы D3, в бледном шаре вентальной части стриатума присутствуют смешанные подтипы дофаминовых рецепторов D2/D3, а в хвостатых ядрах и скорлупе — однородные дофаминовые рецепторы D2. При этом выявлено, что экспрессия подтипа дофаминовых рецепторов D2 и смешанных подтипов D2/D3 в стриатуме снижается с возрастом, тогда как возрастных изменений экспрессии D3 рецепторов не наблюдали [29].

Показано, что у людей от 44 до 88 лет происходит потеря тирозингидроксилаза-позитивных нейронов в SN. Однако выявлено существенно меньшее снижение уровня дофаминергических нейронов у долгожителей, переживших возраст 100 лет [30].

Таким образом, вышеизложенное подтверждает мнение многих исследователей, что дофаминергические нейроны участвуют в «интриге», ограничивающей жизнь. В связи с этим дофаминовые нейроны полагают главными биомаркерами старения [31].

Дофамин как эндогенный антидепрессант

Интерес к функционированию дофаминергической системы в последнее время связан также с её вероятным участием в патогенезе депрессивных расстройств, которыми страдает 350 млн. человек во всем мире, или около 20 % населения земного шара. Дофамин при этом характеризуется как эндогенный антидепрессант. Потеря дофаминергических нейронов SN головного мозга была выявлена у пациентов при некоторых видах депрессии. Кроме того, получено подтверждение клинической эффективности терапии с использованием агонистов ДА при депрессии. Возвращение депрессивные расстройства также можно объяснить с позиций гибели дофаминергических нейронов [32].

Потерю дофаминергических нейронов классически связывают с расстройствами при психозах и токсикомании, полагая роль дофамина в качестве антидепрессанта при депрессивном расстройстве (ДР). Молекулярные механизмы, лежащие в основе ДР, можно рассматривать с точки зрения перспективы участия дофаминергической системы в плане объединения некоторых концепций ДР: моноаминергической, воспалительной, эпигенетической, нейротрофинной и анти-апоптической. Обоснование этих гипотез лежит в плоскости функций дофаминергической системы [31].

Моноаминергическая гипотеза полагает, что депрессия вызывается снижением моноаминергической функции головного мозга. Основными моноаминами мозга являются серотонин (5-НТ), дофамин (ДА) и норадреналин (НА). Комплексное взаимодействие между 5-НТ, ДА и НА существует таким образом, что, в основном, взаимодействие 5-НТ и НА способствует выделению ДА. В частности, учитывая исследования на животных, было выдвинуто предположение, что антидепрессанты изменяют активацию ДА-ергической системы [33]. Принимая во внимание, что активация ДА-ергической системы связана с мотивацией и жизнелюбием [34], а также, что эти состояния утрачены при ДР, этот эффект может представлять лечебный потенциал антидепрессантных средств.

Вместе с тем, функции ДА-ергической НА-ергической систем взаимодополняемы [35]. Транспортёр норадреналина, который является мишенью для некоторых антидепрессантов, способен переносить также дофамин. С другой стороны, серотонинергическая и дофаминергическая системы в высокой степени взаимозаменяемы. Рецепторы 5-НТ экспрессируются ДА-ергическими нейронами в среднем мозге, а окончания 5-НТ-нейронов способны выделять ДА при активности интернейронов [32]. Различные изофор-

мы 5-НТ рецепторов образуют систему 5-НТ, которая необходима для регуляции выделения ДА. В частности, блокировка 5-НТ_{1A} (метаболит серотонина) приводит к повышению уровня ДА в глубоких структурах головного мозга и к подавлению активности ДА-ергической системы в префронтальной коре. Эти эффекты могут поддерживать гипотезу о том, что десенсибилизация 5-НТ_{1A} может привести к активации в глубоких частях мозга ДА-ергической системы, которая связана с хорошим настроением, чего не хватает пациентам с ДР.

Учитывая тесную взаимосвязь моноаминергических систем, актуальным является создание антидепрессантов, нацеленных на ДА-ергическую систему опосредованно через НА и 5-НТ. При наркозависимости есть свидетельства того, что антидепрессанты, включающие ДА, действуют эффективнее по сравнению с другими [36]. Например, ДА-антидепрессант номифензин действует через модуляцию взаимодействий 5-НТ, НА и ДА [37], что считается ключевым моментом для эффекта антидепрессантов. В результате последних исследований были предложены нейрорептикти второго поколения, препараты-модуляторы ДА и 5-НТ в качестве потенциальных антидепрессантов быстрого действия [38].

Таким образом, можно полагать, что события, управляемые дофамином, лежат в основе эффекта антидепрессантов.

Нейротрофинная гипотеза. Рост нейронов регулируется сложной и плохо расшифрованной сетью событий, в которой нейротрофины играют соответствующую роль. Нейротрофины являются широко распространенной группой молекул в центральной и периферической нервной системе, включая: фактор роста нервов (ФРН); мозговой нейротрофический фактор (МНТФ); нейротрофин 3, 4, 5 и 6; глиальный нейротрофический фактор (ГНТФ); фактор роста фибробластов (ФРФ), нейрокин, или нейропоэтин; [39].

МНТФ действует на определенные нейроны центральной и периферической нервной системы, способствуя выживанию нейронов, повышает численность, а также дифференцировку новых нейронов и синапсов. В головном мозге МНТФ особенно активен в гиппокампе, коре и переднем мозге. Эти области отвечают за обучение и память [40]. МНТФ важен также для долговременной памяти. Мыши с врожденным отсутствием способности синтеза МНТФ имеют явные нарушения чувствительной сферы и погибают вскоре после рождения. Можно полагать, что МНТФ играет важную роль в нормальном развитии нервной системы [41].

Активность нейротрофинов связана с различными психическими и нервными заболеваниями. Учитывая способность нейротрофинов стимулировать образование новых нейрональных структур в ответ на внешние и внутренние раздражители, была предложена нейротрофинная гипотеза ДР [42]. Согласно этой гипотезе, экспрессия МНТФ как одного из самых распространенных нейротрофинов в центральной нервной системе подавлена во время депрессивных состояний, и лечение антидепрессантами может быть направлено на восстановление этого баланса [43]. Сочетанное применение диетических добавок и физических упражнений способствует повышению уровня МНТФ и mPNC в гиппокампе, а также содержания фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови хронически стрессированных животных [44].

С точки зрения связи с ДА-ергической системой, существенным является то, что эффекты, оказываемые МНТФ на настроение, зависят от того, на какую область мозга он действует. Действительно, МНТФ, влияя на области, содержащие ДА-ергические нейроны, приводит к подавленному настроению. Имеются в виду вентральная область покрышки и область прилежащего ядра (*nucleus accumbens*) стриатума, являющегося частью мезолимбической системы, участвующей в формировании удовольствия, смеха, зависимости, агрессии, страха и др. Прилежащее ядро получает информацию от ДА-ергических нейронов вентральной зоны и глутаматсодержащих нейронов префронтальной коры, миндалин и гиппокампа. Здесь происходит анализ сенсорной и эмоциональной информации и формирование поведенческого ответа на мотивирующие раздражители.

Установлено, что у старых крыс в медиальной префронтальной коре, участвующей в механизмах памяти, снижается экспрессия нейропептида Y. При этом введение фактора роста нервов предотвращает это нарушение. Последнее свидетельствует о том, что нейротрофические факторы способствуют сохранению когнитивных функций с увеличением возраста [45].

При экспериментальном хроническом стрессировании животных (модель ДР) выявлен более высокий уровень МНТФ в прилежащем ядре по сравнению с контрольными животными. Можно предположить, что «хорошее настроение» требует соответствующего уровня ДА. Очевидно, недостаток содержания ДА, как показано выше, сочетается с развитием ДР. Вместе с тем, повышенная экспрессия МНТФ в областях, содержащих дофаминергические нейроны, может привести к их гиперстимуляции, что также негативно отражается на настроении. Вызывает интерес мнение, что этот молекулярный механизм может обеспечивать ЦНС способностью развивать гибкое

поведение в ответ на изменения окружающей обстановки [46]. Так, у мышей при нокаутированном транспортере ДА выявлена неспособность приспосабливаться к окружающей обстановке (поведенческая негибкость), однако этот дефект уменьшился после введения галоперидола (блокатора дофаминовых D2 рецепторов [47].

При экспериментальном паркинсонизме интраназальное введение ФРФ, основного или кислого, ослабляло развитие паркинсонической симптоматики и препятствовало резкому снижению уровня дофамина в стриатуме мышей среднего, но не пожилого возраста [48, 49].

Лечение антидепрессантами усиливает передачу 5-НТ, что может восстановить модуляцию ДА-ергической системы, при этом устанавливая баланс ДА для надлежащей секреции нейротрофинов, которая необходима для организации новых нейрональных структур в ответ на внутренние и внешние стимулы. Эти молекулярные механизмы могут лежать в основе эффективности антидепрессантов.

Теория воспаления. Несмотря на то, что более 70 лет уже известно о том, что медиаторы иммунной системы играют роль в патофизиологии психических заболеваний, молекулярные нарушения при этом мало понятны [50]. Одной из наиболее часто цитируемых теорий является так называемая «слабость поведения», что может представлять собой иммунологическую модель ДР. Кто когда-либо болел гриппом, знает, что при этом заболевании наступает слабость. Больной отказывается от еды и питья, а также теряет интерес к физической и социальной среде, что, в общем, напоминает симптомы ДС [51]. При использовании потенциальных активаторов, провоспалительных цитокинов, было обнаружено, что они вызывают небольшую лихорадку, анорексию, беспокойство, подавленное настроение и когнитивные нарушения у добровольцев [59]. Более того, уровни беспокойства, депрессии и когнитивные нарушения связаны с содержанием циркулирующих цитокинов [52]. Введение, например, интерферона-альфа (ИФН-альфа) (в терапии гепатита С или злокачественной меланомы) может вызывать симптомы депрессии, включая суицидальные мысли [53, 54]. Вместе с тем, было выявлено, что пациенты, у которых развиваются более тяжелые депрессивные симптомы под действием ИФН-альфа, имели повышенный метаболизм триптофана [55], что предполагает модуляцию этого процесса через медиаторы воспаления.

Smith R.S. [56] один из первых предположил роль цитокинов в виде «макрофагальной теории депрессии», что в дальнейшем поддерживалось несколькими авторами. Полагали, что депрессия связана с острой

фазой воспаления, поскольку повышенные концентрации воспалительных биомаркеров в крови были обнаружены у пациентов с тяжелой депрессией. Согласно этой теории, провоспалительные цитокины также вызывают различные клинические признаки депрессии, в том числе гиперактивность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), нарушенный метаболизм 5-НТ и нейровегетативные симптомы [57]. Однако эта теория имеет некоторые ограничения [51]: а) биомаркеры воспаления у депрессивных больных повышены не всегда; б) не всегда стимуляция иммунной системы вызывает похожее на депрессию расстройство; в) авторы не нашли общего патофизиологического механизма между центральными эффектами цитокинов и нейробиологическими основами депрессии; г) наконец, уменьшение воспалительной реакции не снижает депрессивные симптомы. Тем не менее, требуется выяснить внутриклеточные молекулярные механизмы, которые объединили бы воспаление и депрессию. Эти исследования могут рассматриваться с точки зрения ГГНС гипотезы при ДР. В частности, выраженный стресс может способствовать гиперактивации ГГНС, что приводит к развитию депрессии [58].

С точки зрения участия дофамина, было бы интересно рассмотреть депрессию при болезни Паркинсона. Действительно, можно найти связь между воспалением и функцией дофамина при этой патологии ЦНС. Некоторые авторы предположили патогенетическую роль воспаления в гибели дофаминергических нейронов при БП [59]. Как было показано на моделях БП, активированная провоспалительными цитокинами (интерлейкином IL-1 и фактором некроза опухоли TNF-альфа) микроглия атакует ДА-ергические нейроны [60]. Учитывая, что от 10 до 37% пациентов с БП обнаруживают депрессию [61], можно предположить взаимодействие между патофизиологическими механизмами этих двух заболеваний. Вероятно, депрессия у пациентов с БП развивается в результате течения самого заболевания. Тем не менее, пациенты с БП имеют больше депрессивных симптомов, чем пациенты с другими хроническими заболеваниями [62]. Вместе с тем, непонятна корреляция между уровнем недееспособности у пациентов с БП и тяжестью симптомов депрессии [63]. Наряду с этим, была выдвинута гипотеза, что это происходит благодаря нейродегенерации моноаминовых и индоламинных афферентных путей из ствола мозга, а также благодаря вовлечению субкортикальных ядер [64]. Обобщая эти данные, можно предположить, что схожесть между депрессией при БП и ДР может обуславливаться одинаковыми пусковыми механизмами. Действительно, опосредованная воспалением потеря ДА-ергических нейронов, похожая на таковую при БП, может

приводить к подавленному настроению, в том числе развитию агедонии, если это происходит в ключевой церебральной области, регулирующей настроение. Несмотря на то, что воспаление при БП, вероятно, является первым триггерным событием развития заболевания, оно не идентифицировано слишком глубоко. Таким образом, дальнейшие исследования необходимы для определения инициирующего события при БП и изучения его роли в патофизиологии ДР.

Эпигенетическая теория. Еще одна гипотеза развития ДР основывается на эпигенетике. Наблюдения о том, что ответ на антидепрессанты появляется не сразу, а через несколько недель, что они требуют длительного введения для достижения клинического эффекта, заставляют ученых исследовать долговременные эффекты антидепрессантов на молекулярном уровне. Была выдвинута гипотеза, что регуляция экспрессии генов может быть одним из молекулярных механизмов, который опосредует стабильную и нестабильную адаптацию мозга [65]. Вместе с тем, изменения уровня мРНК были зарегистрированы в определенных областях мозга, как на экспериментальных моделях психического заболевания животных, так и в мозге человека, что было связано с изменением поведения [66].

Известно, что хроматин существует в инактивированном, конденсированном состоянии (гетерохроматин), который препятствует транскрипции генов. Также хроматин существует в активированном состоянии (эухроматин), который способствует генной транскрипции. Активация хроматина связана с ацетилированием близлежащих гистонов, хотя до сих пор не ясно, влияет ли это событие, прямо или косвенно, на активацию хроматина. С другой стороны, подавление этого состояния может быть связано с метилированием гистонов или другой их модификацией, что до сих пор окончательно не понятно. Вместе с тем, могут иметь место несколько более сложных промежуточных молекулярных этапов между двумя состояниями хроматина, моделирующих экспрессию гена во времени и пространстве [66].

Больше доказательств существует в пользу того, что ремоделирование хроматина играет определенную роль в регулировании зрелых, полностью дифференцированных нейронов. Синаптическая передача (трансмиссия) вызывает активацию нескольких внутриклеточных путей, вызывающих, наряду с другими эффектами, активацию или ингибирование факторов транскрипции. Такие механизмы регулируют экспрессию специфических наборов нейрональных генов, имеющих отношение к нейрональной активности, выживанию, морфологии и, в конечном итоге, комплексному регулированию сложного поведения. Исследо-

вания на животных представили некоторые доказательства, поддерживающие эти гипотезы: Weaver I.C. и др. показали, что материнская забота самок крыс, характеризующаяся усилением «вылизывания» и повышением «ухаживания» детенышей, приводит к подавлению глюкокортикоидных рецепторов (GR) промотора метилирования, что ведет к увеличению экспрессии GR [67]. Это событие способствует эффекту снижения тревожности у взрослых крыс и является обратимым при инфузии метионина [68].

Также было выявлено, что введение ингибитора гистонацетилазы вызывает антидепрессантный эффект в поведенческой модели депрессии на мышах с дальнейшим усилением эффекта при дополнительном введении флюоксетина с соответствующим увеличением экспрессии МНТФ [69]. Вместе с тем, Tsankova N.M. и др. [70] сообщили о похожих результатах у «подавленных» мышей, получавших имипрамин. Более того, один из наиболее часто используемых стабилизаторов настроения вальпроевая кислота является ингибитором гистонацетилазы. Этот механизм может служить посредником при стабилизации эффекта настроения [71], по крайней мере, частично, через усиление экспрессии МНТФ в головном мозге [69]. Исследования также продемонстрировали, что модификации гистонов приводят к долгосрочным эффектам регуляции генов, которые, вероятно, ответственны за антидепрессантный эффект [72].

Таким образом, как было показано в исследованиях на животных, несколько эпигенетических модификаций совместно участвуют в механизме развития депрессии и лечении антидепрессантами [66]. Тем не менее, до сих пор исследования в этой области сосредоточены, в основном, на генах МНТФ, причем только в гиппокампе. Поэтому дальнейшие исследования должны прояснить участие других генов в обеспечении долгосрочных эффектов воздействия антидепрессантов на транскрипцию генов в гиппокампе, а также в других областях мозга, которые были причастны к депрессии и её лечению [73].

Несмотря на то, что исследования в этой области все еще находятся в своей начальной стадии, работы на поведенческих экспериментальных моделях показали существенное эпигенетическое влияние на баланс ДА. Было, например, выявлено, что кормление беременных мышей низкобелковой диетой привело к изменению поведения рожденного потомства с гиперактивированной ДА-ергической системой [74]. Интересно отметить, что это событие было эпигенетически связано с недостатком контроля экспрессии специфического белка, названного циклин-зависимый ингибитор киназы 1С, чьи показатели метилирования оказались хуже по сравнению с нормальным белком. Этот ген проявляется при нормальных условиях и,

что более интересно, это «метаболическое извращение» можно лечить. В данном случае возникает вопрос о том, могут ли такие или подобные стрессорные факторы играть роль в развитии психических расстройств у человека. Если да, то такое молекулярное событие может быть существенным для диагностики предрасположенности к болезни и, таким образом, для стратегии профилактики. Это продвижение в лечении депрессивного расстройства и других психических нарушений было бы огромным достижением.

Анти-апоптотическая гипотеза. Не так давно была выдвинута гипотеза о вовлечении путей апоптоза в патофизиологические механизмы развития депрессии и ответа на антидепрессанты [75]. Апоптоз, запрограммированная гибель клеток, имеет существенное значение для гомеостаза тканей, оборота иммунных клеток и развития нейронов. В частности, апоптоз имеет значение для нормального развития мозга и периферической нервной системы [76]. Учитывая, что нейроны образуются в избытке и конкурируют при этом за контакты друг с другом, факторы выживания вырабатываются для них ограниченно. Гибель, как правило, зависит от функциональности клеток и уровня источников питания. Поэтому нейроны со сниженной электрической активностью и трофической поддержкой — первые кандидаты на гибель путем апоптоза. Биохимический путь, при участии которого развивается апоптоз, как правило, является одним из двух — внешним или внутренним; оба реагируют на разные стимулы, но, в конечном итоге, все завершается активацией протеаз и деградацией клеток [77].

Buss R.R. и др. [78] предположили, что апоптоз нейронов гиппокампа может иметь существенное значение в нейрогенезе, в процессе, который, как было ранее указано, участвует в патофизиологии ДР. Dwi-vedi Y. и др. [79] в исследовании *post-mortem* у пациентов с депрессией сообщили о снижении экспрессии и активности фермента ERK1/2, который, как известно, играет значительную роль в нейропластичности и выживаемости клеток в области мозга, участвующей в патофизиологии ДР [80]. Интересно, что подавление активности ERK1/2 непосредственно не приводит к апоптозу, но снижает статус фосфорилирования некоторых апоптотических медиаторов, например членов семейства ВНЗ, которые делают нейронную популяцию более восприимчивой к гибели клеток. Вместе с тем, генетические работы дополнили доказательства, поддерживающие роль апоптоза в генезе депрессии и реакциях на антидепрессанты. В частности, исследования показали связь между ДР и различными вариантами гена *Araf-1*, который кодирует белок, необходимый для обеспечения выживаемости нейронов [81].

Наряду с этим было выявлено, что антидепрессанты могут подавлять нейрональную гибель. Исследования на животных показали, что участие антидепрессантов в предотвращении гибели нервных клеток, вероятно, заключается в повышении высвобождения нейротрофинов и усилении экспрессии их рецепторов [82]. Lee В.Н. и др. [83] сообщили, что лечение флуоксетином снизило гибель нейронов в зубчатой извилине гиппокампа (смерть нейронов была индуцирована стрессом, вызванным разделением матерей и детенышей крыс). И, наконец, тианепин сократил после стресса количество апоптотических клеток в височной коре, гранулярном клеточном слое и зернистой зоне гиппокампа древесной землеройки [84].

Хотя апоптоз играет определенную роль в эффектах антидепрессантов, точный механизм, с помощью которого антидепрессанты подавляют гибель нейронов, до конца не ясен. Тем не менее, McKernan D.P. и др. [75] предложили несколько возможных механизмов. Во-первых, воздействие антидепрессантами может вызывать нарушения на митохондриальном уровне, предотвращая активацию каспаз, как выявлено в исследованиях *in vitro* [85]. Во-вторых, все больше данных свидетельствует о том, что антидепрессанты влияют на некоторые клеточные события, вызываемые хроническим стрессом. В частности, лечение антидепрессантами, вероятно, повышает трансдукцию субсемейства Bcl-2 белка, который обладает свойствами, способствующими выживанию, и предотвращает увеличение проницаемости митохондриальной мембраны, которое приводит к клеточной гибели в нескольких областях мозга, связанных с депрессией [86]. Тем не менее, конкретные клеточные механизмы, с помощью которых антидепрессанты усиливают экспрессию белков Bcl-2, являются до сих пор не известными. Однако, возможно, они активируют такой специфический фактор транскрипции, как FOXO3A. Кроме того, другие белки с антиапоптотическими свойствами (в основном VEGF, фактор роста эндотелия сосудов) подвергаются модуляциям при лечении антидепрессантами [75]. Эти данные представляют некоторые доказательства эффективности антидепрессантов в предотвращении гибели нейронов. Тем не менее, до сих пор неизвестно, важен ли этот механизм для эффекта антидепрессантов.

Вместе с тем, последние данные предполагают участие ДА в процессе апоптоза нейронов в ЦНС. В частности, связью между ДА и апоптозом представляется белок Раg-4, участвующий в про-апоптотических событиях и формирующий нейрональные структуры в ЦНС. Этот белок работает, образуя молекулярные комплексы ДА с дофаминовым рецептором D2, конкурируя с кальцием за связывание белка кальмодулина. Кроме того, у мышей с нарушенной

системой Раg-4/D2 появлялись депрессивные симптомы. К тому же, Раg-4 был подавлен у 64 % пациентов с депрессией, по сравнению с контролем (здоровые люди). Эти данные свидетельствуют о существенной роли Раg-4/D2 взаимодействия для функционирования ДА-ергической системы [87]. Таким образом, классический механизм гибели ДА-ергических нейронов по типу апоптоза, происходящий в том числе и при БП, может быть важным и для понимания основы ДР.

Наконец, еще одно взаимодействие между ДА и апоптозом можно рассматривать в связи с антипсихотическими препаратами. Выше приведена концепция о том, что соответствующая ДА трансмиссия может поддерживать гибкость ЦНС, необходимую для должного поведения при ответе на изменения окружающей среды [46]. Также предполагалось участие нейротрофинов в этой функции. Вместе с тем, другие данные также полагают существенную роль апоптоза. Действительно, было показано, что антипсихотические лекарственные средства (антагонисты дофаминовых рецепторов D2) могут модулировать апоптоз посредством Akt/гликогенсинтазы-киназы 3 (GSK3)-путей [88]. В частности, антипсихотические препараты могут модулировать фосфорилирование Akt и, следовательно, GSK3 (белок, участвующий в нескольких функциях, среди которых апоптоз и синаптическая пластичность). Принимая во внимание противоположные результаты, можно полагать, что и в этом случае ключевым моментом достижения модуляции являются сигналы ДА. В самом деле, ДА-трансмиссия может привести к нарушению стабильности механизма апоптоза.

Таким образом, следует считать, что комплексный характер самой депрессии отражает гетерогенность заболевания. В связи с этим, экспериментаторы и клиницисты должны рассматривать полисиндромную природу депрессии и использовать мультидисциплинарный подход для изучения нейробиологических основ многих видов депрессии [89]. В конечном итоге, следует учитывать вероятность того, что депрессия представляет собой результат множества независимых патофизиологических механизмов. Действительно, это заболевание может быть конечным результатом разных взаимодействий эндогенных и экзогенных факторов [90]. С этой точки зрения можно полагать, что изменения ДА-ергической системы может представлять собой конечный общий этап нескольких независимых патофизиологических механизмов.

В итоге следует отметить, что механизм действия антидепрессантов остается, в основном, неизвестным, так же как патофизиология депрессии и связанных с ней расстройств. Тем не менее, некоторый прогресс в этой области существует, поскольку наблюдается

явная эффективность некоторых антидепрессантов. Внимательный анализ множественных взаимодействий между системами может объединить, очевидно, разные теории. С этой целью мы сконцентрировались на ДА-ергической системе. Современные достижения обстоятельных знаний патофизиологии расстройств и молекулярных механизмов действия антидепрессантов (в свете взаимодействий между серотонин-, норадреналин- и ДА-ергическими системами) перспективны для более совершенного контроля заболевания, а в идеале — для его предотвращения.

References

1. Bocharova O.A. Adhesiveness concept in cancer growth. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2014; (2): 87-93.
2. Krizanova O., Babula P., Pacak K. Stress, catecholaminergic system and cancer. *Stress*. 2016; 19(4): 419-28.
3. Gomozkov O.A. *Why the brain new nerve cells need? [Zachem mozgu nuzhny novye nervnye kletki]*. Moscow: Ikar; 2016. (in Russian)
4. Komissarova S.V., Dubrovin I.P., Paltsyn A.A. Regeneration of neurons. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58 (3): 76-87. (in Russian)
5. Magnini F., Sabbatini M., Capacchietti M., Amantini C., Bianchi E., Artico M., Tammara A., T-cell subpopulations express a different pattern of dopaminergic markers in intra- and extra-thymic compartments. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2013; 27 (2): 463-75.
6. Ho N.F., Hooker J.M., Sahay A. et al. In vivo imaging of adult human hippocampal neurogenesis: progress, pitfalls and promise. *Mol. Psychiatry*. 2013; 18(4): 404-16.
7. Reeves S., Bench C., Howard R. Ageing and the nigrostriatal dopaminergic system. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*. 2002; 17: 359-70.
8. Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mut. Res*. 2004; 567: P. 1-61.
9. Paladini C.A., Roeper J. Generating bursts (and pauses) in the dopamine midbrain neurons. *Neuroscience*. 2014; 282: 109-21.
10. Rangel-Barajas C., Coronel I., Floran B. Dopamine receptors and neurodegeneration. *Aging dis*. 2015; 6 (5): 349-68.
11. Kryzhanovskiy G.N., Karaban I.N., Magaeva S.V., Kucheryanu V.G., Karaban N.V. *Parkinson's disease. [Bolezn' Parkinsona]*. Moscow: Meditsina; 2002. (in Russian)
12. Gibb W.R., Lees A.J. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1991; 54: 388-96.
13. Otellin V.A., Arushanyan E.B. *Nigro-striatonigral system [Nigro-striatonigral'naya sistema]*. Moscow: Nauka; 1989. (in Russian)
14. Cadet J.L., Brannock C. Free radicals and the pathobiology of dopamine systems. *Neurochem. Intern*. 1998; 32 (2): 117-31.
15. Halliwell B. Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxid. Redox. Signal*. 2006; 8: 2007-19.
16. Borges C.R., Geddes T., Watson J.T. et al. Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation: potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition during oxidative stress. *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 48295-302.
17. Parkinson G.M., Dayas C.V., Smith D.W. Increased mitochondrial DNA deletions in substantia nigra dopamine neurons of the aged rat. *Curr. Aging Sci*. 2014; 7 (3): 155-60.
18. Bjorklund A., Dunnet S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *TRENDS in Neuroscience*. 2007; 30 (5): 194-202.
19. De La Cruz C.P., Revilla E., Venero J.L. et al. Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free Radical. Biol. Med*. 1996; 20:53-61.
20. Goudsmit E., Feenstra M.G.P., Swaab D.F. Central monoamine metabolism in the male brown-Norway rat in relation to aging and testosterone. *Brain Res. Bull*. 1990; 25: 755-63.
21. Cruz-Muros I., Afonso-Oramas D., Abreu P. et al. Aging of the rat mesostriatal system: Differences between the nigrostriatal and mesolimbic compartments. *Exp. Neurol*. 2007; 204: 147-61.
22. Paltsyn A.A., Komissarova S.V. Age-related changes of the brain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59 (4): 108-16. (in Russian)
23. Backman L., Nyberg L., Lindenberger U. et al. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: Current status and future prospects. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2006; 30: 791-807.
24. Volkow N.D., Gur R.C., Wang G.J. et al. Association between decline in brain dopamine activity with age and cognitive and motor impairment in healthy individuals. *Am. J. Psychiatry*. 1998; 155: 344-9.
25. van Dyck C.H., Seibyl J.P., Malison R.T. Age related decline in dopamine transporters: Analysis of striatal subregions, nonlinear effects, and hemispheric asymmetries. *Am. J. Geriatr. Psychiatry*. 2002; 10: 36-43.
26. Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Poleschuk V.V., Kucheryanu V.G., Gorojanskaya E.G., Sandalov Gorojanskaya E.G., Sandalov Yu., Ilienkov V.A., Bocharova O.A. Immune and antioxidant disorders in Parkinson's disease. *Patogenez*. 2012; 10(1): 34-38.
27. Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Bocharova O.A., Poleschuk V.V. Mechanisms of neurodegeneration in Parkinson's disease. Microglial activation. *Patogenez*. 2012; 10(3): 30-4.
28. Nakajima S., Caravaggio F., Boileau I., Chung J., Plitman E., Gerretsen P., Wilson A.A., Houle S., Mamo D., Graff-Guerrero A. Lack of age-dependent decrease in dopamine D3 receptor availability: a [(11)C]-(+)-PHNO and [(11)C]-raclopride positron emission tomography study. *J. Cereb. Blood. Flow Metab*. 2015; 35 (110): 1812-18.
29. Kubis N., Faucheux B.A., Ransmayr G. et al. Preservation of midbrain catecholaminergic neurons in very old human subjects. *Brain*. 2000; 123(20): 366-73.
30. Rollo C.D. Dopamine and aging: intersecting facets. *Neurochem. Res*. 2009; 34(4): 601-29.
31. Porcelli S., Drago A., Fabbri C., Serretti A. Mechanisms of antidepressant action: an integrated dopaminergic perspective. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2011; 35(7): 1532-43.
32. Friedman A., Deri I., Friedman Y., Dremencov E., Goutkin S., Kravchinsky et al. Decoding of dopaminergic mesolimbic activity and depressive behavior. *J. Mol. Neurosci*. 2007; 32; 72-9.

33. Wise R.A. Forebrain substrates of reward and motivation. *J. Comp. Neurol.* 2005; 493 (1): 115-21.
34. Carboni E., Silvagni A. Dopamine reuptake by norepinephrine neurons: exception or rule? *Crit. Rev. Neurobiol.* 2004; 16 (1-2): 121-8.
35. Amore M., Jori M.C. Faster response on amisulpride 50 mg versus sertraline 50-100 mg in patients with dysthymia or double depression: a randomized, double-blind, parallel group study. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2001; 16: 317-24.
36. Katz N.S., Guiard B.P., Mansari M. El., Blier P. Effects of acute and sustained administration of the catecholamine reuptake inhibitor nomifensine on the firing activity of monoaminergic neurons. *J. Psychopharmacol.* 2010; 24: 1223-35.
37. Thase M.E. Bipolar depression: diagnostic and treatment considerations. *Dev. psychopathol.* 2006; 18 (4): 1213-30.
38. Obara Y., Nakahata N. The signaling pathway of neurotrophic factor biosynthesis. *Drug News Perspect.* 2002; 15: 290-8.
39. Yamada K., Nabeshima T. Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2003; 91 (4): 267-70.
40. Ernfors P., Kucera J., Lee K. F., Loring J., Jaenisch R. Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int. J. Dev. Biol.* 1995; 39: 799 – 807.
41. Lang U.E., Jockers-Scherubl M.C., Hellweg R. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *J. Neural Transm.* 2004; 111: 387-11.
42. Brunoni A.R., Lopes M., Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2008; 11: 1169-80.
43. Hutton C.P., Džury N., Rosa E., Lemon J.A., Rollo C.D., Boreham D.R., Fahnestock M., deCatanzaro D., Wojtowicz J.M., Becker S. Synergistic effects of diet and exercise on hippocampal function in chronically stressed mice. *Neuroscience.* 2015; 308: 180-93.
44. Pereira P.A., Millner T., Vilela M., Sousa S., Cardoso A., Madeira M.D. Nerve growth factor-induced plasticity in medial prefrontal cortex interneurons of aged Wistar rats. *Exp. Gerontol.* 2016; 85: 59-70.
45. Collingridge G.L., Peineau S., Howland J.G., Wang Y.T. Long-term depression in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010; 11: 459-73.
46. Morice E., Billard J.M., Denis C., Mathieu F., Bantancur C., Epelbaum J. et al. Parallel loss of hippocampal LTD and cognitive flexibility in a genetic model of hyperdopaminergia. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32: 2108-16.
47. Kryzhanovsky G.N., Kucheryanu V.G., Nikushkin E.V., Krupina N.A. Influence of basic fibroblast growth factor on the development of parkinsonian syndrome in mice. *Buletin of Experimental Biology and Medicine.* 1995; 120 (3): 900-2.
48. Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Yurasov V.V., Nikushkin E.V., Zhigal'tsev I.V. Effect of acidic fibroblast growth factor on the development of experimental parkinsonism and striatal level of dopamine and its metabolites in mice of different ages. *Buletin of Experimental Biology and Medicine.* 1999; 127 (5): 454-6.
49. Licinio J., Wong M.L. The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress-responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection. *Mol. Psychiatry.* 1999; 4: 317-27.
50. Dantzer R., Bluthé R., Gheusi G., Cremona S., Laye S., Parnet P., et al. Molecular basis of sickness behavior. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998; 856: 132-8.
51. Reichenberg A., Kraus T., Haack M., Schuld A., Polimacher T., Yirmiya R. Endotoxin-induced changes in food consumption in healthy volunteers are associated with TNF-alpha and IL-6 secretion. *Psychoneuroendocrinology.* 2002; 27: 945-56.
52. Dieperink E., Ho S.B., Tetrick L., Thuras P., Dua K., Willenbring M.L. Suicidal ideation during interferon-alpha2b and ribavirin treatment of patients with chronic hepatitis C. *Gen. Hosp. Psychiatry.* 2004; 26: 237-40.
53. Schaefer M., Horn M., Schmidt F., Schmid-Wendtner M.H., Volkenandt M., Ackenheil M., et al. Correlation between sICAM-1 and depressive symptoms during adjuvant treatment of melanoma with interferon-alpha. *Brain Behav. Immun.* 2004; 18: 555-62.
54. Capuron L., Neirauter G., Musselman D.L., Lawson D.H., Nemeroff C.B., Fuchs D., et al. Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. Relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol. Psychiatry.* 2003; 54: 906-14.
55. Smith R.S. The macrophage theory of depression. *Med. Hypotheses.* 1991; 35 (4): 298-306.
56. Maes M., Smith R., Scharpe S. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology.* 1995; 20: 111-6.
57. Parker K.J., Schatzberg A.F., Lyons D.M. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm. Behav.* 2003; 43: 60-6.
58. Chung Y.C., Ko H.W., Bok E., Park E.S., Huh S.H., Nam J.H., et al. The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep.* 2010; 43: 225-32.
59. Koprach J.B., Reske-Nielsen C., Mithal P., Isacson O. Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation.* 2008; 5: P. 8.
60. Allain H., Schuck S., Mauduit N. Depression in Parkinson's disease. *BMJ.* 2000; 320: 1287-88.
61. Ehmann T.S., Beninger R.J., Gawel M.J., Riopelle R.J. Depressive symptoms in Parkinson's disease: a comparison with disabled control subjects. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 1990; 3 (1): P. 3-9.
62. Tandberg E., Larsen J.P., Aarsland D., Laake K., Cummings J.L. Risk factors for depression in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 1997; 54(5): 625-30.
63. Blandini F., Nappi G., Tassorelli C., Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 2000; 62: 63-88.
64. Hyman S.E., Nestler E.J. The molecular foundations of psychiatry. Washington D.C: *American Psychiatric Press.* 1993.
65. Tsankova N. M., Renthal W., Kumar A., Nestler E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8 (5): 355-67.
66. Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004; 7(8): 847-54.

67. Weaver I.C., Champagne F.A., Brown S.E., Dymov S., Sharma S., Meaney M.J., Szyf M. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J. Neurosci.* 2005; 25 (47): 11045-54.
68. Schroeder F.A., Lin C.L., Crusio W.E., Akbarian S. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol. Psychiatry.* 2007; 62: 55-64.
69. Tsankova N.M., Berton O., Renthal W., Kumar A., Neve R.L., Nestler E.J. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* 2006; 9: 519-25.
70. Yasuda S., Liang M.H., Marinova Z., Yahyavi A., Chuang D.M. The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Mol. Psychiatry.* 2009; Vol. 14: 51-9.
71. Tsankova N.M., Kumar A., Nestler E.J. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J. Neurosci.* 2004; 24 (24): 5603-10.
72. Nestler E.J., Barrot M., DiLeone R.J., Eisch A.J., Gold S.J., Monteggia L.M. Neurobiology of depression. *Neuron.* 2002; 34: 13-25.
73. Vucetic Z., Kimmel J., Totoki K., Hollenbeck E., Reyes T.M. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology.* 2010; 151 (10): 4756-64.
74. McKernan D.P., Dinan T.G., Cryan J.F. "Killing the Blues": a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? *Prog. Neurobiol.* 2009; 88: 246-63.
75. Akhtar R.S., Ness J.M., Roth K.A. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1644: 189-203.
76. Mattson M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2000; 1: 120-9.
77. Buss R.R., Sun W., Oppenheim R.W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* 2006; 29: 1-35.
78. Dwivedi Y., Rizavi H.S., Pandey G.N. Antidepressants reverse corticosterone-mediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone. *Neuroscience.* 2006; 139: 1017-29.
79. Pittenger C., Duman R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 2008; Vol. 33: 88-109.
80. Harlan J., Chen Y., Gubbins E., Mueller R., Roch J.M., Walter K., et al. Variants in Apaf-1 segregating with major depression promote apoptosome function. *Mol. Psychiatry.* 2006; 11: 76-85.
81. Saarelainen T., Hendolin P., Lucas G., Koponen E., Sairanen M., MacDonald E. et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J. Neurosci.* 2003; 23 (1): 349-57.
82. Lee B.H., Kim Y.K. Increased plasma brain-derived neurotrophic factor, not nerve growth factor-Beta, in schizophrenia patients with better response to risperidone treatment. *Neuropsychobiology.* 2009; 59: 51-8.
83. Lucassen P.J., Fuchs E., Czeh B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol. Psychiatry.* 2004; 55: 789-96.
84. Nahon E., Israelson A., Abu-Hamad S., Varda S.B. Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and protection against apoptotic cell death. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5105-10.
85. Kosten T.A., Galloway M.P., Duman R.S., Russell D.S., D'Sa C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33: 1545-58.
86. Glantz L.A., Gilmore J.H., Overstreet D.H., Salimi K., Lieberman J.A., Jarskog L.F. Pro-apoptotic Par-4 and dopamine D2 receptor in temporal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Schizophr. Res.* 2010; 118: 292-9.
87. Freyberg Z., Ferrando S.J., Javitch J.A. Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action. *Am. J. Psychiatry.* 2010; 167: 388-96.
88. Krishnan V., Nestler E.J. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 2008; 455: 894-902.
89. Tanti A., Belzung C. Open questions in current models of antidepressant action. *Br. J. Pharmacol.* 2010; 159(6): 1187-200.
90. Mohammad-Zadeh L.F., Moses L., Gwaltney-Brant S.M. Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2008; 31(3): 187-99.

Сведения об авторах:

Кучеряну Валериян Григорьевич, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: vkucheryanu@mail.ru

Бочарова Ольга Алексеевна, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. иммунофармакологии, e-mail: imufarm@rambler.ru