

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:
<http://niiopp.ru/pathophysiologyeng/>
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.

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

5-летний ИФ РИНЦ 2015 0,690

Журнал включен в базу данных Scopus
Подписной индекс по каталогу
агентства «Роспечать»: **71456**

Сдано в набор 17.12.2016 г.
Подписано в печать 10.01.2017 г.

ISSN 0031-2991
Пат. физиол. и Экспер. тер.
2017. Том 61. № 1. 1—124

Перепечатка материалов и использование их в лю-
бой форме, в том числе и в электронных СМИ, воз-
можны только с письменного разрешения издателя.
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, № 1, 2017

январь—март

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)

Редационный 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), С.А. Хачатрян (Ереван),
В. Шварц (Германия), А.П. Ястребов (Екатеринбург)

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

Home page:

<http://niiopp.ru/pathophysiologyeng/>

E-mail: path.physiol@yandex.ru

Pathological physiology
and experimental therapy
2017. Vol. 61. № 1. 1–124

Publisher: Irishkin Dmitry

e-mail: genius-media@mail.ru

ISSN 0031-2991

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, № 1, 2017

January—March

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), S.A. Khachatryan (Erevan),
V. Shvarz (Germany), A.P. Yastrebov (Ekaterinburg)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Никитина И.Л., Кудряшова Е.К., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д.** Изменения уровня моноаминовых нейромедиаторов в ЦНС и кисспептина в крови у потомства гиперандрогенизированных самок крыс в эксперименте 4
- Федотова Ю.О.** Блокада D₁-типа дофаминовых рецепторов корректирует воспроизведение рефлекса пассивного избегания у гонадэктомированных самцов крыс 13
- Зимушкина Н.А., Косарева П.В.** Динамика поведенческих реакций нелинейных белых крыс при воздействии регулярной дозированной физической нагрузки 21
- Титов В.Н., Котловский М.Ю., Якименко А.В., Курдоjak Е.В., Якимович И.Ю., Гришанова А.Ю., Аксютин Н.В., Котловский Ю.В., Дыгай А.М.** Модель экзогенной гиперхолестеринемии у крыс и жирные кислоты плазмы крови; видовые особенности липопротеинов, статины и ω-3 полиеновые кислоты 27
- Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н.** Гаплотипы мутаций m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G и m.15059G>A митохондриального генома, ассоциированные с фенотипическими проявлениями предрасположенности к атеросклеротическим поражениям 37
- Калинкин М.Н., Щеглова Н.Е.** МикроРНК и полиморфизм генов их биогенеза в патогенезе атеросклероза 43
- Алиев О.И., Анищенко А.М., Сидехменова А.В., Шаманаев А.Ю., Чернышева Г.А., Плотииков М.Б.** Гемореологические показатели у крыс SHR в периоды возрастания и стабильно высокого артериального давления 51
- Косарева П.В., Сивакова Л.В., Самоделькин Е.И., Шаклейна С.М., Федык О.В.** Аутоиммунные реакции и реакция костного мозга крыс при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса 58
- Сайдов М.З., Далгатова А.А., Курбанов К.З., Гамзаева А.У.** Патогенетическая оценка иммунологической реактивности при синдроме длительного сдавливания (экспериментальное исследование) 65
- Лазанович В.А., Маркелова Е.В., Просекова Е.В., Кудрявцев И.В., Смолина Т.П., Павлов В.А.** Анализ экспрессии C3aR, C5aR1 (CD88) на миелоидных клетках у пациентов с сепсисом 72
- Терещенко О.А., Боташев А.А., Помещик Ю.В., Сергиенко В.И., Петросян Э.А.** Состояние эндотелия сосудов при экспериментальном желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом 78
- Куликов О.А., Пятаев Н.А., Инчина В.И., Минаева О.В.** Влияние внутривенного введения липосомальной формы ацетилцистеина на функциональное состояние дыхательной системы крыс при остром повреждении лёгких 82
- Попруженко Т.В., Борис С.П.** Клинические результаты применения ацетилцистеина для патогенетической профилактики химиотерапевтического орального мукозита у детей 88
- Соловьева Н.В., Давидович Н.В., Бажукова Т.А., Агафонов В.М.** Роль нарушений микрофлоры толстой кишки в механизмах повреждения печени при хронических гепатитах В и С 92

ОБЗОРЫ

- Пальцын А.А.** Микрочастицы тромбоцитов 99
- Горбунов А.С., Маслов Л.Н.** Триггерные и сигнальные механизмы адаптивного феномена ишемического посткондиционирования 106
- Синёв В.В., Карагодин В.П., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Сазонова М.А., Орехов А.Н.** Мутационная нагрузка митохондриального генома в различных органах и тканях человека 114

ИНФОРМАЦИЯ

- Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Кононенко Н.Н.** Патопфизиология и фармация: пути интеграции (информация о VII Конгрессе патофизиологов Украины с международным участием) 121
- XX Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». Информационное письмо 124

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Nikitina I.L., Kudryashova E.K., Masel A., Bairamov A.A., Shabanov P.D.** Level of monoamine neurotransmitters in the central nervous system and kisspeptin in blood in the offspring of experimentally induced model hyperandrogenisation in female rats
- Fedotova J.O.** Blockade of D₁-type dopaminergic receptors corrects passive avoidance performance in gonadectomized male rats
- Zimushkina N.A., Kosareva P.V.** Dynamics of behavioral reactions of nonlinearwhite rats exposed to regular dosed physical activity
- Titov V.N., Kotlovsky M.Yu., Yakimenko A.V., Kurdojak E.V., Yakimovich I.Yu., Grishanova A.Yu., Aksutin N.V., Kotlovsky Yu.V., Dygai A.M.** A rat model of exogenous hypercholesterolemia and blood plasma fatty acids; species specific features of lipoproteins, effects of statins and ω-3 polyenic fatty acids
- Mitrofanov K.Yu., Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Postnov A.Yu., Sobenin I.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N.** Haplotype of the mutations m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G and m.15059G>A mitochondrial genome associated with phenotypic expression of the predisposition to atherosclerotic lesions
- Kalinkin M.N., Shcheglova N.E.** MicroRNAs and polymorphism of genes of biogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis
- Aliiev O.I., Anishhenko A.M., Sidehmenova A.V., Shamanaev A.Y., Chernysheva G.A., Plotnikov M.B.** Hemoreological parameters in spontaneously hypertensive rats during the stages of increasing and stable blood pressure
- Kosareva P.V., Sivakova L.V., Samodelkin E.I., Shakleina S.M., Fedyk O.V.** Autoimmune reactions and reactions of rats bone marrow at acquired toxic hemolytic anemia with acute stress
- Saidov M.Z., Dalgatova A.A., Kurbanov K.Z., Gamzaeva A.U.** Pathogenetic evaluation of immunologic reactivity in crush syndrome (experimental research)
- Lazanovich V.A., Markelova E.V., Prosekova E.V., Kudryavtsev I.V., Smolina T.P., Pavlov V.A.** Analysis of expression C3aR, C5aR1 (SD88) on myeloid cells in patients with sepsis
- Tereschenko O.A., Botashev A.A., Pomeschik U.V., Sergienko V.I., Petrosyan E.A.** State vascular endothelium in experimental billary peritonitis, a complication of abdominal sepsis
- Kulikov O.A., Pyataev N.A., Inchina V.I., Minaeva O.V.** Effects of intravenous administration liposomal form of acetylcysteine on the functional state respiratory system in rats with acute lung injury
- Popruzenko T.V., Borys S.P.** Clinical results of acetylcysteine use for pathogenetic prevention of oral mucositis induced by chemotherapy in children
- Solov'eva N.V., Davidovich N.V., Bazhukova T.A., Agafonov V.M.** The role of gut microflora in the mechanisms of liver damage in chronic hepatitis B and C

REVIEWS

- Paltsyn A.A.** Platelet microparticles
- Gorbunov A.S., Maslov L.N.** Trigger and signaling mechanisms of adaptive phenomenon of ischemic postconditioning
- Sinyov V.V., Karagodin V.P., Sobenin I.A., Postnov A.Yu., Sazonova M.A., Orekhov A.N.** Mutational burden of mitochondrial genome in different organs and tissues in human

INFORMATION

- Kubyshekin A.V., Fomochkina I.I., Kononenko N.M.** Pathophysiology and Pharmacy. Ways of integration (VII Congress of the pathophysiologists of Ukraine)
- XX International conference «Fundamental science and clinical medicine. Man and health» for young researchers. Letter of announcement

© Коллектив авторов, 2017
УДК616-092

Никитина И.Л., Кудряшова Е.К., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д.

Изменения уровня моноаминовых нейромедиаторов в ЦНС и кисспептина в крови у потомства гиперандрогенизированных самок крыс в эксперименте

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

Актуальность. Важную роль в механизмах формирования половой дифференцировки мозга (ПДМ) и полового поведения отводят межнейрональному сигналингу и взаимодействию нейромедиаторных систем мозга. Однако физиология и патология ПДМ остаются наименее изученными и требуют дальнейших исследований, в свете новых открытий нейроэндокринной регуляции гонадной оси системой kiss/kiss1R. **Цель** — изучение профиля моноаминовых медиаторов в ЦНС в ассоциации с уровнем кисспептинов в крови у потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс. **Методы.** Модель пренатальной гиперандрогенизации создана на самках крыс линии Wistar (50 крыс) путем внутрибрюшинного введения тестостерона беременным самкам на 11-е и 18-е сут. гестации. Изучали потомство этих животных. Экспериментальную группу составили самки крыс 2- и 4-месячного возраста с гиперандрогенизацией их матерей во 2-м и 3-м триместре беременности (по 5 особей). Контролем служили препубертатные самки крыс 2 мес. (5 особей) и пубертатные 4 мес. (5 особей), рожденные в условиях физиологически протекающей беременности. Измеряли уровень сывороточного кисспептина и тестостерона, а также концентрацию норэпинефрина (НЭ) и серотонина в структурах головного мозга. Обработку данных производили методами дисперсионного анализа, непараметрического анализа (Me) с использованием W-критерия Вилкоксона. **Результаты.** В ядрах гипоталамуса выявлено статистически значимое по сравнению с контролем повышение концентрации норэпинефрина (медиана, Me) 3,642 нг/мл и 2,132 нг/мл ($p < 0,001$) во 2-м триместре, а также 3,685 нг/мл и 2,132 нг/мл ($p < 0,001$) в 3-м триместре соответственно. В гиппокампе выявлено статистически значимое повышение уровня НЭ в сравнении с контролем (медиана, Me) 1,517 нг/мл и 0,068 нг/мл ($p < 0,05$) во 2-м триместре; 2,068 нг/мл и 0,068 нг/мл ($p < 0,05$) в 3-м триместре соответственно. В миндалевидном комплексе изменений уровня НЭ в сравнении с контролем выявлено не было. В гипоталамусе отмечалось статистически значимое снижение концентрации серотонина (С) при гиперандрогенизации в 3-м триместре (1,294 нг/мл против 1,637 нг/мл в контроле, $p < 0,05$). В миндалевидном комплексе обнаружено статистически значимое снижение уровня С в группе андрогенизации на поздних сроках гестации (медианы, соответственно, 1,428 нг/мл в контроле и 0,885 нг/мл в группе андрогенизации в 3-м триместре, $p < 0,05$). Значимых различий в уровне тестостерона в крови потомства самок крыс, андрогенизированных в разные сроки гестации, по сравнению с контролем выявлено не было. Уровень кисспептина статистически значимо возрастал в обеих опытных группах (2 и 4 мес.) при гиперандрогенизации на более поздних сроках гестации. Медианы кисспептина двухмесячных крыс, андрогенизированных в 3-м триместре, по сравнению с двухмесячным контролем составили 0,67 нг/мл и 0,17 нг/мл ($p < 0,05$); 4-месячных крыс того же срока андрогенизации по сравнению с четырехмесячным контролем — 0,64 нг/мл и 0,31 нг/мл соответственно ($p < 0,05$). **Заключение.** Избыток тестостерона на ранних сроках гестации оказывает тератогенное действие на потомство. Разнонаправленные изменения нейромедиаторного сигналинга, возникшие на фоне пренатальной гиперандрогенизации на поздних сроках гестации, опосредованно могут приводить к инверсиям половой дифференцировки и полового поведения. Пренатальная гиперандрогенизация ассоциирована с повышением уровня кисспептина крови, что позволяет предположить опосредованное влияние гиперандрогенизации на поздних сроках гестации на активацию кисспептинового сигналинга и ассоциированную с этим активацию гонадной оси. Продолжение изучения ассоциации изменения профиля нейромедиаторов моноаминового ряда и динамики кисспептина способно расширить понимание механизмов половой дифференцировки мозга и транслировать полученные данные в клиническую практику.

Ключевые слова: норэпинефрин, серотонин, кисспептины, половая дифференцировка мозга, гиперандрогенизация, самки крыс.

Для цитирования: Никитина И.Л., Кудряшова Е.К., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д. Изменение уровня моноаминовых нейромедиаторов в ЦНС и кисспептина в крови у потомства гиперандрогенизированных самок крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 4–12.

Для корреспонденции: Никитина Ирина Леоровна, e-mail: nikitina0901@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.10.2016

Nikitina I.L., Kudryashova E.K., Masel A., Bairamov A.A., Shabanov P.D.

Level of monoamine neurotransmitters in the central nervous system and kisspeptin in blood in the offsprings of experimentally induced model hyperandrogenisation in female rats

«North-West Federal Medical Research Center named after Almazov»;
2, ul. Akkuratova, St. Petersburg, 197341, Russia

Background. An important role in the mechanisms of the formation of the sexual differentiation of the brain and sexual behavior assign interneuronal signaling and interaction of neurotransmitter systems in the brain. However, PDM physiology and pathology are the least understood and requires further research, in the aspects of new discoveries neuroendocrine regulation of gonadal axis by kiss / kiss1R system. **The purpose.** To study the profile of monoamine neurotransmitters in the central nervous system, in association with blood levels of kisspeptin in female offspring with prenatal hyperandrogenisation at different stages of gestation in female rats. **Methods.** The experimental model was created in female Wistar rats (total 50 rats). Prenatal hyperandrogenisation model was created by intraperitoneal injection of testosterone to pregnant females at 11 and 18 days of gestation. Next, the resulting offspring was investigated. During the experiment set up control groups — prepubertal female rats aged 2 months (5 individuals) and pubertal female rats aged 4 months (5 individuals), those born in a physiological pregnancy. Experimental group were female rats aged 2 and 4 months with hyperandrogenisation in 2 and 3 trimester (5 individuals). In all groups the serum levels of testosterone, kisspeptin and the concentration of norepinephrine and serotonin in the brain structures were measured. Processing of the data was performed by analysis of variance, non-parametric analysis (Me) by using the Wilkoxon criterion. **Results.** In the hypothalamic nuclei a significant increase of NE concentration was found, compared to a control group (median (Me), respectively 3,642 ng/ml and 2,132 ng/ml, $p < 0.001$ in the 2nd trimester, 3,685 ng/ml and 2,132 ng/ml, $p < 0.001$ 3 trimester). In the hippocampus a significant increase of NE was revealed in comparison with controls (median (Me) respectively 1,517 ng/ml and 0.068 ng/ml, $p < 0.05$ in the 2nd trimester; 2,068 ng/ml and 0.068 ng/ml, $p < 0.05$ in the 3rd trimester). In the amygdala NE-level changes in comparison to a control group was not revealed. In the hypothalamus there was a significant decrease of SER concentration in rats with hyperandrogenisation in 3 trimester (1,294 ng/ml versus 1.637 ng/ml in the controls ($p < 0.05$)). In the amygdala SER level decreased in group with androgenisation in 3rd trimester — a median, respectively, 1.428 ng/ml in the control and 0.885 ng/ml in the experimental group, $p < 0.05$). The study did not found significant differences in the level of testosterone in the blood of female rats hyperandrogenised at different stages of gestation, compared with age-matched controls and within groups. Kisspeptin level was significantly increased in both experimental groups (2 months and 4 months) at androgenisation in 3rd trimester. Kisspeptin median in 2-month aged rats androgenised in the 3rd trimester compared with the 2-month control group was 0.67 ng/ml and 0.17 ng/ml ($p < 0.05$); 4-month aged rats with androgenisation in the same period compared to 4-month controlgroup — 0.64 ng/ml and 0.31 ng/ml, respectively ($p < 0.05$). **Conclusions.** An excess of testosterone in early gestation has teratogenic effects in the offspring. Opposite changes in neurotransmitter signaling, arising on a background of prenatal hyperandrogenisation in the later stages of gestation, may indirectly lead to inversions of sexual differentiation and sexual behavior. Prenatal hyperandrogenisation is associated with higher levels of kisspeptin in blood, what suggesting an indirect effect of androgenisation in the later stages of gestation on activation kisspeptin signaling and activation of the gonadal axis. Continuation of the study of the association profile changes of monoamine neurotransmitters and dynamics of kisspeptin able to expand the understanding of the mechanisms of sexual differentiation of the brain and translate the findings into clinical practice.

Keywords: norepinephrine; serotonin; kisspeptin; sexual differentiation of the brain; hyperandrogenisation; female rats.

For citation: Nikitina I.L., Kudryashova E.K., Masel A., Bairamov A.A., Shabanov P.D. Level of monoamine neurotransmitters in the central nervous system and kisspeptin in blood in the offsprings of experimentally induced model hyperandrogenisation in female rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (1): 4–12. (in Russ.).

For correspondence: Nikitina I.L. Professor, M.D., Ph.D., Chief of Pediatric Endocrinology Department «North-West Federal Medical Research Center named after Almazov»; 2, ul. Akkuratova, St. Petersburg, 197341, Russia, e-mail: nikitina0901@gmail.com

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 13.10.2016

Введение

Вопросы, связанные с пониманием многоуровневых взаимосвязей между нервной и эндокринной системами, лежащих в основе формирования психического статуса, эмоций, когнитивных функций, особенностей поведения, включая половую самоидентификацию и сексуальную ориентацию, сохраняют актуальность и большой исследовательский интерес. С середины XIX столетия, и особенно во второй половине прошлого века, отмечается активное развитие новой науки — психонейроэндокринологии, изучающей роль нейрогуморальной системы организма в контроле и регулировании интегративной деятельности головного мозга человека [1—4]. В иерархической структуре управления названными процессами гормонам отводится промежуточная позиция между нейромедиаторами и ферментами, которые осуществляют непосредственный межсинаптический сигналинг и регулируют метаболического гомеостаза организма. При этом очевидно, что количественные и качественные нарушения синтеза и секреции гормонов, равно как и нейромедиаторов центральной нервной системы (ЦНС), способны привести к глубоким депривациям в психической и поведенческой сфере [5, 6]. Частным случаем в этой области является нарушение половой дифференцировки мозга. Исторически взгляды на половую самоидентичность и физиологические механизмы, лежащие в ее основе, претерпевали изменения. С середины 70-х годов прошлого века произошла смена концепции половой дифференцировки мозга — на смену ранее пропагандируемому убеждению, что половая самоидентификация и поведение человека полностью определяются внешними факторами (социальной средой, воспитанием в присвоенном поле), что не оправдало себя, так как повзрослевшие пациенты часто не соглашались с ранее установленным полом, пришла современная концепция, согласно которой половая дифференцировка мозга пренатальна и необратима. Среди наиболее важных факторов, определяющих пренатальную дифференцировку мозга во второй половине внутриутробного периода развития плода, имеют значение уровень андрогенов, экспрессия ряда генов, уровень кисспептина и, вероятно, другие факторы, характер влияния которых недостаточно изучен до настоящего времени [7, 8]. В физиологических условиях внутриутробно из половых стероидов именно андрогены (тестостерон) должны активно синтезироваться у плодов мужского пола. При патологическом развитии плода андрогены могут избыточно присутствовать у плодов женского и отсутствовать у плодов мужского пола. Роль тестостерона состоит в оказании дифференцирующего в сторону маскулинности влияния на половую дифференцировку мозга. Получены данные о существовании двух пулов

тестостерона в ЦНС — ароматизированного в эстрогены (эстрадиол, эстрон), которые взаимодействуют с соответствующими лигандами структур головного мозга, и неароматизированного (5-альфа дигидротестостерона), который играет важную роль в формировании сексуальных функций в соответствии с мужским полом. Между эстрогенами и андрогенами в ЦНС существуют сложные, не до конца изученные, взаимоотношения. К числу новых регуляторных систем полового поведения и идентичности относится лиганд-рецепторная система кисспептинов, включающая ген *KISS1*, рецептор *KISS1R* и собственно кисспептины, относящиеся к числу пептидных сигнальных регуляторов большого числа функций, имеющих отношение к поддержанию функциональной активности репродуктивной системы, регуляции взаимодействий между периферическими и центральными отделами гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, а также к процессам половой дифференцировки мозга [9—11]. Взаимодействие и передача информационных сигналов как в гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, так и при межнейрональном сигналинге в пределах ЦНС, опосредовано действием нейромедиаторов, изменяющих концентрации в ответ на действие гормонов и биологически активных пептидов, к которым относятся, в том числе кисспептины. Исследования последних десятилетий дают интересную научную информацию в отношении количественных изменений, топики секретирующих ядер моноаминовых нейромедиаторов в ассоциации с клиническими наблюдениями вариантов полового поведения, сексуальной самоидентификации и ориентации животных мужского и женского пола. Так, существует гипотеза, что в основе гомосексуальной и бисексуальной половой ориентации имеет место сильная норадренергическая и слабая серотонинергическая системы [12]. Другими исследователями [13] показано, что повышение уровня НЭ, секретируемого медиальными ядрами преоптической зоны гипоталамуса, сопровождается повышением сексуальной активности и возбуждения, в то время как высвобождение серотонина (С) латеральными ядрами переднего гипоталамуса, напротив, снижало сексуальное влечение, так как ингибировались дофаминсекретирующие нейроны [13]. Lin T.W. и соавт. (2013) подчеркивали, что наличие тестостерона, инициирующего повышение уровня окиси азота, являлось необходимым условием для реализации дофаминергической секреции в медиальных преоптических ядрах гипоталамуса. При этом они отметили, что взаимные изменения дофаминовой и серотониновой секреции в различных областях головного мозга способствовали как повышению сексуальной активности, так и появлению сексуальной удовлетворенности [14]. Однако, несмотря на достаточно ак-

тивное исследование изменений уровней нейромедиаторов — производных моноаминов, сохраняются открытыми ряд вопросов, касающихся нейрофизиологических основ формирования полового поведения, самоидентификации и сексуальной роли индивидуума. В последние годы интенсивно изучается роль лиганд-рецепторной системы кинспептина в вышеуказанных процессах, а также характер взаимодействий последних с нейромедиаторами ЦНС и половыми гормонами [9, 11]. Вместе с тем, в клинической практике часто возникает необходимость принятия решений, связанных с присвоением пола пациентам, имеющим анатомические нарушения половой дифференцировки. При этом сами пациенты, в силу раннего возраста либо других причин, не всегда способны участвовать в таком решении, и перед клиницистом стоит задача максимально точно прогнозировать характер пренатальной половой дифференцировки мозга в каждом индивидуальном случае. Ошибочное заключение при этом способно тяжело травмировать психику растущего пациента впоследствии, привести к психосоциальной дезадаптации и даже суициду. Поэтому расширение знаний в области психонейроэндокринологии половой дифференцировки мозга, а также поиск и определение биохимических и гуморальных маркеров, способных оказать помощь в предиктивной диагностике психологического пола, имеют несомненную актуальность.

В подавляющем большинстве публикаций, посвященных пренатальной гиперандрогенизации изучался моноаминовый сигналинг у потомства мужского пола, при этом подобные исследования у потомства женского пола немногочисленны. В связи с этим исследование последствий пренатальной гиперандрогенизации в отношении гендер-ассоциированной дифференцировки мозга у самок крыс в свете существующей в настоящее время научной концепции значимого влияния пренатального уровня андрогенов на половую дифференцировку мозга и связанную с ней половую идентификацию, лежащую в основе понятия психологического пола, представляется очень важным и нуждается в дальнейших исследованиях.

Цель исследования — изучение профиля моноаминовых медиаторов в ЦНС в ассоциации с уровнем кинспептинов в крови у потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс.

Методика

Опыты выполнены на 50 половозрелых самках крыс линии Wistar, выращенных в условиях вивария. Животных содержали при свободном доступе к воде и пище. Все опыты проведены в осенне-зимний период.

Модель гиперандрогенизации создавали путем внутривентрикулярного введения беременным самкам на 11-е сут. гестации (2-й триместр, $n = 20$) и 18-е сут. гестации (3-й триместр, $n = 19$) тестостерона в дозе 30 мг/кг. Беременным самкам интактных крыс (группа контроля, $n = 20$) вводили в эти же сроки стерильный апиrogenный физиологический раствор (0,01 мл/г 0,9% NaCl внутривентрикулярно). От самок с пренатальной андрогенизацией во 2-м триместре получено потомство 37 крысят, из них: мертворожденных 7, самок 20, самцов 10.

От самок с гиперандрогенизацией в 3-м триместре получено потомство 30 крысят, из них: мертворожденных 2, самок 18, самцов 10.

Объектом дальнейшего изучения было потомство женского пола.

Были сформированы следующие группы:

- 1-я группа — двухмесячные самки, ($n = 5$), 2-я — четырехмесячные самки ($n = 5$), рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации во 2-м триместре.

- 3-я и 4-я группы, соответственно двух- ($n = 5$) и четырехмесячные ($n = 5$) самки, рожденные в условиях пренатальной гиперандрогенизации в 3-м триместре.

- 5-я и 6-я группы — контроль: самки, рожденные в условиях физиологически протекающей беременности в возрасте 2 ($n = 5$) и 4 мес. ($n = 5$).

Критерии исключения: любые отклонения от стандартов линии Wistar по массе, возрасту и видимым признакам. Экстраполирование на соответствующие стадии полового развития у человека: крысы 2-месячного возраста — препубертатный период, 4-месячного — завершившееся половое созревание у человека.

Концентрацию норэпинефрина (НЭ) и серотонина (С) в структурах мозга потомства определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на «Beckman System Gold» с электрохимическим детектором LC-4С. В исследованиях использовали структуры, участвующие в реализации поведенческих половых реакций — гиппокамп, миндалевидный комплекс и гипоталамус. Участки мозга выделяли при -20°C и сохраняли в жидком азоте. Для хроматографического анализа структуры мозга гомогенизировали в охлажденной 0,1 N хлорной кислоте, и центрифугировали при 14000 г в течение 7 мин при 4°C . Каждая структура мозга сохранялась в отдельной 0,2-мл пробирке, после взвешивания переносилась в 0,5-мл пробирку, где гомогенизировалась в течение 45—60 с на ледяной подложке с помощью микрогомогенизатора с наконечником из стальной проволоки. Далее, гомогенат центрифугировали в этой же пробирке в микроцентрифуге (Beckman, Германия). Слой супернатанта фильтровали через

0,20-мм Millipore фильтр. Часть супернатанта в объеме 20 мкл вводили в систему HPLC-ED. Аналитическое время пробега пробы в хроматографической колонке составляло 18 мин в изократическом режиме при скорости 1.0 мл/мин. Идентификацию и чистоту хроматографических пиков, а также их количественную оценку осуществляли по отношению к пикам, полученным от внешних стандартов. Стандарты для контроля определяемых медиаторов и их метаболитов вводили в систему в начале и в конце работы хроматографа.

Концентрацию кассептина в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием Elisa Kit набора (CSB-E1343rTestEnzyme-linkedImmunsorbentAsay-KitForthe quantitative determination of rat kisspeptin-1 (KISS1),China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2. Концентрацию тестостерона в плазме крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализатора Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa Kit набора (CSB-E05100rTestEnzyme-linkedImmunsorbentAsayKitForthe quantitative determination of rat testosterone concentrations, China) и сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 25,6 нг/мл, 6,4 нг/мл, 2 нг/мл, 0,5 нг/мл, 0,13 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2.

В ходе подготовки и проведения эксперимента были соблюдены принципы гуманного отношения к лабораторным животным в соответствии с «Руководящими методическими материалами по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств» (1984), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267).

Методы статистического анализа

Выборка для каждой группы крыс составила не менее 5 животных. Для оценки значимости влияния изучаемых факторов на полученный результат использовали метод однофакторного дисперсионного анализа; для сравнения пар показателей в группах опыта и контроля применяли непараметрический метод рангового сравнения — вычисление парного критерия Вилкоксона (W-критерий). Различия считали существенными при уровне значимости различий $p < 0,05$. Статистическую обработку проводили в пакете программ Microsoft Excel 2010®.

Результаты и обсуждение

Представленные в данной публикации результаты являются фрагментом клинико-экспериментального исследования, проводимого с целью углубления понимания нейроэндокринных основ сексуальной дифференцировки мозга в ассоциации с особенностями полового поведения и самоидентификации. Базируясь на современной концепции пренатального завершения и необратимости формирования психологического пола, и значимой роли тестостерона в данном процессе, экспериментальная часть исследования была основана на создании модели гиперандрогенизации беременных самок крыс на разных (ранних и поздних) сроках гестации, и анализе изменений нейромедиаторного и гуморального профиля в центральных и периферических отделах гонадной оси потомства женского пола. Анализ был проведен в сравнительном аспекте с интактными крысами в двух возрастно-физиологических этапах жизни — препубертатном (потомство 2 мес.) и пубертатном (потомство 4 мес.). В работе планировалась оценка как прямого влияния препарата на развивающийся внутриутробно плод, так и опосредованного, так как введение препарата производилось не непосредственно потомству, а беременной самке, т.е. оценивалось влияние тестостерона на различные функции, связанные в пределах гонадной оси, с регуляторными процессами лежащими в основе гендер-специфической дифференцировки головного мозга.

На первом этапе были оценены последствия прямого влияния фармакологических доз тестостерона. В ходе осмотра потомства крыс, андрогенизированных на более ранних сроках гестации, отмечались врожденные пороки развития хвостов и задних лапок (перетяжки, укорочение, фокомелия). Также в этой группе был констатирован более высокий процент мертворождения — 18,9% по сравнению с потомством, полученном от самок с гиперандрогенизацией в 3-м триместре, где аналогичный показатель составил всего 6%. Принимая во внимание, что процессы эмбриогенеза протекают на ранних этапах гестации, и воздействия повреждающих факторов на этих сроках могут приводить к формированию врожденных пороков, часто не совместимых с жизнью, значимое повышение мертворожденности и врожденных аномалий среди потомства андрогенизированных на ранних сроках гестации крыс указывает на тот факт, что тестостерон может оказывать значимое тератогенное действие, если присутствует во время гестации в нефизиологических количествах.

Исследование профиля моноаминовых нейромедиаторов НЭ и С проведено в 3 ассоциированных с половым диморфизмом структурах ЦНС — гипоталамусе, гиппокампе и миндалевидном комплексе. Каждая из названных структур играет определенную роль в иерархи-

ческой системе управления половыми функциями организма, при этом гипоталамус имеет наиболее высокую плотность нейросекреторных ядер, секретирующих гонадотропин-рилизинг гормон (ГнРГ), ксипептины и другие биологически активные нейромедиаторы.

В ядрах гипоталамуса у потомства женского пола при гиперандрогенизации во 2-м и 3-м триместрах было выявлено значимое повышение концентрации НЭ в сравнении с группой контроля (табл. 1). В гиппокампе были получены сходные результаты — в группах пренатальной гиперандрогенизации во 2-м

и 3-м триместрах было выявлено статистически значимое повышение уровня НЭ в сравнении с контролем (табл. 2). В миндалевидном комплексе, вне зависимости от сроков гиперандрогенизации, изменений уровня НЭ в сравнении с группой контроля не выявлено. Сделано общее заключение, что вне зависимости от сроков воздействия фактор пренатальной гиперандрогенизации оказывал значимое влияние на концентрацию НЭ в структурах гиппокампа и гипоталамуса, не влияя на уровень данного нейромедиатора в структурах миндалевидного комплекса.

Таблица 1

Уровень нейромедиаторов в гипоталамусе потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс

Нейромедиатор	Показатель	Контроль (n = 10)	Потомство андрогенизированных во 2-м триместре крыс (n = 10)	Потомство андрогенизированных в 3-м триместре крыс (n = 10)	p
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	2,132	3,642	3,685	p* < 0,001 p** < 0,001
	Дисперсия	0,020	0,471	0,383	
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	1,637	1,432	1,294	p* > 0,05 p** < 0,05
	Дисперсия	0,004	0,236	0,033	
Примечание. p* — сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p** — сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем					

Таблица 2

Уровень нейромедиаторов в гиппокампе потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс

Нейромедиатор	Показатель	Контроль (n = 10)	Потомство андрогенизированных во 2-м триместре крыс (n = 10)	Потомство андрогенизированных в 3-м триместре крыс (n = 10)	p
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,068	1,517	2,068	p* < 0,05 p** < 0,05
	Дисперсия	0,001	1,486	0,985	
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,837	0,989	1,121	p* > 0,05 p** > 0,05
	Дисперсия	0,001	0,036	0,043	
Примечание. p* — сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p** — сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем					

Таблица 3

Уровень нейромедиаторов в миндалевидном комплексе потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс

Нейромедиатор	Показатель	Контроль (n = 10)	Потомство андрогенизированных во 2-м триместре крыс (n = 10)	Потомство андрогенизированных в 3-м триместре крыс (n = 10)	p
Норэпинефрин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	0,674	0,92	0,781	p* > 0,05 p** > 0,05
	Дисперсия	0,005	1,757	1,789	
Серотонин	Медиана (нг/мг сырой ткани)	1,428	1,221	0,885	p* > 0,05 p** < 0,05
	Дисперсия	0,002	0,09	0,111	
Примечание. p* — сравнение группы андрогенизированных во 2-м триместре с контролем; p** — сравнение группы андрогенизированных в 3-м триместре с контролем					

Динамика изменений уровня серотонина была не столь однонаправленной. Так, в гипоталамусе значимое снижение концентрации С отмечалось только в группе потомства самок, андрогенизированных на поздних сроках гестации. Данная тенденция к снижению имела место и в отношении группы андрогенизации во 2-м триместре, однако статистически значимых различий установлено не было (табл. 1). В миндалевидном комплексе изменения были сходными с таковыми в гипоталамусе — снижение уровня С в группе андрогенизации на поздних сроках гестации (табл. 3). В гиппокампе значимых изменений уровня С во всех исследуемых группах установлено не было (табл. 1—3).

Таким образом, основные изменения уровня нейромедиатора С были выявлены у потомства женского пола самок, гиперандрогенизированных на поздних

сроках гестации, и заключались в снижении его концентрации в структурах гипоталамуса и миндалевидного комплекса по сравнению с таковым у интактных крыс сопоставимой по полу и возрасту группы.

Следующим этапом исследования был сравнительный анализ уровня тестостерона и кисспептина в крови потомства женского пола гиперандрогенизированных самок крыс. Статистически значимых различий в уровне тестостерона в крови потомства самок крыс, андрогенизированных в разные сроки гестации, по сравнению с соответствующим контролем, не отмечено (табл. 4).

Сделано заключение, что пренатальная андрогенизация беременных самок крыс (непрямое действие на потомство), не приводила к значимым отклонениям в уровне тестостерона в плазме.

Таблица 4

Концентрация тестостерона в плазме крови самок крыс (нг/мл)

Группы	Концентрация тестостерона в плазме (нг/мл)					Ме	W-критерий	р
Контроль 2 мес. (n = 5)	3,98	5,78	4,34	5,12	4,17	4,34	** 0,31 *** 1,15	**>0,05 ***>0,05
Контроль 4 мес. (n = 5)	3,02	5,13	4,67	5,22	6,47	5,13	**** 0,31 ***** 0,94	****>0,05 *****>0,05
2 триместр 2 мес. (n = 5)	7,42	6,97	4,04	3,9	4,39	4,39		
2 триместр 4 мес. (n = 5)	6,40	6,75	3,01	5,69	4,61	5,69		
3 триместр 2 мес. (n = 5)	7,92	4,59	5,23	4,84	4,63	4,84		
3 триместр 4 мес. (n = 5)	5,04	2,99	1,63	3,97	7,46	3,97		

Примечание. * W-критерий — критерий Вилкоксона; ** — сравнение «контроль 2 мес. — 2 триместр 2 мес.»; *** — сравнение «контроль 2 мес. — 3 триместр 2 мес.»; **** — сравнение «контроль 4 мес. — 2 триместр 4 мес.»; ***** — сравнение «контроль 4 мес. — 3 триместр 4 мес.»; ***** — сравнение «2 триместр 4 мес. — 3 триместр 4 мес.».

Таблица 5

Концентрация кисспептина в плазме самок крыс (нг/мл)

Группы	Концентрация кисспептина в плазме (нг/мл)					Ме	W-критерий	р
Контроль 2 мес. (n = 5)	0,13	0,24	0,17	0,21	0,14	0,17	** 41,2 *** 2,4	**<0,01 ***<0,05
Контроль 4 мес. (n = 5)	0,39	0,29	0,23	0,31	0,41	0,31	**** 1,36 ***** 2,6	****>0,05 *****<0,01
2 триместр 2 мес. (n = 5)	0	0	0,01	0,61	0,47	0,01	***** 0,1	*****>0,05
2 триместр 4 мес. (n = 5)	0,99	0,27	0,35	0,93	0,67	0,67		
3 триместр 2 мес. (n = 5)	0,67	0,82	0,89	0,23	0,39	0,67		
3 триместр 4 мес. (n = 5)	0,64	0,44	0,75	0,86	0,51	0,64		

Примечание. * W-критерий — критерий Вилкоксона; ** — сравнение «контроль 2 мес. — 2-й триместр 2 мес.»; *** — сравнение «контроль 2 мес. — 3-й триместр 2 мес.»; **** — сравнение «контроль 4 мес. — 2-й триместр 4 мес.»; ***** — сравнение «контроль 4 мес. — 3-й триместр 4 мес.»; ***** — сравнение — 2-й триместр 4 мес. — 3-й триместр 4 мес.

Иные результаты были получены в отношении концентраций кисспептина в плазме. Установлено, что уровень кисспептина статистически значимо возрос в обеих опытных группах (2- и 4-мес.) при гиперандрогенизации на поздних сроках гестации (табл. 5). В группе потомства крыс, андрогенизированных на ранних сроках гестации (во 2-м триместре), изменения уровня белка кисспептина было разнонаправленным и незакономерным (табл. 5).

Таким образом, в отличие от результатов, представленных выше в отношении тестостерона, пренатальная андрогенизация беременных самок крыс, (непрямое действие на потомство), приводила к статистически значимому возрастанию, плазменного уровня кисспептина.

Подводя общий итог проведенного исследования, представляется целесообразным обсудить следующее. Избыток тестостерона на ранних и поздних сроках гестации, способен оказывать прямое и опосредованное, разнонаправленное влияние на развитие потомства женского пола. При андрогенизации на ранних, ассоциированных с эмбриогенезом, сроках пренатального развития плода очевидно тератогенное действие тестостерона, приводящее как к значимому росту внутриутробной гибели плода, так и к увеличению числа видимых врожденных аномалий развития. В структурах ЦНС, имеющих отношение к регуляции полового развития и половой дифференцировке мозга, наиболее выраженные изменения нейромедиаторного сигналинга связаны, напротив, с более поздним периодом гиперандрогенизации. Так, установлено значимое повышение уровня нейромедиатора нораэпинефрина, способного, по мнению ряда исследований, опосредовать влияние андрогенов на половую дифференцировку мозга и быть ассоциированным с маскулинизацией у особей женского пола. Избыток уровня дофамина и его производных, к которым относится НЭ, влечет повышение агрессивности, жестокости, гиперсексуальности в половом поведении, независимо от гендерной принадлежности. Что касается профиля другого исследуемого нейромедиатора, серотонина, то выявленные изменения его уровня также были диагностированы в группах с более поздним периодом андрогенизации. Установленное снижение уровня С у потомства женского пола, несомненно, способно также оказывать детерминирующее влияние на половое поведение и дифференцировку, что подтверждают данные, свидетельствующие об ассоциациях низкого уровня этого нейромедиатора с инверсиями половой ориентации, в частности, гомосексуальности и бисексуальности.

Что касается изучения периферических гуморальных взаимодействий, то следует подчеркнуть, что отсутствие каких-либо изменений уровня тестостерона

в крови самок крыс, андрогенизированных пренатально, свидетельствует об отсутствии прямого влияния тестостерона на изменение гормонального статуса. Тем больший интерес представляют полученные результаты в отношении динамики уровня кисспептина. Фактор андрогенизации на поздних сроках гестации привел к существенному возрастанию уровня этого пептида в крови потомства, что опосредовано, учитывая предшествующие данные в отношении тестостерона, непрямым воздействием этого фактора на кисспептиновый сигналинг. Учитывая обсуждаемое в последние годы многообразное участие системы KISS-KISS1R в регуляции функциональной активности гонадной оси и детерминацию полового поведения, можно гипотетически предположить неслучайность и взаимосвязанность однонаправленных событий, касающихся нейромедиаторного сигналинга в ЦНС (повышение дофаминовых производных (НЭ), снижение серотонина) и повышение плазменного уровня кисспептина у особей женского пола, имевших пренатальную гиперандрогенизацию на поздних сроках гестации. Основываясь на современной концепции половой дифференцировки мозга, предполагающей одним из основных детерминирующих факторов последней дифференцирующее действие тестостерона именно во второй половине гестации, т.е. на более поздних, по отношению к анатомической дифференцировке пола, сроках, следует подчеркнуть, что практически все значимые изменения, в сравнении с контрольной группой потомства интактных крыс, были выявлены именно в группе с андрогенизацией на поздних сроках гестации, что, в связи с этим, может рассматриваться, как обоснование нейрогуморальных основ нарушений формирования психологического пола в соответствии с анатомическим.

Продолжение изучения ассоциации изменения профиля нейромедиаторов моноаминового ряда и динамики кисспептина способно расширить понимание механизмов половой дифференцировки мозга и транслировать полученные данные в клиническую практику.

References

1. Sapronov N.S., Fedotova Y.O. *Hormones of hypothalamic-pituitary-thyroid system and brain. [Gormony gipotalamo-gipofizarno-tireoidnoi sistemy i mozg]*. St.Peterburg: Lan'; 2002. (in Russian)
2. Dorner G. *Perinatal hormone levels and brain organization*. In: Stumpf W.E., Grant L.D. *Anatomical Neuroendocrinology*. Basel: Karger; 1975:245-252. doi:10.1159/000398041
3. Dorner G. *Hormones, brain development and fundamental processes of life*. In: Dorner G. *Hormones and Brain Development*. Amsterdam: Elsevier; 1978:13-25.
4. Nikitina I.L. *Pediatric endocrinology. [Detskaya endokrinologiya]*. Rostov-na-Donu: Feniks; 2006. (in Russian)
5. Curzon G. A relationship between brain serotonin and adrenocortical secretion and its possible significance in endo-

genous depression. *Pharmacopsychiatry*. 1969; 2(4):234-244. doi:10.1055/s-0028-1094251

6. Ettigi P.G., Brown G.M. Psychoneuroendocrinology of affective disorder. *Am J Psychiatry*. 1977;134(5):493-501. doi:10.1176/ajp.134.5.493

7. Worrell L.A. *Sexual differentiation of the brain related to gender identity: beyond hormones*. Master Thesis, Faculty of Medicine, Universiteit Utrecht [Internet] 2010. [cited 2016 Nov 1]. Available from: <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/182733>

8. Swaab D.E., Garcia-Falgueras A. Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Funct Neurol*. 2009; 24(1):17-28.

9. Tena-Sempere M. Roles of kisspeptins in the control of hypothalamic-gonadotropic function: focus on sexual differentiation and puberty onset. *Endocr Dev*. 2010;17:52-62. doi: 10.1159/000262528

10. Nikitina I.L. The timing of puberty: well-known and new. *Arterial'naya gipertenziya*. 2013; 19(3): 227-36. (in Russian)

11. Nikitina I.L., Bayramov A.A., Khoduleva Y.N., Shabanov P.D. Kisspeptins in physiology and pathology of sex development — new diagnostic and therapeutic approaches. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2014; 12(4): 3-12. (in Russian) doi: 10.17816/RCF1243-12

12. Fitzgerald P.J. A neurotransmitter system theory of sexual orientation. *J Sex Med*. 2008;5(3):746-748. doi:10.1111/j.1743-6109.2007.00693.x

13. Kim S.W., Schenck C.H., Grant J.E., Yoon E, Dosa P.I., Odlaug B.L. et al. Neurobiology of sexual desire. *NeuroQuantology*. 2013; 11(2):332-59. doi:10.14704/nq.2013.11.2.662

14. Lin T.W., Kuo Yu.M. Exercise benefits brain function: the monoamine connection. *Brain Sci*. 2013; 3(1): 39-53. doi:10.3390/brainsci3010039

Сведения об авторах:

Кудряшова Елена Константиновна аспирант кафедры детских болезней, врач, e-mail: aksi-lena@rambler.ru

Масель Алиса Сергеевна клинический ординатор кафедры детских болезней; врач, e-mail: masel.alisa@gmail.com

Байрамов Алекбер Азизович доктор мед. наук, д.м.н., врач, e-mail: alekber@mail.ru

Шабанов Петр Дмитриевич доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. НИЛ детской эндокринологии, e-mail: shabanov@mail.rcom.ru

© Федотова Ю.О., 2017
УДК 612.82+615.21+615.357.631

Федотова Ю.О.

Блокада D₁-типа дофаминовых рецепторов корректирует воспроизведение рефлекса пассивного избегания у гонадэктомированных самцов крыс

ФГБНУ «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, 199034, г. Санкт-Петербург, Россия, наб. Макарова, д. 6
ФГБНУ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН,
194223, г. Санкт-Петербург, Россия, пр. М. Тореза, д. 44

Цель исследования — изучение роли D₁-типа дофаминовых рецепторов в избежательном поведении самцов крыс в условиях дисбаланса андрогенов. **Методика.** Работа выполнена на 180 белых самцах крыс Вистар массой 180—200 г. Гонадэктомию у самцов крыс проводили согласно общепринятой методике. Через 2 нед. после операции выполняли все поведенческие тесты. Эксперименты проводили на интактных, гонадэктомированных (ГЭ) самцах и ГЭ самцах крыс, получивших низкую дозу тестостерона пропионата. Влияние 2-недельного введения агониста D₁-типа дофаминовых рецепторов — SKF-38393 (0,1 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) и антагониста D₁-типа дофаминовых рецепторов — SCH-23390 (0,1 мг/кг, внутривнутрибрюшинно), а также комбинации этих веществ с низкой дозой тестостерона пропионата (0,5 мг/кг, подкожно) в течение 14 сут. на поведенческие процессы оценивалось на моделях условной реакции пассивного избегания (УРПИ) и в тесте «открытое поле». Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием дисперсионного анализа one-way ANOVA test с последующим Newman-Keuls post-hoc тестом. **Результаты.** Установлено, что SCH-23390 в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата полностью восстанавливает воспроизведение УРПИ у ГЭ крыс. При этом на фоне введения SCH-23390 в сочетании с тестостероном пропионатом у ГЭ самцов наблюдалось увеличение исследовательской активности и представленности груминга в тесте «открытое поле». Напротив, SKF-38393, введенный изолированно или в комбинации с тестостероном пропионатом, еще в большей степени нарушал воспроизведение УРПИ и не влиял на поведение в тесте «открытое поле» у ГЭ крыс. **Заключение.** Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что 2-недельное введение SKF-38393 выражено нарушает способность ГЭ самцов к формированию рефлекса пассивного избегания, а при его сочетанном введении с тестостероном пропионатом наблюдается блокирование позитивного эффекта гормонального препарата на пассивное обучение. Введение SCH-23390 существенно улучшало воспроизведение рефлекса пассивного избегания при дефиците андрогенов у самцов крыс. При этом комбинированное введение SCH-23390 и тестостерона пропионата полностью корректировало пассивное обучение у ГЭ крыс.

Ключевые слова: SKF-38393; SCH-23390; D₁-дофаминовые рецепторы; обучение; поведение; андрогены; гонадэктомия.

Для цитирования: Федотова Ю.О. Блокада D₁-типа дофаминовых рецепторов корректирует воспроизведение рефлекса пассивного избегания гонадэктомированных самцов крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 13—20.

Для корреспонденции: Федотова Юлия Олеговна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. нейроэндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН; вед. науч. сотр. лаб. сравнительной сомнологии и нейроэндокринологии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, e-mail: julia.fedotova@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена частично при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (грант № 14-04-00795 «Изучение роли пренатального стресса в предрасположенности к развитию тревожно-депрессивных расстройств при дисбалансе андрогенов, поиск путей фармакокоррекции»).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.03.2016

Fedotova J.O.

Blockade of D₁-type dopaminergic receptors corrects passive avoidance performance in gonadectomized male rats

FSBI Institute of Physiology named after I.P. Pavlov, Academy of Sciences, Laboratory of Neuroendocrinology,
6, Emb. Makarova, St. Petersburg, 199034, Russia
FSBI Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry named after I.M. Sechenov, Academy of Sciences,
44, Tores Pr., St. Petersburg, 194223, Russia

The purpose of the present work was to devote the comparative analysis of agonist and antagonists of D₁-dopaminergic receptors effects on passive avoidance learning in male rats with imbalance of androgens. **Methods.** Experiments were carried out on albino male rats of Wistar line (n = 180, 180—200 g). Gonadectomy of male rats was performed using standard method. Two weeks following surgery all behavioral tests were conducted. Experiments were made on intact, gonadectomized (GDX) and GDX male rats treated with low dose of testosterone propionate. The effects for chronic administration of agonist of D₁-type dopaminergic receptors — SKF-38393 (0,1 mg/kg, i.p.) and antagonist of D₁-type dopaminergic receptors — SCH-23390 (0,1 mg/kg, i.p.), as well as its combination with low dose of testosterone propionate (0,5 mg/kg, s.c.) during 14 days on behavioral processes were tested in the passive avoidance paradigm and the «open field» test. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test followed by Newman-Keuls post-hoc test. **Results.** Co-administration of SCH-23390 with low dose of testosterone propionate completely restored impaired passive avoidance performance in GDX males. Moreover, GDX rats treated with SCH-23390 plus low dose of testosterone propionate demonstrated increased exploratory and grooming behavior in the «open field» test. Both SKF-38393 alone and in combination with low dose of testosterone propionate markedly impaired passive avoidance learning and failed to modify behavior in the «open field» test in GDX rats. **Conclusion.** The results of the present study suggest that chronic treatment with SKF-38393 (stimulation of D₁-type dopaminergic receptors) significantly impairs capability of GDX rats to formation of passive avoidance performance. Moreover, its combination with testosterone propionate resulted in blockade of positive effect for testosterone propionate on passive avoidance learning. Chronic administration of SCH-23390 (blockade of D₁-type dopaminergic receptors) markedly improves passive avoidance performance in GDX rats. Also, the combined treatment with SCH-23390 and testosterone propionate completely corrects passive avoidance learning in GDX male rats.

Keywords: SKF-38393; SCH-23390; D₁-dopaminergic receptor; learning; behavior; androgens; gonadectomy.

For citation: Fedotova J.O. Blockade of D₁-type dopaminergic receptors corrects passive avoidance performance in gonadectomized male rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(1): 13—20. (in Russ.).

For correspondence: Julia O. Fedotova, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher FSBI Institute of Physiology named after I.P. Pavlov, Academy of Sciences, Laboratory of Neuroendocrinology, 6, Emb. Makarova, St. Petersburg, 199034, Russian Federation and Leading Researcher FSBI Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry named after I.M. Sechenov, Academy of Sciences, 44, Tores Pr., St. Petersburg, 194223, Russian Federation, e-mail: julia.fedotova@mail.ru

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

Acknowledgments. This work was partly supported by Russian Foundation For Basic Research (grant № 14-04-00795 «The role of prenatal stress in the mechanisms for development of affective-related disorders at imbalance of androgens, search of pharmacocorrection ways»).

Information about authors:

Fedotova J.O., <http://orcid.org/0000-0002-3117-9299>

Received 24.03.2016

Введение

В настоящее время, несомненна роль половых стероидов как нейромодулирующих и нейропротекторных факторов, принимающих непосредственное участие в механизмах обучения и памяти [1—3]. Данные литературы указывают на высокую плотность рецепторов к андрогенам в структурах головного мозга, вовлеченных в реализацию поведенческих и условнорефлекторных процессов — в гиппокампе, миндалине, гипоталамусе и неокортексе [4—6]. Кроме того, функциональная активность гипофизарно-гонадной системы наиболее тесно связана с активностью дофаминергической нейромедиаторной системы головного мозга, играющей важную роль в механизмах высшей нервной деятельности [1, 7]. Доказано тесное взаимодействие и взаимное влияние гипофизарно-гонадной гормональной и дофаминергической нейромедиаторной систем. Причем, дофаминергическая система головного мозга так-

же играет одну из ведущих ролей в механизмах высшей нервной деятельности [1, 8]. На основе различия в сигнальных системах дофаминовых рецепторов их принято разделять на два семейства: D₁- и D₂-семейства рецепторов [1]. Так, D₁- и D₅-дофаминовые рецепторы относятся к D₁-семейству рецепторов [7, 8]. Рецепторы D₁-семейства ассоциированы с G_s белком, посредством которого происходит активация аденилатциклазы. Эти рецепторы усиливают внутриклеточные метаболитные реакции через увеличение концентрации цАМФ в клетке [1, 7].

D₁-типы дофаминовых рецепторов имеют практически сходную с андрогеновыми рецепторами локализацию в структурах головного мозга [1, 8]. С другой стороны, хорошо известно, что снижение оптимального уровня андрогенов приводит к серьезным изменениям психоэмоционального и когнитивного статуса мужчин [4, 9]. При этом, доказано, что уровень анд-

рогенов оказывает существенное влияние на кругооборот дофамина в гиппокампе, гипоталамусе и миндалине, а также на характер экспрессии генов D_1 -дофаминовых рецепторов в этих структурах головного мозга [9, 10]. Вместе с тем, данные о действии андрогенов на дофаминергическую передачу в головном мозге во многом противоречивы.

Цель работы — изучение роли D_1 -типа дофаминовых рецепторов в избегательном поведении самцов крыс в условиях дисбаланса андрогенов.

Методика

Работа выполнена на 180 белых самцах крыс Вистар в возрасте 3—4 мес., массой 180—200 г, из питомника «Рапполово». Животных содержали в виварии в условиях 24-часового фоторежима (12 ч день : 12 ч ночь, включение света в 7:00), контролируемой температуры ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажности ($65 \pm 10\%$) воздуха при свободном доступе к воде и стандартному корму (гранулированный комбикорм). Для содержания животных использовали пластмассовые клетки (47 x 35 x 17 см) с проволочной металлической крышкой и подстилкой из опилок лиственных пород.

Все исследования проводили в первой половине дня (10:00—13:00). В работе соблюдались правила лабораторной практики Российской Федерации, утвержденные приказом Министерства Здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. и Европейской конвенции Directive 2010/63/EU of 22 September 2010.

Удаление семенников (гонадектомия) у крыс проводили согласно общепринятой методике [11]. Через 2 нед. после операции выполняли поведенческие тесты.

Все фармакологические лиганды D_1 -типа дофаминовых рецепторов были получены из компании Сигма (США). В качестве агониста D_1 -дофаминовых рецепторов использовали SKF-38393 (0,1 мг/кг, внутривенно), в качестве антагониста D_1 -дофаминовых рецепторов — SCH-23390 (0,1 мг/кг, внутривенно), тестостерона пропионат вводился в дозе 0,5 мг/кг, подкожно. Все используемые лиганды D_1 -типа дофаминовых рецепторов растворяли в физиологическом растворе и вводили в объеме 0,1 мл на крысу массой 200 г. Тестостерона пропионат растворяли в стерильном кунжутном масле и также вводили в объеме 0,1 мл на крысу массой 200 г. Выбор дозы тестостерона пропионата обусловлен экспериментальными исследованиями, установившими эффективность используемой дозы тестостерона пропионата в адекватной коррекции эмоционального и гормонального статуса гонадектомированных (ГЭ) самцов

крыс. Контрольным крысам вводили эквивалентное количество растворителя. Введение фармакологических веществ осуществляли ежедневно 1 раз в сут. в течение 14 сут. до начала тестирования.

Для выполнения поведенческих тестов крыс случайным образом разделяли на 9 групп по 10 особей в каждой: 1-й группе (контрольные интактные самцы) вводили физиологический раствор (контроль), 2-я группа (интактные самцы) получали SKF-38393, 3-я группа (интактные самцы) получали SCH-23390, 4-я группа — контрольные ГЭ самцы, получавшие физиологический раствор, 5-я группа — ГЭ самцы, получавшие тестостерона пропионат, 6-я группа — ГЭ самцы, получавшие SKF-38393, 7-я группа — ГЭ самцы, получавшие SCH-23390, 8-я группа — ГЭ самцы, получавшие SKF-38393 в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, 9-я группа — ГЭ самцы, получавшие SCH-23390 в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата.

Всех животных за неделю до проведения поведенческих тестов ежедневно брали в руки с целью адаптации к экспериментатору.

Сохранение следа памяти оценивали по условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) [12]. УРПИ вырабатывали на основе однократного электрокожного подкрепления в установке, состоящей из двух камер — большой (освещенной) и малой (темной) с электрифицированным полом, сообщающихся между собой круглым отверстием. При обучении крысу помещали на 3 мин в середину освещенной камеры хвостом к отверстию в темную камеру. Животное исследовало камеру, находило отверстие в темную камеру и проникало в нее. Вследствие своих биологических особенностей (врожденное предпочтение темных участков пространства у грызунов) крыса предпочитала находиться в темном помещении, где проводила приблизительно 2/3 времени. Регистрировали латентный период захождения животного в темную камеру. В конце 3-й мин на электродный пол темной камеры подавали электрический ток (50 Гц, 6 мА), заставлявший крысу перебежать в освещенную камеру, откуда ее затем удаляли. У такого животного считали, что условный рефлекс пассивного избегания выработан. Воспроизведение УРПИ определяли через 24 ч. Для этого крысу помещали в установку на 3 мин. Регистрировали тот же параметр, что и при обучении. «Незахождение» в темную камеру рассматривали как воспроизведение навыка пассивного избегания, а укорочение времени нахождения в освещенной камере — как амнезию навыка.

Поведение животных оценивали в тесте «открытое поле» [13]. «Открытое поле» представляло собой квадратную площадку размером 80 x 80 см и боко-

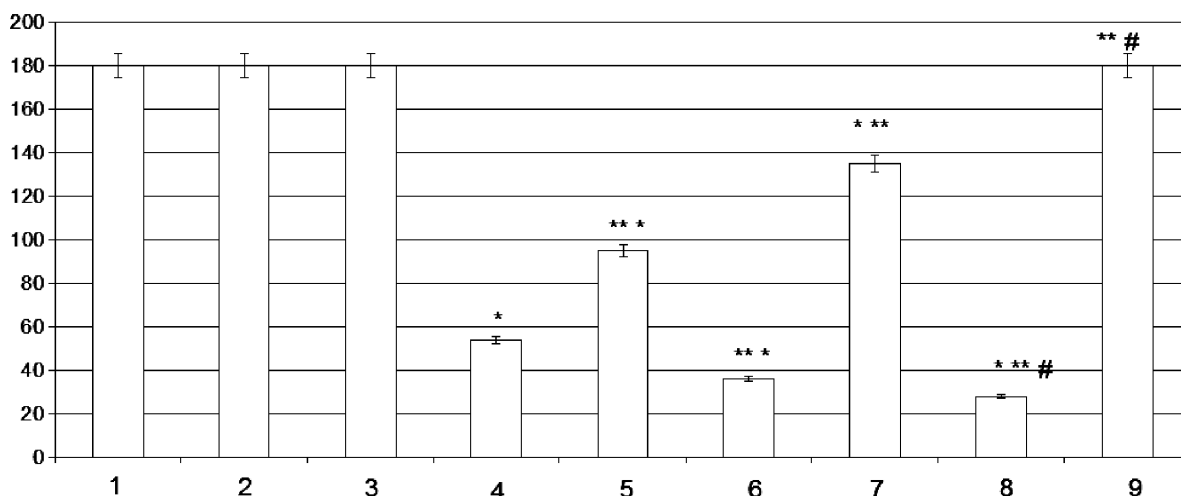
выми стенками высотой 36 см. Пол площадки был разделен на 16 равных квадратов размером 19,5 x 19,5 см. Площадка равномерно освещалась источником света. Животное помещали в центр «открытого поля» на 3 мин. Контроль изменений в поведении животного осуществлялся автоматически с помощью программно-аппаратного комплекса «Биологическая установка «открытое поле» (Государственный Электро-Технический Университет им. Д.И. Ульянова, Санкт-Петербург). Регистрировали следующие параметры: двигательную горизонтальную активность («перемещение») и двигательную вертикальную активность («вставание»); исследовательскую активность (исследование крысой круглых сквозных отверстий, расположенных в полу); груминговые реакции (вычесывание, вылизывание, умывание и др.); эмоциональные реакции (дефекация).

Статистическую обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа one-way ANOVA test с последующим Newman-Keuls post-hoc тестом с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0. Различия между значениями при $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

На модели УРПИ было установлено, что у ГЭ самцов отмечалось статистически значимое нарушение процесса воспроизведения УРПИ через 24 ч по-

сле предварительного обучения по сравнению с группой контрольных интактных крыс самцов (см. рисунок). Двухнедельное введение низкой дозы тестостерона пропионата ГЭ самцам заметно улучшало процесс воспроизведения УРПИ по сравнению с контрольными ГЭ самцами (рисунок). Введение агониста D₁-типа дофаминовых рецепторов — SKF-38393 или агониста D₁-типа дофаминовых рецепторов — SCH-23390 существенно не изменяло показатели воспроизведения УРПИ по сравнению с группой контрольных интактных самцов (рисунок). В то же время на фоне введения SKF-38393 у ГЭ самцов имело место существенное ухудшение процесса воспроизведения УРПИ по сравнению с ГЭ самцами, получавшими растворитель и контрольными крысами, что выражалось в статистически значимом снижении латентного периода незахождения животного в темную камеру через 24 ч после обучения (рисунок). Кроме того, необходимо отметить, что при введении SKF-38393 в сочетании с низкой дозой тестостерона пропионата происходило блокирование позитивного эффекта гормонального препарата на воспроизведение УРПИ у ГЭ самцов. С другой стороны, на фоне продолжительного введения SCH-23390 у ГЭ самцов наблюдалось значительное улучшение способности животных к воспроизведению УРПИ, что выражалось в статистически значимом увеличении латентного периода незахождения животного в темную камеру через 24 ч после обучения (рисунок). При этом,



Влияние SKF-38393 и SCH-23390, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, на воспроизведение УРПИ гонадэктомированных самцов крыс.

Ось X — группы животных, Ось Y — латентный период, с. Группы животных: 1-я гр. — контрольные интактные самцы, получавшие физиологический раствор (контроль), 2-я гр. — интактные самцы, получавшие SKF-38393, 3-я гр. — интактные самцы, получавшие SCH-23390, 4-я гр. — контрольные ГЭ самцы, получавшие физиологический раствор, 5-я гр. — ГЭ самцы, получавшие тестостерона пропионат, 6-я гр. — ГЭ самцы, получавшие SKF-38393, 7-я гр. — ГЭ самцы, получавшие SCH-23390, 8-я гр. — ГЭ самцы, получавшие SKF-38393 в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, 9-я гр. — ГЭ самцы, получавшие SCH-23390 в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата. * — $p < 0,05$, статистически значимые отличия от контрольных интактных самцов, ** — $p < 0,05$, статистически значимые отличия от ГЭ самцов, # — $p < 0,05$, статистически значимые отличия от ГЭ самцов, получавших низкую дозу тестостерона пропионата. Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах — $n = 10$.

на фоне применения SCH-23390 в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата проявлялось кумулятивное позитивное действие обоих веществ на процесс пассивного обучения, т.е. наблюдалось полное восстановление процесса воспроизведения УРПИ до показателей, регистрируемых в группе контрольных интактных самцов.

В тесте «открытое поле» было выявлено, что продолжительное введение SKF-38393 интактным самцам статистически значимо снижало горизонтальную двигательную активность и повышало представленность груминга по сравнению с контрольной группой крыс (см. таблицу). На фоне введения SCH-23390 у интактных самцов отмечалось сходное уменьшение показателя горизонтальной двигательной активности, как и в случае использования SKF-38393, при параллельном существенном снижении представленности груминга и угнетении эмоционального компонента поведения по сравнению с контрольной группой крыс (таблица). Экспериментальный дефицит андрогенов, обусловленный удалением гонад, значимо не изменял структуру поведения животных в тесте «открытое поле» по сравнению с контрольной группой интактных крыс (таблица). На фоне введения тестостерона пропионата ГЭ самцам также не было выявлено каких-либо статистически значимых различий в показателях поведенческих реакции по сравнению с ГЭ самцами и контрольными интактными крысами. Продолжительное введение SCH-23390 изолированно или в сочетании с низкой дозой тестостерона пропионата не меняло общий характер поведения ГЭ самцов по сравнению с контрольными интактными и ГЭ самцами (таблица).

В условиях введения SKF-38393 одного или в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата отмечалось значимое увеличение представленности груминга и исследовательской активности по сравнению с контрольными группами интактных и ГЭ крыс, а также с группой ГЭ самцов, получавших только тестостерона пропионат (таблица). Необходимо отметить, что у группы ГЭ животных, получавших комбинированное введение SKF-38393 и тестостерона пропионата, поведенческие реакции заметно отличались от ГЭ крыс, получавших только тестостерона пропионат. Подобный факт, позволяет говорить о том, что в условиях дефицита андрогенов, независимо от наличия или отсутствия экзогенного введения гормонального препарата, реализуется только поведенческий эффект агониста D₁-типа дофаминовых рецепторов в тесте «открытое поле».

Результаты исследования свидетельствуют о том, что на поведенческие ответы селективного агониста или антагониста D₁-подтипа рецепторов влияют гормональные сдвиги, происходящие у самцов крыс как после гонадэктомии, так и в условиях экзогенного введения тестостерона пропионата. Полученные результаты указывают на то, что уровень андрогенов в организме может играть триггерную роль в поведенческих изменениях, связанных с дофаминергической системой головного мозга. Можно также говорить о том, что как стимуляция, так и блокада D₁-типа дофаминовых рецепторов разнонаправленно влияют на динамику воспроизведения рефлекса пассивного избегания в условиях дефицита андрогенов. Кроме того, результаты доказывают, что препараты, влияю-

Таблица

Влияние SKF-38393 и SCH-23390, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой тестостерона пропионата, на поведение гонадэктомированных самцов крыс в тесте «открытое поле»

Группы животных	Двигательная активность		Исследовательская активность	Эмоциональность	
	Перемещение	Вставание		Груминг	Дефекация
Интактные самцы (контроль)	65,6 ± 2,8	10,1 ± 1,2	3,0 ± 0,6	2,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Интактные самцы + SKF-38393	26,6 ± 0,9*	8,0 ± 0,5	2,8 ± 0,8	6,6 ± 0,7*	1,4 ± 0,4
Интактные самцы + SCH-23390	25,8 ± 1,7*	7,7 ± 1,1	2,4 ± 0,5	0,6 ± 0,2*	0
ГЭ самцы	58,4 ± 2,4	12,2 ± 2,0	4,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2
ГЭ самцы + тестостерона пропионат	57,1 ± 2,6	10,9 ± 2,2	3,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2
ГЭ самцы + SKF-38393	62,4 ± 2,4	12,8 ± 2,0	6,7 ± 0,4* **	5,9 ± 0,2* **	1,2 ± 0,2
ГЭ самцы + SCH-23390	55,9 ± 2,6	13,2 ± 1,4	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2
ГЭ самцы + SKF-38393 + тестостерона пропионат	67,8 ± 2,4	15,1 ± 1,2	7,4 ± 0,8* ** #	7,2 ± 0,2* ** #	0,8 ± 0,2
ГЭ самцы + SCH-23390 + тестостерона пропионат	59,4 ± 2,8	11,3 ± 2,0	3,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2

Примечание. * — p<0,05, статистически значимое отличие от контрольных интактных самцов; ** — p<0,05, статистически значимое отличие от ГЭ самцов; # — p<0,05, статистически значимое отличие от ГЭ самцов, получавших низкую дозу тестостерона пропионата. Данные представлены в виде M ± m, количество животных в группах — 10 (n = 10).

щие на дофаминергическую нейротрансдукцию, модулируют не только тревожность, но и поведенческие процессы у самцов с разным гормональным статусом.

Модель УРПИ показала, что у ГЭ самцов воспроизведение этого рефлекса не происходит, тогда как введение низкой дозы тестостерона пропионата приводит к частичному улучшению выработки УРПИ. Полученные результаты согласуются с данными литературы о снижении способности к выработке условных рефлексов на различных моделях обучения у самцов крыс с низким уровнем андрогенов в организме, а также с тем, что повышение уровня тестостерона в организме у самцов крыс облегчает процесс консолидации и воспроизведение следа из долговременной памяти [8, 9, 14]. При этом следует отметить, что тестостерон проявляет свой позитивный эффект только на когнитивный статус ГЭ самцов крыс, при этом не изменяя характер поведенческих реакций у этих крыс. Данные литературы о влиянии как гонадэктомии, так и экзогенного введения тестостерона пропионата во многом противоречивы и неоднозначны, вследствие использования разных линий крыс, продолжительности введения и используемых доз гормонального препарата [2, 14].

Как показывает анализ результатов, полученных на модели УРПИ, продолжительное введение агониста и антагониста D_1 -типа дофаминовых рецепторов интактным самцам не меняло показатели воспроизведения УРПИ. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация или блокада центральных D_1 -типа дофаминовых рецепторов не влияет на процессы формирования и воспроизведения рефлекса пассивного избегания в условиях естественного гормонального статуса самцов.

Совершенно иная картина наблюдалась при стимуляции и блокаде D_1 -типа дофаминовых рецепторов в условиях дефицита андрогенов или экзогенного введения тестостерона пропионата. Так, продолжительное введение агониста D_1 -типа дофаминовых рецепторов — SKF-38393 в еще большей степени нарушало процесс пассивного избегания у ГЭ самцов. Наряду с этим в условиях его сочетанного применения с низкой дозой тестостерона пропионата, отмечалось блокирование позитивного эффекта гормонального вещества на способность ГЭ крыс к выработке и сохранению УРПИ. В противоположность этому, продолжительное введение антагониста D_1 -типа дофаминовых рецепторов — SCH-23390 существенно улучшало воспроизведение рефлекса пассивного избегания, а при его комбинированном введении с тестостероном пропионатом в низкой дозе регистрировалась полная коррекция процесса воспроизведения УРПИ. По-видимому, можно говорить о суммации позитивных эффектов SCH-23390 и тестостерона пропиона-

та на воспроизведение следа памяти у ГЭ самцов. Данные, полученные в тесте УРПИ у ГЭ самцов при комбинированном введении SCH-23390 и тестостерона пропионата, позволяют также говорить о триггерной роли низкой дозы тестостерона в коррекции процесса воспроизведения УРПИ. Кроме того, сочетанное введение антагониста D_1 -типа дофаминовых рецепторов и тестостерона пропионата в низкой дозе приводит к полной нормализации нарушенного процесса пассивного обучения, в отличие от изолированного введения как одного SCH-23390, так и тестостерона пропионата.

Необходимо отметить, что в предыдущих наших исследованиях, посвященных изучению эффектов лигандов D_1 -типа дофаминовых рецепторов у овариоэктомированных (ОЭ) самок крыс, были выявлены противоположные закономерности в эффектах агониста и антагониста D_1 -типа дофаминовых рецепторов на фоне их изолированного или комбинированного с низкой дозой 17β -эстрадиолом введения [15]. Так, SKF-38393, введенный изолированно или в комбинации с низкой дозой 17β -эстрадиола корректировал процесс воспроизведения УРПИ, тогда как SCH-23390, введенный таким же образом, полностью угнетал способность ОЭ самок к пассивному обучению [15]. Сравнительный анализ эффектов агониста и антагониста D_1 -типа дофаминовых рецепторов на модели УРПИ у ОЭ самок и ГЭ самцов позволяет сделать заключение о том, что поведенческие эффекты дофаминотропных веществ четко детерминируются гендерной принадлежностью и уровнем половых гормонов в организме. Таким образом, данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что активация центральных D_1 -подтипа рецепторов негативно влияет на процесс пассивного избегания при дисбалансе андрогенов. Данные результаты четко свидетельствуют о том, что центральные D_1 -подтипа рецепторы играют роль в пассивном избегании и это является гормон-зависимым процессом при колебаниях уровня андрогенов в организме самцов крыс.

В то же время, в нашем исследовании можно говорить об отсутствии какой-либо корреляции между эффектами агониста и антагониста D_1 -типа дофаминовых рецепторов на пассивное избегание и поведенческими изменениями, выявленными в тесте «открытое поле» у интактных самцов. Двухнедельное введение как агониста, так и антагониста D_1 -типа дофаминовых рецепторов интактным самцам не меняло динамику воспроизведения УРПИ, несмотря на то, что их применение вызывало однотипные изменения в параметрах горизонтальной двигательной активности (снижение) и разнонаправленные изменения грумингового компонента поведения, а также показателей

эмоционального статуса этих групп крыс в тесте «открытое поле». Можно предположить, что разнонаправленные эффекты SKF-38393 и SCH-23390 на груминговый и эмоциональный компоненты поведения у интактных самцов в тесте «открытое поле» могут быть связаны с действием лигандов D_1 -типа дофаминовых рецепторов на разные подсистемы дофаминергической нейромедиаторной системы: нигростриатную, мезолимбическую или тубероинфундибулярную [1, 7].

С другой стороны, хотя продолжительное введение SCH-23390 как одного, так и в комбинации с тестостероном пропионатом, и не приводило к статистически значимым изменениям в структуре поведения ГЭ самцов в тесте «открытое поле», однако было зарегистрировано полное восстановление процесса воспроизведения УРПИ. В то же время, введение SKF-38393 изолированно или в комбинации с тестостероном пропионатом односторонне повышало исследовательский и груминговый компоненты поведения, тем не менее, воспроизведения УРПИ у этих групп крыс не наблюдалось. Наряду с этим отдельно хотелось бы подчеркнуть, что в условиях комбинированного введения SKF-38393 и тестостерона пропионата у ГЭ крыс регистрируется только действие SKF-38393 на поведенческий статус и не проявляется эффект тестостерона пропионата в тесте «открытое поле». Подобная закономерность в эффектах комбинированного введения SKF-38393 с тестостерона пропионатом на поведение в тесте «открытое поле» отмечается и на модели УРПИ, что выражается в блокировании эффектов тестостерона пропионата. В целом, можно говорить о том, что поведенческие эффекты комбинированного или изолированного введения лигандов D_1 -типа дофаминовых рецепторов и тестостерона пропионата на воспроизведение УРПИ у ГЭ самцов не могут быть объяснены лишь изменениями поведенческих реакций, которые выявлены в тесте «открытое поле», хотя с некоторой долей вероятности и можно говорить о существовании некоторой взаимосвязи между данными тестов УРПИ и «открытого поля» у ГЭ крыс, получавших тестостерона пропионат.

Принято считать, что дофаминергическая система является триггерным звеном в механизмах формирования различных форм избегательного поведения животного [3, 7]. Наряду с этим, не вызывает сомнения, что между половыми гормонами и дофаминергической системой существует тесная взаимосвязь. В свою очередь, дофаминергическая система, как полагают, участвует в механизмах секреции гонадолиберина и гонадотропинов, что в конечном итоге, и определяет характер реализации негативного обратного действия андрогенов [5, 6]. Однако трудно сделать

какое-либо однозначное заключение о характере взаимодействий между андрогенами и дофаминергической системой головного мозга. Выявлены изменения в биосинтезе дофамина, высвобождении, обратном захвате и метаболизме у ГЭ самцов [6, 9]. Установлено, что гонадэктомия у самцов сопровождается выраженным снижением плотности дофаминовых рецепторов D_1 -типа без изменения их чувствительности, при этом терапия тестостероном пропионатом увеличивает или даже восстанавливает плотность дофаминовых рецепторов [5, 9]. Противоположно направленные эффекты SKF-38393 и SCH-23390 у ГЭ самцов могут быть связаны с измененным метаболизмом дофамина, с измененной экспрессией D_1 -типа дофаминовых рецепторов, экспрессией андрогеновых рецепторов, а также с изменением их связывающей способности в структурах головного мозга, имеющих непосредственное отношение к когнитивным функциям [1, 8]. Кроме того, нельзя исключать и то, что противоположно направленные эффекты SKF-38393 и SCH-23390 у ГЭ самцов, могут определяться активацией разного каскада молекулярно-биохимических процессов непосредственно в самой дофаминергической системе [1, 7]. Однако подобные предположения требуют дальнейших экспериментальных проверок с проведением многосторонних биохимических и нейрохимических исследований.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о существенной роли D_1 -дофаминовых рецепторов в условно-рефлекторной деятельности у самцов крыс в условиях дефицита андрогенов. Данное исследование доказывает вовлеченность D_1 -дофаминовых рецепторов в процессы обучения и памяти при дисбалансе андрогенов в организме. Результаты исследования указывают на необходимость дальнейшего изучения эффектов фармакологических веществ, действующих на D_1 -дофаминовые рецепторы, в качестве возможных средств коррекции нарушений высших функций мозга при дефиците андрогенов в организме.

References

1. Barishpolets V.V., Fedotova Iu.O., Sapronov N.S. Structural and functional organization of the cerebral dopaminergic system *Экспериментальная Клиническая Фармакология*. 2009; 72(3): 44-9. PMID: 19642593. (in Russian)
2. Gibbs R.B., Johnson D.A. Sex-specific effects of gonadectomy and hormone treatment on acquisition of a 12-arm radial maze task by Sprague Dawley rats. *Endocrinol.* 2008; 149(6): 3176-83.
3. Jay T.M. Dopamine: a potential substrate for synapse plasticity and memory mechanisms. *Progr. Neurobiol.* 2003; 69, 375-90.

4. Bhasin S., Basaria S. Diagnosis and treatment of hypogonadism in men. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 25(2): 251-70.
5. Pike C.J., Nguyen T.V., Ramsden M. Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions. *Horm. Behav.* 2008; 53(5): 693-705.
6. Simerly R.B., Chang C., Muramatsu M., Swanson L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 1990; 294(1): 76-95.
7. Beaulieu J.M. and Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2011; 63(1): 182-217.
8. Velasco M., Luchsinger A. Dopamine: Pharmacologic and therapeutic aspects. *Am. J. Ther.* 1998; 5(1): 37-43.
9. McPhaul M., Young M. Complexities of androgen action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001; 45(3): S87-S94.
10. Patchev V.K., Schroeder J., Goetz., Rohde W., Patchev A.V. Neurotropic action of androgens: principles, mechanisms and novel targets. *Exp. Gerontol.* 2004; 39(11-12): 1651-60.
11. Kirshenblat J.D. *Workshop on endocrinology. [Praktikum po endokrinologii].* M.: Higher school, 1969. (in Russian)
12. Bures J., Buresova O., Houston J.P. *Techniques and basic experiments for study of brain and behavior. [Metodiki i osnovnye eksperimenty po izycheniyu mozga i povedeniya]* Moscow: Higher school; 1991. (in Russian)
13. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharm.* 2003; 463(1): 3-33.
14. Spritzer M.D., Daviau E.D., Concey M.K., Engelman S.M., Prince W.T., Rodriguez-Wisdom K.N. Effects of testosterone on spatial learning and memory in adult male rats. *Horm. Behav.* 2011. 59(4): 484-496.
15. Sapronov N.S., Fedotova Yu.O. *Hormones of the hypothalamic-pituitary-ovarian system and the brain. [Gormony gipotalamo-gipofizarno-ovarialnoi sistemy i mozg]* St. Petersburg: Formistin; 2009. (in Russian)

Сведения об авторах:

Федотова Юлия Олеговна, докт. биол. наук, вед. науч. сотр., доцент, e-mail: julia.fedotova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 612.763.084.

Зимушкина Н.А., Косарева П.В.

Динамика поведенческих реакций нелинейных белых крыс при воздействии регулярной дозированной физической нагрузки

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

Цель исследования — изучение динамики поведенческих реакций нелинейных белых крыс разного возраста при воздействии регулярной дозированной физической нагрузки. **Методика.** Исследования выполнены на 80 интактных белых крысах (самцах и самках) 2 возрастных категорий: молодых (4—5 мес.) и старых (24—26 мес.). Поведение животных изучали в тестах «Крестообразный лабиринт», «Открытое поле» и «Тест распознавания новых объектов» до и после воздействия регулярной дозированной физической нагрузки. **Результаты.** В стратегии поведения молодых и старых животных опытных групп установлены сходные закономерности: физические упражнения оказывали положительное влияние на ориентировочно-исследовательскую активность в большей степени у самок (поведение в «Крестообразном лабиринте» и «Открытом поле» — пространственная память). Самцы под влиянием физической нагрузки по окончании эксперимента на фоне низкого уровня тревожности и мотивации, демонстрировали угасание ориентировочно — исследовательского поведения и снижение адаптации к новым условиям среды. В то же время, возможно, повышение активности правого полушария под влиянием физических упражнений у самцов приводило к улучшению у них непространственной памяти (ТРНО). **Заключение.** Выявленные особенности обусловлены биологическими различиями в системах, адаптирующих организм к физической нагрузке, и функциональной асимметрией межполушарных отношений.

Ключевые слова: самцы и самки нелинейных крыс, дозированная физическая нагрузка, поведенческие реакции, когнитивные функции.

Для цитирования: Зимушкина Н.А., Косарева П.В. Динамика поведенческих реакций нелинейных белых крыс при воздействии регулярной дозированной физической нагрузки. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 21—26.

Для корреспонденции: Зимушкина Нина Александровна, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной, топографической и клинической анатомии и оперативной хирургии ГБОУ ВПО ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России, e-mail: zimushkina59@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 02.06.2015

Zimushkina N.A., Kosareva P.V.

Dynamics of behavioral reactions of nonlinear white rats exposed to regular dosed physical activity

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 study the dynamics of behavioral nonlinear white rats of different ages under the influence of a regular dosage of exercise. **Methods.** The study was performed on 80 intact animals (nonlinear white rats, male and female) of two age groups: young (4—5 months) and old (24—26 months), control and experience. The behavior of animals was studied in the tests «Cross-formed labyrinth», «Open field» and «Test of new object's recognition» before and after exposure of a regular dosed physical activity. **Results.** Established similar patterns of behavior of young and old animals from the experimental groups: regular physical activity had a positive effect on exploratory activity in females to a greater extent (behavior in the «Cross-formed labyrinth» and «open field» — spatial memory). Contrawise, males demonstrated decrease of orienting — research behavior and decreasing of adaptation to new experimental conditions against the background of low levels of anxiety and motivation. At the same time, the increase of the right hemisphere activity by physical exercise resulted in males to improve their non-spatial memory. **Conclusion.** The detected features are due to biological differences in the systems, adapting the body to physical activity and functional asymmetry in the hemispheric relations.

Keywords: nonlinear rats (male and female), regular dosage of exercise, behavioral reactions, cognitive functions.

For citation: Zimushkina N.A., Kosareva P.V. Dynamics of behavioral reactions of nonlinear white rats exposed to regular dosed physical activity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(1): 21–26. (in Russ.).

For correspondence: Nina A. Zimushkina, Candidate of Medical Sciences, associate Professor of the Department of normal, topographic and clinical anatomy and operative surgery 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: zimushkina59@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the editorial office of Journal.

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

Received 02.06.2015

Введение

Физическая активность в настоящее время рассматривается не только как фактор профилактики нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, но также и как метод превентивной терапии [1]. Недавние исследования в области неврологии продемонстрировали воздействие физических упражнений на функции мозга в моделях на животных с неврологическими расстройствами и подчеркнули их положительную роль в отношении нейропластичности и самовосстановления мозга [2–4]. Физическая нагрузка улучшает когнитивные функции, связанные с обучением и памятью, стимулирует рост нейронов, в частности, в гиппокампе и префронтальной коре [5, 6]. Тем не менее, влияние регулярных физических упражнений на функции мозга на протяжении жизни изучены недостаточно [7].

Цель исследования — изучение динамики поведенческих реакций нелинейных белых крыс разного возраста при воздействии регулярной дозированной физической нагрузки.

Методика

Исследования выполнены на 80 интактных животных (неинбредных белых крысах). Животные разделены на 4 группы по 20 особей в каждой (10 самцов и 10 самок): молодые (4–5 мес.) — контроль и опыт, и старые (24–26 мес.) — контроль и опыт. Для дозированной физической нагрузки (ДФН) продолжительностью 17 сут., 20 мин/занятие [8] использовали аппаратно-программный комплекс «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», 124498, Москва, Зеленоград, 2013).

Поведенческую активность крыс оценивали до начала и по окончании эксперимента в тестах «крестообразный лабиринт» (КЛ), «открытое поле» (ОП) и «тест распознавания новых объектов» (ТРНО). Эксперимент проводили в дневное время суток при естественном освещении в изолированном лабораторном помещении

с использованием «белого шума» интенсивностью около 70 дБ [8]. *Крестообразный лабиринт*, состоящий из четырех закрытых рукавов (пронумерованных 1, 2, 3, 4), соединенных центральной камерой [8]; параметры: размер центрального и боковых отсеков — 25 x 25 см, высота стенки — 25 см, размер отверстий между отсеками — 10 x 10 см [9]. Животное помещали в центральный отсек лабиринта и регистрировали последовательность его переходов из одного рукава в другой; тест считали законченным, когда животное осуществляло 12 переходов в рукавах лабиринта [8]. За цикл патрулирования принимали время, потраченное животным на посещение всех 4 отсеков лабиринта хотя бы 1 раз [8]. *Установка «Открытое поле»*: круглая арена диаметром 97 см, высота стенок 42 см, диаметр отверстий в полу — 2 см.; пол арены разделен радиальными линиями на 6 секторов одинаковой площади и круговыми линиями на 3 концентрических ряда участков (всего 19 — 6 секторов по 3 участка и участок в центре) для визуальной регистрации двигательной активности. Время нахождения животного в ОП — 3 мин. Регистрируя горизонтальную двигательную активность, за единицу перемещения принимали пересечение сектора ОП; вертикальную двигательную активность оценивали по двум видам стоек: периферическим и центральным; регистрировали также короткий груминг, акт дефекации и длительность латентного периода — времени, предшествующего патрулированию [10]. Для оценки *исследовательского поведения в ТРНО* также использовали ОП в модификации для крыс. В начале эксперимента в ОП помещали предмет (пластмассовый кубик зеленого цвета), который оставался в нем в течение 3 мин тестирования (1-й сеанс), затем объект удаляли, и через 10 мин в открытое поле вносили другой объект, отличный от первого по цвету (пластмассовый кубик синего цвета) — 2-й сеанс (продолжительностью также 3 мин). Учитывая, что эксперимент проводили в условиях ОП, сравнивали число приближений к объекту, его обнюхиваний при 1-м и 2-м сеансах [8]. Эксперименты по ис-

следованию поведенческой активности проведены в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств Минздрава и социального развития РФ [8] и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Biotat. С целью характеристики экспериментальных групп по приведенным в статье показателям вычисляли выборочное среднее и стандартную ошибку среднего. Сравнение между собой двух выборок проводили при помощи критерия Манна—Уитни. Для оценки различий до и после воздействия ДФН использовали критерий Уилкоксона. Уровень значимости при проверке статистических гипотез в экспериментальных и клинических исследованиях принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Поведение в крестообразном лабиринте. Через семнадцатисуточный период ежедневной ДФН наблюдали у молодых самок крыс статистически значимо меньшее время 1-го и 2-го циклов патрулирования и снижение общего времени, проведенного в лабиринте, по сравнению с результатами контрольной группы (табл. 1). У самцов к концу эксперимента отмечалось увеличение всех показателей по сравнению с самками и началом эксперимента (табл. 1).

В стратегии поведения старых животных установлены сходные закономерности: у самок опытной группы выявлена тенденция к укорочению продолжительности циклов патрулирования и статистически значимое уменьшение общего времени, проведенного в лабиринте при

сравнении результатом группы контроля и начала эксперимента. У самцов после ДФН отмечалось статистически значимое удлинение циклов патрулирования и общего времени пребывания в лабиринте, при этом эффективность исследовательского поведения, оцениваемая по количеству циклов патрулирования, у самцов была статистически значимо ниже при сравнении с результатами контрольной группы и самками (табл. 2).

Поведение в ОП. При сравнении параметров теста у молодых животных контрольной группы до начала и по окончании эксперимента статистически значимых различий не выявлено (табл. 3). В обеих группах пределы варьирования показателей были схожи, исключая статистически значимое укорочение латентного периода начала движения у самцов.

В опытной группе в конце эксперимента между самцами и самками выявлены статистически значимые различия по показателю «двигательная активность»: при тенденции к увеличению этого параметра у самок отмечалось его статистически значимое снижение у самцов — при сравнении не только с самками, но и с результатами группы контроля (табл. 3).

У старых самцов опытной группы по окончании эксперимента отмечали статистически значимое угнетение ориентировочно — исследовательского поведения. У самок статистически значимой динамики ни по одному из анализируемых показателей не получено, исключая удлинение латентного периода, хотя при сравнении с самцами самки проявляли все же более высокую исследовательскую активность (табл. 3). Таким образом, результаты теста «Открытое поле» у молодых животных соответствовали результатам теста «Крестообразный лабиринт». Что касается груминга и дефекаций, выявлено следующее. У молодых самок опытной группы по окончании эк-

Таблица 1

Результаты изучения стратегии поведения молодых животных в исследовательском крестообразном лабиринте

Поведенческие акты	Молодые животные			
	Опыт		Контроль	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Латентный период, с	3,9 ± 0,9 5,3 ± 0,5	3,2 ± 0,7 4,8 ± 0,9	3,4 ± 0,9 3,6 ± 0,7	2,9 ± 0,5 5,0 ± 0,7 [#]
1-й цикл патрулирования, с	94,7 ± 16,2 98,6 ± 18,6*	156,6 ± 15,2 ^S 261,6 ± 25,9 ^{S#}	104,2 ± 19,3 197,0 ± 31,9 [#]	170,8 ± 23,2 202,2 ± 29,8
2-й цикл патрулирования, с	201,2 ± 33,1 188,6 ± 32,4*	245,4 ± 24,8 420,5 ± 46,6 ^{S#}	192,2 ± 25,8 373,8 ± 53,6 [#]	221,9 ± 37,9 348,0 ± 58,7
Общее время, с	239,0 ± 29,7 258,1 ± 28,6*	306,8 ± 40,2 706,4 ± 52,7 ^{S##}	219,6 ± 17,7 456,8 ± 84,7 [#]	282,8 ± 28,6 543,4 ± 81,8 [#]
Количество циклов патрулирования (полных заходов)	2,0 ± 0,3 2,2 ± 0,2	2,0 ± 0,37 2,2 ± 0,37	2,2 ± 0,2 1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,25 2,0 ± 0,32

Примечание. Здесь и в табл. 2—4 в каждой ячейке таблицы над чертой приведены результаты, полученные до начала эксперимента, под чертой — по окончании эксперимента; * — отличия статистически значимы при сравнении результатов опытной и контрольной групп (критерий Манна—Уитни); ^S — самок и самцов (критерий Манна—Уитни); [#] — в начале и конце эксперимента (критерий Уилкоксона).

сперимента количество актов груминга статистически значимо уменьшилось по сравнению с контролем; тенденцию к снижению этого показателя к концу эксперимента мы также наблюдали и у других опытных животных: у молодых и старых самцов, старых самок. В то же время, у старых самцов контрольной группы по окончании эксперимента статистически значимо уменьшилось количество актов груминга по сравнению с самками. Акты дефекации возможно было оценить только у старых животных. По окончании эксперимента их количество уменьшалось у старых самцов и самок опытной группы. Полученные данные свидетельствуют об уменьшении тревожности в опытных группах к концу эксперимента — как у молодых, так и у старых животных.

Поведение в ТРНО. Значимых различий в тесте распознавания новых объектов в начале и в конце эк-

сперимента у молодых животных контрольной группы не получено (табл. 4).

У молодых самцов после ДФН отмечалось статистически значимо меньшее количество обнюхиваний в сравнении с самками и началом опыта (табл. 4). Среди старых животных опытной группы самки к концу эксперимента чаще обнюхивали новый предмет, как при 1-м, так и 2-м сеансах; самцы же, напротив, реже приближались к новому объекту и обнюхивали его по сравнению с самками и началом эксперимента (табл. 4). Следовательно, у старых животных наблюдались те же закономерности, что и при тестировании молодых животных. Результаты ТРНО могут свидетельствовать о том, что под влиянием физической нагрузки по окончании эксперимента на фоне низкого уровня тревожности у самцов происходило снижение исследовательской

Таблица 2

Результаты изучения стратегии поведения старых животных в исследовательском крестообразном лабиринте

Поведенческие акты	Старые животные			
	Опыт		Контроль	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Латентный период, с	26,6 ± 4,8 21,8 ± 5,1	28,4 ± 4,5 26,1 ± 4,3	29,0 ± 1,7 23,2 ± 2,5	26,6 ± 4,6 27,0 ± 2,3
1-й цикл патрулирования, с	298,4 ± 23,6 275,8 ± 42,8	182,9 ± 18,1 [§] 314,3 ± 25,3 [#]	319,4 ± 41,9 333,4 ± 41,7	205,0 ± 37,6 250,5 ± 34,5
2-й цикл патрулирования, с	487,2 ± 56,3 391,0 ± 55,2	386,1 ± 46,4 540,8 ± 33,2 ^{§**}	504,5 ± 39,8 606,6 ± 94,1	406,3 ± 67,9 428,0 ± 40,8
Общее время, с	900,5 ± 143,8 556,0 ± 76,4 ^{**}	778,1 ± 51,1 1006,0 ± 141,0 [§]	809,4 ± 62,7 1115,0 ± 116,8 [#]	816,8 ± 72,1 817,2 ± 87,0
Количество циклов патрулирования (полных заходов)	1,7 ± 0,5 2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,73 0,4 ± 0,4 ^{*§}	1,8 ± 0,2 2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,51 1,8 ± 0,49

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.

Таблица 3

Результаты изучения стратегии поведения неинбредных белых крыс в тесте «Открытое поле»

Поведенческие акты	Молодые животные				Старые животные			
	Опыт		Контроль		Опыт		Контроль	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Начало движения, с	6,0 ± 1,3 8,4 ± 1,1	5,8 ± 1,1 2,8 ± 1,1 [§]	5,7 ± 0,9 5,9 ± 1,6	6,1 ± 2,2 2,9 ± 1,1 [#]	3,3 ± 1,1 4,8 ± 0,3 [*]	4,2 ± 0,7 3,4 ± 0,6	3,2 ± 0,6 3,4 ± 0,5	4,1 ± 1,8 5,0 ± 1,4
Локомоции, n	30,4 ± 5,4 42,0 ± 3,2	27,0 ± 4,8 12,8 ± 3,4 ^{§*}	29,0 ± 2,4 31,0 ± 4,8	25,8 ± 5,1 29,0 ± 5,2	15,6 ± 2,7 18,2 ± 4,4	15,8 ± 3,3 16,2 ± 0,8 [*]	17,2 ± 2,4 16,2 ± 2,6	17,0 ± 3,2 9,8 ± 2,4
Стойки, n	7,2 ± 0,9 11,2 ± 1,6 [#]	6,8 ± 1,1 5,8 ± 0,9 [§]	7,2 ± 1,2 8,4 ± 1,8	6,6 ± 1,2 6,6 ± 1,7	6,3 ± 1,5 5,6 ± 1,2	4,9 ± 1,4 1,4 ± 0,5 ^{§**#}	6,1 ± 1,2 5,8 ± 0,7	5,1 ± 1,3 5,0 ± 0,7
Норка, n	2,8 ± 0,7 3,8 ± 0,7	2,4 ± 0,4 1,0 ± 0,5 ^{§#}	2,6 ± 0,6 2,0 ± 0,9	2,1 ± 0,7 2,4 ± 0,9	2,2 ± 0,8 1,6 ± 0,4	2,0 ± 0,3 0	2,4 ± 1,1 1,0 ± 0,6	2,2 ± 0,2 0,6 ± 0,6 [#]
Груминг, n	1,2 ± 0,6 0,4 ± 0,2 [*]	1,2 ± 0,6 0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,4 2,0 ± 0,6	0,6 ± 0,4 1,8 ± 0,9	1,6 ± 0,8 1,4 ± 0,6	1,8 ± 0,2 1,0 ± 0,6	2,0 ± 0,5 2,2 ± 0,5	1,6 ± 0,4 0,8 ± 0,4 [§]
Дефекации, n	—	—	—	—	2,2 ± 0,7 1,4 ± 0,6	1,0 ± 0,3 0	0,6 ± 0,4 1,6 ± 0,7	1,8 ± 0,4 [§] 1,0 ± 0,5

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1

мотивации, что согласуется с результатами, полученными в тесте «открытого поля». Но, с другой стороны, возможно, физическая нагрузка приводила к оптимизации когнитивных функций у самцов, что отражалось в уменьшении количества приближений к новому объекту, поскольку старый объект (предъявленный при 1-м сеансе) животные помнили лучше, чем до эксперимента. У старых самок во 2-м сеансе, напротив, в конце эксперимента, отмечено увеличение числа подходов к новому объекту по сравнению с началом эксперимента. Вероятно, выявленный феномен является следствием оптимизации ориентировочно-исследовательской деятельности под влиянием физической нагрузки.

У контрольных крыс число подходов к новому объекту не превышало числа подходов к ранее предъявленному, что противоречит представлениям о том, что интактные животные больше времени проводят у нового объекта (в модификации теста с предъявлением 2 объектов), коэффициент дискриминации старого и нового объектов у них увеличивается [11]. Выявленный факт, по-видимому, обусловлен привыканием животных. Известно, что привыкание как специфический процесс наблюдается по отношению к любому виду раздражителей, и повторяющиеся предъявления раздражителя приводят к снижению исходной реакции. Установлено, что при повторных высадках интактных животных в ОП с новым объектом 2-я и 3-я высадка сопровождается прогрессирующим снижением числа подходов к новому предмету и его обнюхиваний [12].

В клинических исследованиях по психологии установлено, что у испытуемых в условиях повторяющегося предъявления узнаваемого объекта, отмечалось общее повышение вероятности узнавания стимула [13].

Таким образом, установлено, что физические упражнения оказывали положительное влияние на исследовательскую активность в большей степени у самок. Возможно, противоположные тенденции в реагировании самцов и самок крыс на ДФН, можно объяснять биологическими различиями в системах, адаптирующих организм к этой нагрузке [14]. Если

рассматривать физическую активность как вид стрессорной реакции, то мужские и женские стереотипы адаптации различаются, что связано с различным действием половых гормонов, особенностями в деятельности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadrenalовой системы. Согласно данным литературы, самки крыс более активны, чем самцы — это касается как двигательной, так и исследовательской активности [15]. Особи женского пола более устойчивы к различным видам стресса вследствие более низкой экскреции адреналина; в то же время, мужская гендерная роль подразумевает меньшее эмоциональное реагирование на разнообразные опасные ситуации [16]. Активация симпатoadrenalовой системы при стрессе (даже позитивном), приводит, как правило, к повышению активности правого полушария, обеспечивающего целостное восприятие внешнего мира, и торможению работы нервных клеток в симметричном участке левого полушария, обрабатывающего информацию последовательно [17]. Следовательно, можно предположить, что в нашем эксперименте снижение активности левого полушария у самцов, на фоне низкого уровня тревожности, сопровождалось снижением адаптации к новым условиям среды и при низком уровне мотивации приводило к снижению ориентировочно — исследовательского поведения. В то же время, возможно, повышение активности правого полушария у самцов приводило к улучшению непространственной памяти (ТРНО). У самок же при высоком уровне «базовой тревожности» и соответственно высоком уровне мотивации происходила оптимизация двигательной и ориентировочно-исследовательской активности. Восприятие непространственной памяти при этом не изменилось.

Список литературы

1. Herman T, Giladi N, Hausdorff JM. Treadmill training for the treatment of gait disturbances in people with Parkinson's disease: a mini-review. *Journal of Neural Transmission*. 2009; 116: 307-318.
2. Pothakos K, Kurz M, Lau YS. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse

Таблица 4

Результаты изучения стратегии поведения неинбредных белых крыс в тесте распознавания новых объектов

Число приближений к объекту и его обнюхиваний	Молодые животные				Старые животные			
	Опыт		Контроль		Опыт		Контроль	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
1-й сеанс, n	3,9 ± 0,1 2,9 ± 0,6	2,9 ± 0,3 ^S 1,3 ± 0,2 ^{S#}	4,0 ± 0,5 3,6 ± 1,0	3,1 ± 0,5 2,8 ± 1,5	3,2 ± 0,3 4,3 ± 0,61	2,3 ± 0,5 2,1 ± 0,3 ^S	3,4 ± 1,4 4,0 ± 1,1	2,2 ± 0,9 2,8 ± 0,9
2-й сеанс, n	2,9 ± 0,2 [@] 3,2 ± 0,5	2,2 ± 0,2 ^S 1,0 ± 0,2 ^{S#}	3,1 ± 0,3 1,6 ± 1,0	2,2 ± 0,6 1,2 ± 0,6	2,0 ± 0,5 [@] 3,4 ± 0,4 [#]	2,3 ± 0,5 1,6 ± 0,3 ^S	2,1 ± 0,5 3,4 ± 1,1	1,9 ± 0,9 2,8 ± 0,7

Примечание. @ — статистическая значимость при сравнении 1-го и 2-го сеансов (критерий Уилкоксона). Остальные обозначения те же, что и в табл. 1.

model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neuroscience*. 2009; 10(6):1-46.

3. Hopkins ME, Buccì DJ. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2010; 94(2):278-84.

4. da Cruz J.N., de Lima D.D., Dal Magro D.D., Pereira da Cruz J.G. The effects of swimming exercise on recognition memory for objects and conditioned fear in rats. *Acta Scientiarum. Health Sciences. Maringa*. 2012; 34 (3): 163-169.

5. Hillman C.H., Erickson K.I., Kramer A.F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Neuroscience: Nature Reviews*. 2008:59-65.

6. Marosi K. The effects of regular physical activity on brain ageing in animal models. Ph.D. Thesis. Budapest 2012; 10 pp.

7. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012; 944.

8. Салимов Р.М., Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Майский А.И., Полетаева И.И. Быстрая толерантность к этанолу и добровольное потребление больших доз алкоголя у мышей, селектированных по весу мозга. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2003; 53(1):100-106.

9. Gould T.D. (ed.). *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*, *Neuromethods* 42, DOI 10.1007/978-1-60761-303-9_1, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC 2009.

10. Горелов П.И., Островская Р.У., Сазонова Н.М. Оценка прокогнитивного эффекта дилепта и его основного метаболита, ГЗР-125, в тесте распознавания объектов у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2013; 76(7): 3-5

11. Стасюк О.Н., Авсеенко Н.Д., Альфонсова Е.В. Оценка фармакологической активности ноотропов по показателям поведенческой реакции у крыс. *Фундаментальные исследования*. 2015; 1-2: 384-387

12. Четвериков А.А., Одайник А.С. Модели субъективной оценки эффективности решения когнитивных задач: Часть 2. Теории косвенной оценки. *Вестник СПбГУ. Серия 12. Психология. Педагогика*. 2014; 1: 117-125.

13. Жуков Д.А. *Биология поведения. Гуморальные механизмы*. Санкт-Петербург: Речь; 2007. 442.

14. Lightfoot J.T. Sex Hormones' Regulation of Rodent Physical Activity: A Review. *Int J Biol Sci*. 2008; 4(3): 126-132.

15. Коган Б.М., Дроздов А.З., Дмитриева Т.Б. Механизмы развития соматических и психопатологических стрессовых расстройств (половые и гендерные аспекты). *Системная психология и социология*. 2010; 1(1): http://www.systempsychology.ru/journal/n_1_2010/14-kogan-bm.

16. Фокин В.Ф. Динамическая функциональная асимметрия как отражение функциональных состояний. *Асимметрия*. 2012; 6(1): 4-9.

References

1. Herman T, Giladi N, Hausdorff JM. Treadmill training for the treatment of gait disturbances in people with

Parkinson's disease: a mini-review. *Journal of Neural Transmission*. 2009; 116: 307-18.

2. Pothakos K, Kurz M, Lau YS. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neuroscience*. 2009; 10(6): 1-46.

3. Hopkins ME, Buccì DJ. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2010; 94(2):278-84.

4. da Cruz J.N., de Lima D.D., Dal Magro D.D., Pereira da Cruz J.G. The effects of swimming exercise on recognition memory for objects and conditioned fear in rats. *Acta Scientiarum. Health Sciences. Maringa*. 2012; 34 (3): 163-9.

5. Hillman C.H., Erickson K.I., Kramer A.F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Neuroscience: Nature Reviews*. 2008: 59-65.

6. Paltsyn A.A. Exercise and age-related cognitive decline. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya Terapiya*. 2016;60(2): 87-93. (in Russian)

7. Marosi K. *The effects of regular physical activity on brain ageing in animal models*. Ph.D. Thesis. Budapest 2012; 10 pp.

8. Mironov A.N. *Guidelines for preclinical studies of drugs. Part 1. [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I]*. М.: Гриф К, 2012; 944. (In Russian)

9. Salimov R.M., Markina N.V., Perepelkina O.V., Mayskiy A.I., Poletaeva I.I. Fast tolerance to ethanol and voluntary alcohol intake of large doses in mice brain -selected weight. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti*. 2003; 53(1):100-6. (In Russian)

10. Gould T.D. (ed.). *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*, *Neuromethods* 42, DOI 10.1007/978-1-60761-303-9_1, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC 2009.

11. Gorelov P.I., Ostrovskaya R.U., Sazonova N.M. Evaluation of procoognitive dilept effect and its main metabolite, GZR -125, in the object recognition test in rats. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2013; 76(7): 3-5. (In Russian)

12. Stasyuk O.N., Avseenko N.D., Al'fonsova E.V. Evaluation of pharmacological activity nootropics Ratios behavioral response in rats. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2015; 1-2: 384-7. (In Russian)

13. Chetverikov A.A., Odainyk A. S. The models of subjective evaluation of performance in cognitive tasks: Part 2. The theory of indirect estimation. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo Universiteta. Seriya 12. Psikhologiya. Pedagogika*. 2014; 1: 117-25. (In Russian)

14. Zhukov D.A. *Biologia of behavior. Humoral mechanisms. [Biologiya povedeniya. Gumoral'nye mekhanizmy]*. Saint-Petersburg: Rech'; 2007. 442. (In Russian)

15. Lightfoot J.T. Sex Hormones' Regulation of Rodent Physical Activity: A Review. *Int J Biol Sci*. 2008; 4(3): 126-32.

16. Kogan B.M., Drozdov A.Z., Dmitrieva T.B. Mechanisms of somatic and psychopathological stress disorder (sex and gender). *Sistemnaya psikhologiya i sotsiologiya*. 2010; 1(1): http://www.systempsychology.ru/journal/n_1_2010/14-kogan-bm. (In Russian)

17. Fokin V.F. Dynamic functional asymmetry as a reflection of the functional states. *Asimmetriya*. 2012; 6(1): 4-9. (In Russian)

Сведения об авторах:

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

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Титов В.Н.¹, Котловский М.Ю.², Якименко А.В.², Курдюк Е.В.², Якимович И.Ю.³,
Гришанова А.Ю.⁴, Аксютин Н.В.², Котловский Ю.В.², Дыгай А.М.⁵

Модель экзогенной гиперхолестеринемии у крыс и жирные кислоты плазмы крови; видовые особенности липопротеинов, статины и ω -3 полиеновые кислоты

¹ — ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, 121552, г. Москва, Россия, ул. 3-я Черепковская, д.15-а

² — ГБОУ ВПО «Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия

³ — ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск, Россия

⁴ — Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁵ — ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАН

Цель работы — оценка в динамике содержания индивидуальных жирных кислот (ЖК) в плазме крови и спирта холестерина (ХС) в тканях крыс при моделировании экзогенной гиперхолестеринемии и становлении синдрома атеросклероза. Среди липопротеинов плазмы (ЛП) крови у крыс 60% составляют ЛП высокой плотности и по ~20% ЛП низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП). Скармливание крысам холестерина (ХС, 2,5 г/сут.) в течение 2 мес. значимо не увеличивало в плазме крови содержание спирта ХС, триглицеридов (спирта глицерина); несущественно возрастало и содержание ХС в ЛП; статистически значимо возрастало содержание ХС в ЛПОНП. Крысы слабо реагируют на увеличение в пище количества ХС, а при действии ПНЖК увеличивают секрецию гепатоцитами ЛПОНП, но не ЛПНП. Ни ХС, ни симвастатин статистически значимо не повышали содержание в плазме крови миристиновой насыщенной жирной кислоты (НЖК), содержание пальмитиновой НЖК увеличивалось незначительно; статистически значимо возрастало содержание ω -3 полиеновых ЖК (ПНЖК). Холестерин не изменял содержания олеиновой мононенасыщенной МЖК, но при приеме статинов оно статистически значимо увеличивалось при действии ПНЖК. Отношение пальмитат/олеат в контроле составляет 2,01 и оно уменьшается до 1,43 при действии ω -3 ПНЖК. Омега-3 ПНЖК в 2 раза увеличивали в плазме крови содержание Докоза. Содержание С20:3 ненасыщенной ЖК повышается при действии статинов, но значимо это только при действии ω -3 ПНЖК. Выраженные различия в филогенезе становления системы ЛП у кроликов и крыс — есть причина слабого влияния экзогенной гиперхолестеринемии и действия статинов у крыс, в отличие от кроликов. Плейотропное действие проявляют филогенетически ранние, гуморальные медиаторы эйкозаноиды. Действуя по единому алгоритму, гиполипидемические препараты, блокируя синтез печеночного ХС в ЛПОНП, нормализуют поглощение клетками ПНЖК в ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза. Поглощенные клетками ПНЖК и проявляют свойственное им биологическое, физиологичное, многостороннее, плейотропное действие *in vivo*.

Ключевые слова: крысы, жирные кислоты, статины, пальмитат, олеат, плейотропное действие.

Для цитирования: Титов В.Н., Котловский М.Ю., Якименко А.В., Курдюк Е.В., Якимович И.Ю., Гришанова А.Ю., Аксютин Н.В., Котловский Ю.В., Дыгай А.М. Модель экзогенной гиперхолестеринемии у крыс и жирные кислоты плазмы крови; видовые особенности липопротеинов, статины и ω -3 полиеновые кислоты. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(1): 27—36.

Для корреспонденции: Титов Владимир Николаевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. клинической биохимии липопротеинов Института клинической кардиологии ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, e-mail: vn_titov@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.02.2015

Titov V.N.¹, Kotlovsky M.Yu.², Yakimenko A.V.², Kurdoyak E.V.², Yakimovish I.Yu.³, Grishanova A.Yu.⁴, Aksutin N.V.², Kotlovsky Yu.V.², Dygai A.M.⁵

A rat model of exogenous hypercholesterolemia and blood plasma fatty acids; species specific features of lipoproteins, effects of statins and ω -3 polyenic fatty acids

¹ — Russian Cardiology Research-and-Production Center, Ministry of Health, Moscow

² — V.F. Voyno-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk

³ — Siberian State Medical University, Tomsk

⁴ — Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk

⁵ — Institute of Pharmacology, Tomsk

In rats, high density lipoproteins (HDL) account for 60%, low density lipoproteins (LDL) and very low density lipoproteins (VLDL) for about 20% each of total plasma lipoprotein content. There was no statistically significant increase in plasma cholesterol (CL) and triglyceride (TG) contents after feeding rats a cholesterol-enriched diet (daily dose 2.5 g) for 2 months, lipoprotein CL content increased insignificantly, while increase in VLDL CL content was statistically significant. Rats weakly responded to dietary CL, the addition of polyenic FA (PFA) increasing hepatocyte secretion of VLDL but not of LDL. Neither CL nor simvastin produced any significant increase in plasma content of miristic saturated fatty acid (SFA), the content of palmitic SFA increased insignificantly, while their contents increased significantly under the effect of ω -3 PFA. CL produced no change in the content of oleic monounsaturated FA (MFA) which increased significantly under statins and PFA. The palmitate/oleate ratio was 2.01 in the control and under the effect of ω -3 PFA it decreased to 1.43. ω -3 PFA produced a 2-fold increase in plasma content of Docose. Statins increased plasma content of C20:3 unsaturated FA, the increase being statistically significant only under the effect of ω -3 PFA. Compared with rabbits, weak effects of exogenous hypercholesterolemia and statins in rats result from pronounced phylogenetic differences in the formation of lipoprotein system in these animals. Pleiotropic effects are produced by eicosanoids, phylogenetically early humoral mediators. According to a universal algorithm, hypolipidemic drugs block the synthesis of polar CL in VLDL and normalize cellular uptake of PFA via apoB-100 endocytosis. These PFA exert pleiotropic biological and physiological effects in vivo.

Keywords: rats, fatty acids, statins, palmitate, oleate, pleiotropic effects.

For citation: Titov V.N., Kotlovsky M.Yu., Yakimenko A.V., Kurdoyak E.V., Yakimovish I.Yu., Grishanova A.Yu., Aksutin N.V., Kotlovsky Yu.V., Dygai A.M. A rat model of exogenous hypercholesterolemia and blood plasma fatty acids. species specific features of lipoproteins, effects of statins and ω -3 polyenic fatty acids. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (1): 27–36. (in Russ.).

For correspondence: Vladimir N. Titov — MD, Professor, Head of Clinical Biochemistry Laboratory of the Institute of Clinical Cardiology lipoprotein FGBU Russian Cardiology Research and Production Complex of Ministry of Health of the Russian Federation, 121552, Moscow, 3rd Cherepkovskaya; email: vn_titov@mail.ru

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

Acknowledgments. The study did not have sponsorship.

Received 15.02.2015

Введение

Атеросклероз как нозологическую форму заболевания характеризуют почти иносказательно; определение не отражает патогенез столь распространенной в популяции Homo sapiens «метаболической пандемии». «Атеросклероз — хроническое заболевание артерий эластического и мышечно-эластического типа, которое возникает вследствие нарушения липидного и белкового обмена и сопровождается отложением холестерина и некоторых фракций липопротеидов в интиму сосудов (?); отложения формируются в форме атероматозных бляшек ...» [1]. Несмотря на то, что со времени предложения холестериновой теории атеросклероза прошло более 100 лет, в понима-

нии патогенеза заболевания существенных сдвигов не произошло.

Это определено тем, что мы пока не осознали, что атеросклероз — это, в первую очередь, патология жирных кислот (ЖК), эссенциальных полиеновых ЖК (ПНЖК) и, во вторую, насыщенных ЖК (НЖК), главным образом, пальмитиновой НЖК + транс-форм ненасыщенных ЖК (ННЖК). Мы нечетко представляем становление в филогенезе функции липопротеинов (ЛП), системы переноса в межклеточной среде и поглощения клетками ЖК. Мы до сих пор не поняли филогенетические отличия системы ЛП у видов экспериментальных животных, и механизмы действия гиполлипидемических препаратов и ПНЖК при моделирова-

нии атеросклероза и атероматоза на разных видах животных [2]. Подобные эксперименты желательны продолжить, при этом обсуждение полученных результатов провести на основе филогенетической теории общей патологии. Наиболее интересны эксперименты на крысах; желательны понять биологические основы невыраженного влияния экзогенной гиперхолестеринемии на формирование атеросклероза, атероматоза аорты и содержание в тканях ХС, по сравнению с кроликами [3].

Цель работы — оценка в динамике содержания индивидуальных ЖК в плазме крови и спирта ХС в тканях крыс при моделировании экзогенной гиперхолестеринемии и становлении синдрома атеросклероза.

Определение содержания в тканях ЖК и ХС:

- а) исходно, в группе контроля;
- б) на модели экзогенной гиперхолестеринемии;
- в) при действии гипополипидемического препарата симвастина;
- г) добавления в пищу эссенциальных ПНЖК.

Методика

Эксперименты проведены на самцах крыс Wistar в возрасте двух мес. и массой 200 г. В ходе эксперимента сформировано 5 групп по 20 животных. На протяжении 2 мес. крыс содержали в стандартных условиях вивария. Животные 1-й гр. получали сухой корм и составляли группу контроля. Крысам остальных 4-х групп в течение двух мес. в пищу добавляли одноатомный, вторичный, циклический, гидрофобный спирт холестерин (фирма Sigma, Германия) в дозе 2,5 г/сут. Крысы 2-й гр. получали только ХС, животные 3-й гр. получали симвастин (0,1 мг/сут.). Доза препаратов рассчитана на основе дозы, которую назначают пациентам с массой тела 80 кг. В 4-й гр. статины в той же дозе (0,1 мг/сут.) сочетали с ω -3 ПНЖК (3,6 мг/24 часа). В 5-й группе крысам добавляли в пищу лишь ω -3 ЖК в той же дозе. Через 2 мес. после 12-часового голодания, крыс декапитировали в условиях ингаляционного наркоза фторотаном.

Индивидуальные ЖК в сыворотке крови крыс определяли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. Метилвые эфиры ЖК, получали методом кислотного метанолиза. Для разделения индивидуальных ЖК использовали колонку HP-5MS: длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм (фирма Agilent Technologies, США). Идентификацию ЖК проводили путем сопоставления масс-спектрограмм анализируемых проб с хроматограммами, которые содержит электронная библиотека «NIST MS Search 2.0» и «AMDIS Analysis» на основании R_f (времени удерживания) стандартных образцов метилвых эфиров ЖК, фирма Supelco, Швейцария. При определении содержания общего ХС в плазме крови и тканях процедуру кислотного метилиро-

вания дополняли реакцией с N,O-бис(триметилсил)-трифтороацетамидом, фирма Sigma, Германия. Содержание рассчитывали при использовании компьютерной программы «MSD Chem Station D.02.00.275» методом «нормализации» пиков, относительно внутреннего стандартного образца и выражали в мкмоль/мл плазмы.

Насыщенные ЖК (НЖК) включали: ЖК с четным числом атомов углерода: С14:0 миристиновая, С16:0 пальмитиновая, С18:0 стеариновая, С20:0 арахидиновая, С22:0 бегеновая, С24:0 лигноцериновая, а также афизиологичные НЖК с нечетным числом атомов углерода в цепи — С15:0 пентадециловая НЖК, С17:0 маргаритиновая НЖК, С21:0 генэйкоциловая и С23:0 трикоциловая (С23:0) НЖК. Мононенасыщенные ЖК (МЖК) с одной двойной связью (ДС, $-C=C-$) это: ω -7 С16:1 пальмитолеиновая МЖК; ω -9 С16:1 гексадеценная, ω -9 С18:1 олеиновая НЖК, С20:1 гондоиновая, С 22:1 эруковая и С24:1 невроновая. Одновременно ненасыщенные ЖК (ННЖК) с 2-3 ДС включали: ω -6 С18:2 линолевая, ω -3 С18:3 α -линоленовая ННЖК, ω -9 С20:3 дигомо- γ -линоленовая и С20:2 гентаноидная. Среди ПНЖК с 4-6 ДС в цепи атомов углерода определены: ω -3 С20:5 эйкозапентаеновая (Эйкоза), ω -3 С22:6 докозагексаеновая (Докоза) и ω -6 С20:4 арахидоновая (Арахид) ПНЖК. В качестве интегрального теста, который характеризует изменение содержания (перераспределение) ЖК в полярных и неполярных липидах, использовали индекс ненасыщенности (ИН) как отношение (НН ЖК/НЖК) *100.

Статистический анализ проведен при использовании пакета прикладных программ SPSS 13.0 Windows с проверкой распределения по критериям Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилкобсона. Корреляционная зависимость рассчитана для всех ЖК во всех группах; данные группы сопоставляли друг с другом. Статистическую значимость различий для выборок определяли по t-критерию Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов приведены в табл. 1. Обращает на себя внимание, что, по содержанию ХС, в плазме крови крыс доминируют липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Они составляют $\approx 60\%$ ЛП; филогенетически же более поздние ЛП низкой плотности (ЛПНП) и еще более поздние ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) плазма крови содержит в 3 раза меньше, по $\approx 20\%$. Высокое содержание ЛПВП — характерное отличие ЛП плазмы крови крыс от ЛП кроликов, морских свинок, приматов и человека; у этих видов в плазме крови количественно доминируют апоВ-100 ЛПНП и ЛПОНП [4]. Содержание ТГ в плазме крови крыс физиологично в 2—3 раза ниже,

чем у человека. Данные табл. 1. показывают, что скормливание ХС животным 2-й группы в течение 2 мес. не привело к существенному увеличению в плазме крови содержания ХС и ТГ, не возросло и содержание ХС в классах ЛП. Присутствия в пище высокого содержания ХС крысы как бы «не заметили»; количественные тесты оценки липидов и ЛП остались теми же, что и у контрольных животных.

В ответ на действие статинов (3-я гр.) значимо возросло содержание ТГ; как по отношению к контролю, так и к показателям крыс 2-й гр. (ХС). Столь же значимо возросло и содержание полярного ХС в ЛПОНП. Одновременное повышение содержания ТГ и полярного ХС-ЛПОНП обоснованно трактуется как увеличение секреции ЛПОНП гепатоцитами. Добавление в пищу крысам, которые получавшим статины (4-я гр.) еще и ПНЖК не изменило ни одного из тестов гиперлипемии и содержания ХС в ЛП. Скармливание крысам ПНЖК одновременно с ХС вдвое увеличивало содержание в плазме крови ТГ и неэтерифицированного ХС

в ЛПОНП. По сравнению с симвастатином, действие ПНЖК (5-я гр.) было односторонне и более выражено; масса тела животных при этом не изменилась. Крысы как бы не реагируют на увеличение в пище ХС, а при действии статинов ПНЖК увеличивают секрецию гепатоцитами только ЛПОНП, но не ЛПНП. У крыс пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП не превращаются в ЛПНП, а линолевые и линоленовые ЛПОНП, которые становятся одноименными ЛПНП, в переносе и поглощении клетками ПНЖК не участвуют.

Не отмечено изменений содержания во всех группах крыс глюкозы, альбумина, общего белка, мочевины, креатинина, активности холинэстеразы, γ -глутамилтранспептидазы (ГТП) и желчных кислот (табл. 2). При действии ПНЖК умеренно снизилась активность щелочной фосфатазы, α -амилазы и содержание в плазме крови желчных кислот. Постоянная, низкая концентрация С-реактивного белка (СРБ) при определении высокочувствительным методом, во всех пяти группах крыс отражает отсутствие активации эндогенной биологиче-

Таблица 1

Тесты липемии и содержание холестерина в ЛП в контрольной и опытных группах животных (M ± m ммоль/л, n = 20)

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Триглицериды	0,72 ± 0,03	0,74 ± 0,03	1,12 ± 0,06*****	1,07 ± 0,07*****	1,45 ± 0,10*****oo aa
ЛПВП	1,13 ± 0,04	1,22 ± 0,06	1,16 ± 0,04	1,19 ± 0,04	1,15 ± 0,04
ЛПНП	0,4 ± 0,02	0,37 ± 0,023	0,38 ± 0,02	0,32 ± 0,01*** o	0,36 ± 0,02
ЛПОНП	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,01*	0,52 ± 0,03*** +++	0,49 ± 0,03*** +++	0,67 ± 0,05*****oaa
Масса тела	382,5 ± 8,8	413,2 ± 9,1	418,8 ± 8,1**	406,7 ± 11,3	411,5 ± 5,8*

Примечание. Здесь и в остальных таблицах: достоверность изменений между группами: * отличие от контрольной группы; + — отличие от группы 2; ° — отличие от группы 3; a — отличие от группы 4; *** — p<0,001, ** — p<0,01, * — p<0,05

Таблица 2

Биохимические показатели в контрольной и опытных группах животных (M ± m, n = 20)

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Глюкоза, ммоль/л	8,46 ± 0,24	6,65 ± 0,10***	8,23 ± 0,17+++	7,72 ± 0,17* +++ o	8,18 ± 0,17+++
Альбумин, г/л	35,85 ± 0,48	37,93 ± 0,41**	37,29 ± 0,53	36,45 ± 0,43+	35,55 ± 0,30+++ oo
Общий белок, г/л	60,37 ± 0,46	63,75 ± 0,52***	62,73 ± 0,42***	63,36 ± 0,65***	64,48 ± 0,61*** o
Альфа-амилаза, МЕ/л	2232,05 ± 86,679	2110,39 ± 69,18	2167,71 ± 43,99	2151,7 ± 91,471	2605,03 ± 64,03 *** +++ ooo aaa
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	151,82 ± 6,86	99,35 ± 2,63***	108,43 ± 3,87***	103,54 ± 4,37***	127,01 ± 5,87 ** +++ o aa
Мочевая кислота, мкмоль/л	76,32 ± 3,54	78,93	83,64 ± 5,17	80,45 ± 3,34	62,96 ± 1,57 ** +++ ooo aaa
Креатинин, мкмоль/л	35,22 ± 0,92	33,45	33,94 ± 0,39	32,85 ± 0,65*	32,01 ± 1,19*
Мочевина, ммоль/л	5,7 ± 0,14	4,99 ± 0,14***	5,33 ± 0,14	5,42 ± 0,14+	5,69 ± 0,10+++ o
Холинэстераза, МЕ/л	85,45 ± 6,20	81,72 ± 5,42	77,6 ± 5,89	69,39 ± 3,56*	90,41 ± 6,28aa
Желчные кислоты, мкмоль/л	2,48 ± 0,40	3,45 ± 0,56	1,32 ± 0,15* ++	1,32 ± 0,20* ++	1,56 ± 0,17* ++
ГТП	0,22 ± 0,014	0,2 ± 0,018	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01+ o	0,2 ± 0,01a
СРБ	0,81 ± 0,01	0,76 ± 0,00***	0,81 ± 0,01+++	0,79 ± 0,01++	0,81 ± 0,01+++

ской реакции воспаления [5], нарушение биологической функции эндоэкологии и «замусоривания» межклеточной среды эндогенными флогогенами.

Теоретический интерес представлял анализ количества и качественного состава афизиологичных, минорных ЖК с нечетным числом атомов углерода, как и очень длинноцепочечных НЖК и МЖК — С22 и С24. И если в природе (главным образом в растениях) происходит синтез более 800 индивидуальных ЖК, *in vivo* у млекопитающих активно в метаболических реакциях участвуют не более двух десятков НЖК+МЖК+ННЖК+ПНЖК. Ни скормливание крысам ХС, ни действие статинов не изменяли концентрацию в плазме крови С14:0 миристиновой НЖК; она, в первую очередь, является промежуточным продуктом при β -окислении длинноцепочечных ЖК и α - и ω -окисления ЖК, в том числе с нечетным числом атомов углерода. Статистически значимо возростала концентрация миристиновой НЖК только при действии ω -3 ПНЖК. Концентрация минорных ЖК — С20:0, С22:0 и С24:0 пристального внимания не требует. По сравнению с С16:0 пальмитиновой НЖК, ω -9 С18:1 олеиновой МЖК, концентрация их в плазме крови на 2 порядка ниже.

Ни ХС, ни симвастатин не повышали содержание в плазме крови пальмитиновой НЖК ($1,36 \pm 0,048$ мкмоль/л в контроле) и оно хотя и незначительно, но значимо возростало при действии только ω -3 ПНЖК. Содержание С18:0 стеариновой НЖК, которое наполовину ниже, чем пальмитиновой НЖК ($0,62 \pm 0,02$ мкмоль/л в контроле), во всех группах животных осталось постоянным. Более существенно увеличивалась сумма НЖК: миристиновая + пальмитиновая + стеариновая; большого же смысла в их суммировании нет.

Детальному рассмотрению подлежит ω -6 С18:1 экзогенная и эндогенная, из глюкозы ω -9 олеиновая МЖК. Всего две ЖК — С16:0 пальмитиновая НЖК

+ С18:1 олеиновая МЖК составляют *in vivo* более 80% всех ЖК. Скармливание крысам ХС не изменяло содержания олеиновой МЖК; при приеме статинов оно несколько возростало и статистически значимо увеличилось только при действии ПНЖК (табл. 3). Отношение олеат/пальмитат в контрольной группе крыс составляет 2,01 и оно значимо уменьшается до 1,43 при добавлении в пищу ω -3 ПНЖК. Следовательно, только ПНЖК формирует превалирование *in vivo* кинетически более быстрых реакций метаболизма олеиновой МЖК над тоже физиологичной, но кинетически более медленно окисляемой митохондриями пальмитиновой НЖК. Окисление в митохондриях олеиновой МЖК обеспечивает более высокую производительность оргanelл, эффективную наработку АТФ в единицу времени, чем при окислении в цикле Кребса, в дыхательной цепи, в реакциях окислительного фосфорилирования пальмитиновой НЖК.

Несмотря на большие возможности крыс в синтезе ЖК и для них ω -6 С18:2 линолевая ННЖК является, как и для всех животных, эссенциальной. Ввести в цепь атомов углерода вторую ДС могут только растения. Ни один из видов млекопитающих не в состоянии синтезировать линолевую ЖК. Однако при поглощении линолевой ННЖК кроликом или человеком, она так и остается ННЖК, этерифицированной, к примеру, в sn-2 фосфатидилохолина. И только крысы, поглотив ω -6 С18:2 линолевую ННЖК, могут из нее синтезировать С 18:3 γ -линоленовую ННЖК и ω -6 С20:4 Арахид ПНЖК, которую не синтезируют растения. Для крыс эссенциальной является только линолевая НЖК. Человеку же необходима ω -6 С20:4 Арахид, поступление которой происходит только с животной пищей. Линолевая ННЖК, концентрация которой в контрольной группе составляет $1,18 \pm 0,05$ мкмоль/мл и далее не изменяется при поедании ХС, при действии статинов существенно возростает только в 5-й группе под влиянием ПНЖК (табл. 3).

Таблица 3

Содержание физиологичных ЖК в плазме крови в контроле и опытных группах крыс (M \pm m, мкмоль/мл; n = 20)

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
С16:0	1,36 \pm 0,04	1,40 \pm 0,05	1,45 \pm 0,04	1,46 \pm 0,05	1,74 \pm 0,10****oa
С18:1(9)	12,23 \pm 0,24	12,07 \pm 0,35	13,59 \pm 0,28****+	12,88 \pm 0,39	14,50 \pm 0,40 ****+aa
С18:0	0,61 \pm 0,01	0,58 \pm 0,02	0,50 \pm 0,01****+	0,49 \pm 0,01****+	0,60 \pm 0,02ooaa
С18:2	1,17 \pm 0,04	1,21 \pm 0,05	1,48 \pm 0,05****+	1,37 \pm 0,05*	1,98 \pm 0,09 ****+ooooaa
С18:3	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,001	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00****+o	0,03 \pm 0,02 ****+ooooaa
С20:4	1,01 \pm 0,03	1,03 \pm 0,05	0,90 \pm 0,02**+	0,95 \pm 0,02	1,06 \pm 0,04ooa
С20:5	0,04 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00****+	0,04 \pm 0,00oo	0,05 \pm 0,00 ****+ooo
С22:6	0,07 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01	0,073 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00+o	0,15 \pm 0,01 ****+aooo

Содержание в плазме крови крыс контрольной группы ω-6 С18:3 линоленовой ННЖК — (0,019 ± 0,001 мкмоль/мл) на порядок ниже, чем содержание линолевой ННЖК. На низкую концентрацию ее в плазме крови не влияет ни увеличение потребления с пищей ХС, ни действие статинов. Статистически значимое увеличение содержания ее происходит только при действии ω-3 ПНЖК — 0,035 ± 0,002 мкмоль/мл. Логичным продолжением у крыс синтеза из С18:2 → С18:3 является образование → ω-6 С20:4 Арахид ПНЖК. Содержание ее во всех группах не изменялось даже в пределах 10-20%; реакции на скормливание ХС, статинов и даже ω-3 ПНЖК не отмечено. При изменении параметров хроматографии содержание С18:3 ННЖК можно разделить на ω-3 С18:3 α-линоленовую ННЖК и ω-6 γ-линоленовую ННЖК. У крыс правомерно рассматривать сумму ω-6 линоленовая + γ-линоленовая ННЖК + Арахид ПНЖК, а у кроликов и человека нет. Линоленовая: γ-линоленовая : α-линоленовая: Арахид ЖК соотносятся как 54:1:45.

В контрольной группе крыс содержание ω-3 Эйкоза и Докоза составляет соответственно 0,040 ± 0,012 и 0,075 ± 0,004 мкмоль/мл, при отношении 37:63. При кормлении ХС и действии статинов содержание Эйкоза незначительно снижалось, но статистически значимо повышалось при действии ω-3 ПНЖК — 0,055 ± 0,003. Концентрация Докоза у контрольной группы крыс составляет 0,075 ± 0,004 и на нее не оказывают влияния ни кормление ХС, ни действие статинов. Добавление же в пищу ω-3 ПНЖК в 2 раза увеличивало в плазме крови содержание Докоза — 0,115 ± 0,011 мкмоль/мл. Столь же неправомерно оценивать и сумму ω-3 ПНЖК; ни крысы, тем более кролики и человек не могут из ω-3 С18:3 α-линоленовой ННЖК синтезировать ω-3 С20:5 Эйкоза и С22:6 Докоза ПНЖК. Значимо и повышение в плазме крови содержания ω-9 С20:3 дигомо-γ-линоленовой ННЖК. В условиях низкой «биодоступности» для клеток лигандных ЛПНП, блокаде активного поглощения и разви-

тия дефицита в клетках ω-3 и ω-6 ПНЖК, именно ее, эндогенную ω-9 ННЖК клетки используют в компенсаторном синтезе эйкозаноидов группы 1; функционально все эйкозаноиды, которые имеют одну ДС в молекуле, являются афизиологичными. Содержание С20:3 ННЖК повышается при действии статинов, но статистически значимо концентрация ее увеличивается только при действии ω-3 ПНЖК (табл. 4).

Скармливание крысам ХС не столь выражено, но значимо по сравнению с контролем, повышает его содержание в плазме крови, при этом ХС статистически значимо снижается при действии симвастина; в большей мере содержание ХС повышено под влиянием ω-3 ПНЖК. Содержание ХС более высоко в эпидидимальных адипоцитах, по сравнению с жировыми клетками сальника. Снижение содержания ХС при действии ω-3 ПНЖК в висцеральных жировых клетках сальника является более выраженным, чем в подкожных адипоцитах. Одновременно симвастин не оказывает влияния на содержание ХС в инсулинзависимых скелетных миоцитах и кардиомиоцитах.

Для понимания патогенеза атеросклероза необходимо объяснить, почему столь эффективная модель экзогенной гиперхолестеринемии у кроликов и морских свинок с развитием атероматоза интимы артерий эластического типа оказывается несостоятельной при воспроизведении ее на крысах [6]. Почему, поедая с пищей афизиологичное количество экзогенного ХС, крысы формируют гиперлипидемию в меньшей мере, чем кролики. У крыс, в отличие от кроликов, скромно проявляется и гиполипидемическое действие статинов. В клинике же статины выраженно понижают в плазме крови содержание ТГ (спирта глицерина), общего ХС, полярного спирта ХС в ЛПОНП и статистически значимо уменьшают при гиперлипидемии ХС-ЛПНП. ХС-ЛПНП — основной тест оценки методов профилактики атеросклероза и клинической эффективности действия статинов.

Природные статины являются ксенобиотиками, продуктом розовой плесени; они специфично ингибируют активность ключевого фермента синтеза спирта ХС —

Таблица 4

Содержание ХС в плазме крови, миокарде, ткани головного мозга, печени и клетках сальника (M ± m, мкмоль/г влажной ткани, n = 20)

Ткань	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Плазма	1,67 ± 0,04	1,72 ± 0,09	1,55 ± 0,02*	1,40 ± 0,09*	1,53 ± 0,06
Миокард	3,29 ± 0,19	2,97 ± 0,21	2,69 ± 0,10*	2,28 ± 0,13 ***+o	2,85 ± 0,14aa
Головной мозг	32,96 ± 2,00	25,49 ± 1,10**	25,13 ± 0,81**	25,93 ± 1,89*	24,65 ± 1,44**
Печень	5,86 ± 0,37	7,76 ± 0,62*	5,46 ± 0,33++	5,70 ± 0,41++	4,21 ± 0,26 *****oaaa
Клетки сальника	0,86 ± 0,04	0,84 ± 0,06	0,84 ± 0,07	0,76 ± 0,06	0,48 ± 0,02 *****oaaa

β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА-редуктазы. Проянить скромное действие экзогенной гиперхолестеринемии и статинов у крыс, мы предлагаем на основе филогенетической теории общей патологии. Мы предлагаем рассмотреть становление на ступенях филогенеза ЛП — системы переноса и поглощения клетками ЖК у разных видов животных. Ранее мы показали, что статины ингибируют *in vivo* синтез пула полярного ХС, который *in situ de novo* синтезируют гепатоциты при формировании и секреции в кровотоки ЛПОНП [7].

Согласно филогенетической теории общей патологии, формирование системы ЛП претерпело 3 этапа. Миллионы лет (1-й этап) все ЖК к клеткам переносили только в апоА-I ЛПВП в форме полярных липидов: ННЖК+ПНЖК как фосфолипиды (ФЛ), НЖК+МЖК как диглицериды; клетки поглощали все ЖК пассивно. Со временем этого стало недостаточно; в филогенезе клетки начали синтезировать изопротеины апоВ.

На 2-м этапе апоВ-100, образуя ЛПНП, стал переносить к клеткам НЖК+МЖК+ННЖК как неполярные эфиры со спиртом глицерином. Клетки стали поглощать ЖК активно, путем апоВ-100 эндоцитоза; поглощение же ПНЖК оставалось пассивным. На ступенях филогенеза и этого со временем стало недостаточно.

Реализуя единую технологию становления в филогенезе функциональных систем, клетки на 2-м этапе сформировали и активное поглощение ПНЖК в форме нового липида — эфиров со спиртом ХС. Для этого:

а) в ЛПВП произошла переэтерификация ПНЖК из полярных ФЛ в неполярные поли-ЭХС;

б) белок, переносящий полиеновые эфиры холестерина (БППЭХ), сформировал ассоциат ЛПВП + БППЭХ + ЛПОНП; в рамках его гидрофобные поли-ЭХС стали переходить из полярных липидов ЛПВП в неполярные липиды ЛПОНП → ЛПНП;

в) далее все клетки активно поглощали ПНЖК путем апоВ-100 эндоцитоза [8].

Так продолжалось миллионы лет, пока на ступенях филогенеза не началось становление биологической функции локомоции, движения за счет сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов.

На 3-м этапе становления системы ЛП, обеспечение массы скелетных миоцитов большим количеством субстратов для выработки энергии — НЖК + МЖК, привело к дифференцировке апоВ-100 ЛП, образованию:

а) нового класса ЛП — ЛПОНП;

б) системы инсулина;

в) инсулинзависимых клеток.

Гепатоциты, как и прежде, формируют и секретируют в кровотоки ЛПОНП; происходит это в условиях, когда апоВ-100 разделяет пальмитиновые, оле-

иновые, линолевые и линоленовые ТГ, образуя одноименные субклассы ЛПОНП. Пальмитиновые + олеиновые ЛПОНП и линолевые + линоленовые ЛПОНП соотносятся как 100:10. Клетки стали разделять пальмитиновые + олеиновые ЛПОНП путем нового апоЕ/В-100 эндоцитоза в ЛПОНП; 90% ЛПОНП, все пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП физиологично в ЛПНП не превращаются. Их активно при действии апоЕ (генотип $e3, e3$) как белка-вектора поглощают только инсулинзависимые клетки [9].

Линолевые и линоленовые ЛПОНП ($\approx 10\%$ всех ЛПОНП) клетки, с переносимыми ими ННЖК, из ЛПОНП превращаются в ЛПНП. Происходит это при переходе в эти ЛПОНП всех ПНЖК в форме поли-ЭХС из ЛПВП при действии БППЭХ. Далее при образовании лигандных линолевых и линоленовых ЛПНП с переносимыми ими ПНЖК поглощают клетки в форме поли-ЭХС путем апоВ-100 эндоцитоза. Так у большинства видов животных в филогенезе сформировалось отдельное, активное поглощение клетками НЖК + МЖК + ННЖК путем апоЕ/В-100 эндоцитоза только инсулинзависимыми клетками и ПНЖК всеми клетками путем апоВ-100 эндоцитоза.

На поздних ступенях филогенеза у части видов животных (крысы, мыши, собаки) произошла спонтанная мутация БППЭХ-минус. Клетки при этом:

а) утратили возможность поглощать ω -3 и ω -6 ПНЖК;

б) перестали синтезировать филогенетически ранние в паракринных сообществах, высокоактивные гуморальные медиаторы эйкозаноиды (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, резольвины) групп 3 и 2;

в) в клетках блокирован синтез аминокислотных фосфолипидов и нарушена функция всех интегральных протеинов плазматической мембраны.

Дефицит ω -3 и ω -6 ПНЖК вынудил клетки начать компенсаторно синтез эйкозаноидов группы 1 из эндогенно синтезируемой ω -9 С20:3 дигомо- γ -линоленовой ННЖК. Действие афизиологичных эйкозаноидов и блокада поглощения клетками ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза составили основу патогенеза атеросклероза. Дефицит в клетках ПНЖК стал причиной вымирания большей части популяции видов животных. Однако малая часть популяций на ступенях филогенеза сумела сформировать иной вариант поглощения клетками ПНЖК.

Когда в ЛПВП накапливались поли-ЭХС, которые не могут, как ранее, перейти в линолевые + линоленовые ЛПОНП → ЛПНП, с ЛПВП, мы полагаем, функционально начал ассоциироваться апоЕ. При этом ЛПВП стали формировать кооперативный апоЕ/А-I лиганд, а клетки синтезировать и выставлять на плазматическую мембрану апоЕ/А-I рецепторы. Так на ступенях филогенеза сформировался но-

вый вариант поглощения клетками ПНЖК, в котором не участвуют ни ЛПОНП, ни ЛПНП. На ступенях филогенеза сформировались два варианта активного поглощения клетками ПНЖК:

- а) путем непрямого, апоВ-100 эндоцитоза (морские свинки, кролики, приматы и человек);
- б) апоЕ/А-I прямой эндоцитоз (крысы, мыши и собаки) (рисунок).

Для того, чтобы смоделировать атеросклероз и атероматоз у кроликов требуется заблокировать (выбить ген) апоВ-100 рецептора, как это происходит у кроликов линии Watanabe [10]. Для моделирования атеросклероза и атероматоза у крыс надо выбить ген — апоЕ [11].

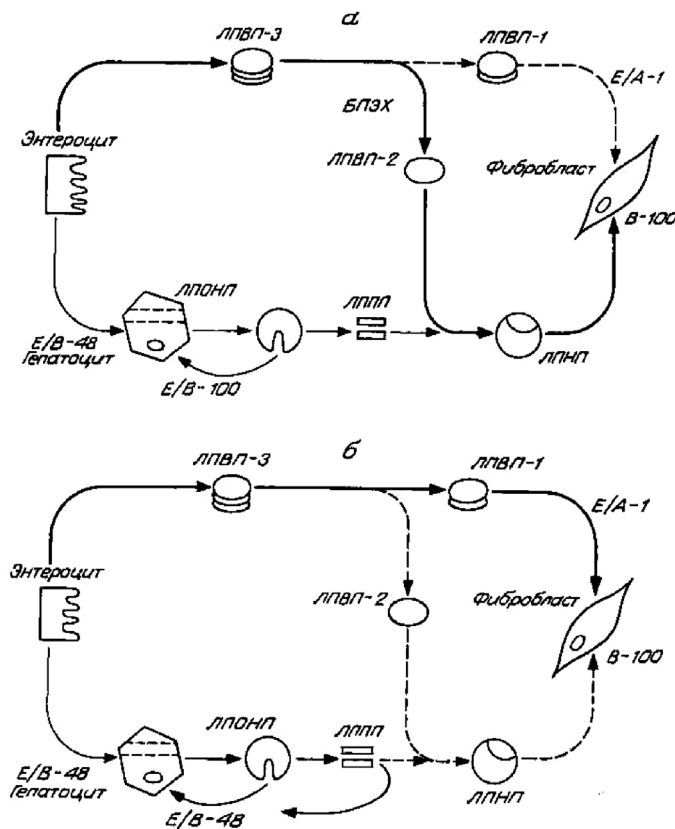
Нами показано, что locus minoris resistencia формирования гиперлипидемии, высокого уровня ТГ в плазме крови и межклеточной среде, локализован в пальмитиновых ЛПОНП. Гепатоциты секретируют в кровотоке ЛПОНП, которые не имеют активного положения лиганда (безлигандные ЛПОНП) по причине физиологичной перегрузки липопротеинов ТГ. Активация липолиза оставляет в ассоциации с апоВ-100 оптимальное количество ТГ; при этом апоВ-100 изменяет конформацию (пространственную форму) и формирует на поверхности

ЛПОНП кооперативный апоЕ/В-100 лиганд. Клетки связывают лигандные ЛПОНП одноименными рецепторами и поглощают их [12].

Фактором, который активирует гидролиз ТГ в ЛПОНП, является преобладание секреции гепатоцитами олеиновых ЛПОНП над пальмитиновыми; это касается как доминирования экзогенной олеиновой МЖК в пище, так и синтеза в гепатоцитах ω-9 олеиновой МЖК *in situ de novo*, из экзогенных углеводов. Условиями, которые ингибируют липолиз в ЛПОНП являются:

- а) низкая активность постгепариновой ЛПЛ и (или) кофактора апоС-II [13];
- б) секреция гепатоцитами преимущественно пальмитиновых ЛПОНП из ЖК пищи [14];
- в) афизиологичный синтез пальмитиновой НЖК из углеводов пищи;
- г) повышенное содержание ХС в монослое фосфатидхолинов (ФХ) на поверхности всех ЛПОНП.

Высокое содержание ХС в полярном монослое ЛПОНП формирует, по сути, «преграду» между гидрофильным ферментом в плазме крови и — гидрофобными ТГ по другую сторону монослоя, в массе ТГ в ЛПОНП. Увеличение содержания в пище и в моно-



Схемы переноса и поглощения клетками ПНЖК в форме поли-ЭХС у кроликов (а) путем опосредованного апоВ-100 эндоцитоза, а также поглощения ПНЖК у крыс (б) путем апоЕ/А-I прямого эндоцитоза вне ЛПОНП и ЛПНП. ЛПВП-1 — фракция ЛПВП с преобладанием ПНЖК в форме поли-ЭХС. Различие изображено пунктирными линиями.

слое ЛПОНП спирта ХС и понижение проницаемости является причиной ГЛП; статины же, ингибируя в гепатоцитах синтез ХС [15], понижают содержание ХС в моносле и отношение ХС/ФХ; это увеличивает проницаемость монослоя полярных липидов в ЛПОНП. Статины, понижая синтез полярного ХС в ЛПОНП, активируют гидролиз ТГ, формирование лигандных пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП и активное поглощение их клетками путем апоЕ/В-100 эндоцитоза. Так, гиперлипидемия при экзогенной гиперхолестеринемии и гиполлипидемическое действие статинов реализованы в одном *locus minoris resistenciac*; происходит это при повышении и понижении содержания ХС в полярном монослое липидов в ЛПОНП, при повышении и понижении отношения ХС/ФХ [16]. В этом же локусе локализовано и действие избыточного количества пальмитиновых ЛПОНП.

У животных (кролики, морские свинки), которые реализуют не прямое поглощение клетками ПНЖК (ЛПВП → ЛПНП → апоВ-100 эндоцитоз), нарушение поглощения клетками ЛПОНП, вторично всегда нарушит поглощение клетками и ПНЖК, формируя:

а) низкую биодоступность безлигандных ЛПНП для клеток;

б) формирование атерогенной ГЛП из избыточного количества пальмитиновых ЛПНП.

У животных же (крысы, мыши, собаки), которые реализуют прямое поглощение клетками ПНЖК (ЛПВП → апоЕ/А-1 эндоцитоз) нарушения липолиза в пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП, формирование гиперлипидемии не затрагивает поглощение клетками ПНЖК; дефицит в клетках ПНЖК при этом не формируется [17]. В силу этого различия у крыс на модели экзогенной гиперхолестеринемии не удается воспроизвести ни синдром атеросклероза, ни атероматоз [18].

Наблюдения позитивного действия ПНЖК в эксперименте на разных видах животных при моделировании атерогенной ГЛП (накопление в крови пальмитиновых ЛПНП) подтверждают высказанное нами почти 20-ю годами ранее, мнение, что атеросклероз — синдром дефицита в клетках ПНЖК. Основная причина атеросклероза — не алиментарный дефицит в пище ПНЖК, хотя и это бывает, а формирование *in vivo* низкой «биодоступности» для клеток ПНЖК в безлигандных пальмитиновых, линолевых и линоленовых ЛПНП по причине афизиологично высокого содержания в пище пальмитиновой НЖК и транс-форм МЖК. В клинических и эпидемиологических исследованиях показано позитивное действие ω -3 ПНЖК в лечении ГЛП у пациентов с атеросклерозом и атероматозом интимы артерий эластического и смешанного типов [19, 20].

Основу первичной профилактики атеросклероза составляет уменьшение в пище содержания экзогенных НЖК и транс-форм МЖК, в первую очередь пальми-

тиновой НЖК. Сделать это надо на уровне популяции *Homo sapiens* во всех развитых странах мира. Низкое содержание в пище НЖК способствует и физиологичному действию инсулина, а также предотвращает развитие биологической реакции воспаления [21] и синдрома резистентности к инсулину. Основная биологическая роль инсулина — превращение всей синтезированной гепатоцитами из углеводов в цикле Кноппа-Линена пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК. Происходит это при экспрессии гормоном синтеза двух ферментов: пальмитил-КоА-элонгазы и стеарил-КоА-десатуразы-2. Они активируют синтез из пальмитиновой НЖК ω -9 олеиновой МЖК в реакциях: пальмитиновая С16:0 НЖК → (пальмитоил-КоА-элонгаза) → стеариновая С18:0 → (стеарил-КоА-десатураза) → олеиновая С18:1 МЖК. Это основная биохимическая реакция, которую *in vivo*, мы полагаем, призван активировать инсулин.

Трудно представить, что ксенобиотики статины, чуждые для животного организма, синтетические вещества с разной структурой молекулы, проявляют *in vivo* биологическое, плейотропное действие. Проявляют его только филогенетически ранние, гуморальные медиаторы эйкозаноиды — простаглицлины, простаглицлины, тромбосаканы, лейкотриены и резольвины. Все они являются метаболитами ω -3 С20:5 Эйкоза и ω -6 С20:4 Арахид ПНЖК [22]. Более реально полагать, что, действуя по единому алгоритму, все гиполлипидемические препараты, реализуя действие в ЛПОНП, в *locus minoris resistenciac*, нормализуют поглощение клетками ПНЖК в форме поли-ЭХС, в линолевых и линоленовых ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза. Вот поглощенные клетками ПНЖК реально и проявляют свойственное им физиологичное, плейотропное действие *in vivo*. Основная задача профилактики атеросклероза — предотвращение формирования *in vivo* алиментарного дефицита и низкой «биодоступности» для клеток эссенциальных ПНЖК и дефицита их в клетках.

References

1. Yu X.H., Fu Y.C., Zhang D.W., Yin K., Tang C.K. Foam cells in atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 424: 245-52.
2. Titov V.N. *Atherosclerosis as a pathology of polyene fatty acids. Biological basis of the theory of atherogenesis.* M. Fond «Klinika XXI veka». 2002; 495 p. (In Russian)
3. Okamura T., Tawa M., Geddaya A., Shimosato T, Iwasaki H, Shintaku H., Yoshida Y., Masada M., Shinozaki K., Imamura T. Effects of atorvastatin, amlodipine, and their combination on vascular dysfunction in insulin-resistant rats. *J. Pharmacol.* 2014; 124: 76-85.
4. Luscher T.F., Landmesser U., von Eckardstein A., Fogelman A.M. High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circ. Res.* 2014; 114(1): 171-82.

5. Harriss W.S., Dayspring T.D., Moran T.J. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new developments and applications. *Postgrad. Med.* 2013; 125(6): 100-13.
6. Kapourchali F.R., Surendiran G. et al. Animal models of atherosclerosis. *World J. Clin. Cases.* 2014; 2(5): 126-32.
7. Titov V.N. Clinical biochemistry lipid-lowering therapy and the mechanisms of action of statins. Fatty acids, statins and diabetes. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2014; 2: 4-14. (In Russian)
8. Forrest M.J., Bloomfield D., Briscoe R.J., Brown P.N., Cumiskey A.M., Ehrhart J. et al. orcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154: 1465-73.
9. Alterburg M., Johnson L., Wilder J., Maeda N. Apolipoprotein E4 in macrophages enhances atherogenesis in a low density lipoprotein receptor-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(11): 7817-24.
10. Kobayashi T., Ito T., Shiomi M. Roles of the WHHL rabbit in translational research on hypercholesterolemia and cardiovascular diseases. *J. Biomed. Biotech.* 2011; 2011: 406473.
11. Jawien J. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13(13): 2435-9.
12. Titov V.N., Vostrov I.A., Shiryayeva Yu.K., Kaba S.I. Becoming phylogeny lipoprotein, very low density and insulin. Lipotoxicity fatty acids and lipids. Positional isomers of triglycerides. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2012; 132(5): 506-26. (In Russian)
13. Overgaard M., Brasen C.L., Svaneby D., Feddersen S, Nybo M. Familial lipoprotein lipase deficiency: a case of compound heterozygosity of a novel duplication (R44Kfs*4) and a common mutation (N291S) in the lipoprotein lipase gene. *Ann. Clin. Biochem.* 2013; 50: 374-9.
14. Yang R., Guo P., Song X., Liu F., Gao N. Hyperlipidemic guinea pig model: mechanisms of triglyceride metabolism disorder and comparison to rat. *Biol. Pharm.* 2011; 34(7): 1046-51.
15. Ye P., Cheah I.K., Halliwell B. High fat diets and pathology in the guinea pig. Atherosclerosis or liver damage. *Biophys. Acta.* 2013; 1832: 355-64.
16. Hodulova M., Sedova L., Krenova D., Liska F, Krupkova M, Kazdova L, Tremblay J, Hamet P, Kren V, Seda O. Genomic determinants of triglyceride and cholesterol distribution into lipoprotein fractions in the rat. *PLoS ONE.* 2014; 9(10): e109983.
17. Titov V.N. Phylogenetic theory of general pathology. The pathogenesis of the diseases of civilization. *Atherosclerоз. M. INFRA-M.* 2014; 237 p. (In Russian)
18. Li Y., Wang Q., Zhou J., Xu Q, Chu X, Sun T, Liu X, Cai S. Rosuvastatin attenuates atherosclerosis in rats via activation of scavenger receptor class B type I. *Eur. J. Pharmacol.* 2014; 723: 23-8.
19. Koh K.K., Quon M.J., Shin K.C., Lim S, Lee Y, Sakuma I, Lee K, Han SH, Shin EK. Significant differential effects of omega-3 fatty acids and fenofibrate in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis.* 2012; 220(2): 537-44.
20. Le Goff W. A new piece in the puzzling effect of n-3 fatty acids on atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014; 235(2): 358-62.
21. Eguchi K., Manabe I., Oishi-Tanaka Y., Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T, Nagai R. Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell. Metab.* 2012; 15: 518-533.
22. Millon A., Canet-Soulas E., Boussel L., Fayad Z, Douek P. Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression. *Vascular.* 2014; 22(3): 221-37.

Сведения об авторах:

Котловский Михаил Юрьевич, канд. мед. наук, зав. отделом газожидкостной, жидкостной и времяпролетной масс-спектрометрии Центральной научно-исследовательской лаб. ГБОУ ВПО Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, e-mail: misha11443@ Rambler.ru

Якименко Анна Владимировна, биолог Центральной научно-исследовательской лаб. ГБОУ ВПО Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, e-mail: Anna-419@mail.ru

Курдоjak Евгения Валентиновна, биолог Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, e-mail: bolshakova_e_v@mail.ru

Якимович Инесса Юрьевна, канд. мед. наук, доцент, зав. учебной частью каф. физической культуры и здоровья, ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»

Гришанова Алевтина Юрьевна, доктор биол. наук, проф., руководитель лаб. биохимии чужеродных соединений НИИМББ СО РАМН, e-mail: agrish@niimbbs.ru

Аксютинa Наталья Валерьевна, канд. мед. наук, врач-кардиолог, «Профессорская клиника» КрасГМУ, e-mail: Aks-n-v@mail.ru

Котловский Юрий Васильевич, доктор мед. наук, проф., зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ГБОУ ВПО Красноярского государственного медицинского университета имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, e-mail: office@krascnil.ru

Дыгай Александр Михайлович, засл. деятель науки РФ, акад. РАН, доктор мед. наук, профессор, директор НИИ фармакологии Томского научного центра Сибирского отделения РАН, e-mail: amd@pharm.tsu.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092; 575.133: 577.21

Митрофанов К.Ю.^{1,2}, Желанкин А.В.^{1,2}, Сазонова М.А.^{1,3}, Постнов А.Ю.³,
Собенин И.А.^{1,3}, Карагодин В.П.⁴, Орехов А.Н.^{1,2}

Гаплотипы мутаций *m.3256C>T*, *m.12315G>A*, *m.13513A>G* и *m.15059G>A* митохондриального генома, ассоциированные с фенотипическими проявлениями предрасположенности к атеросклеротическим поражениям

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

² — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Московская область, Россия, Сколково, ул. Новая, д.100

³ — ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, г. Москва, Черепковская 3-я ул., д. 15-а

⁴ — Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, 115054, г. Москва, Россия, Стремянный переулок, д. 36

Цель исследования. Выявление ассоциации между проявлениями атеросклероза (ТИМС, бляшки) и гаплотипами мутаций митохондриального генома. **Методика.** Обследовано 130 человек: больные ИБС, перенёвшие инфаркт миокарда, пациенты с УЗИ признаками атеросклероза, а также условно здоровые лица, без УЗИ признаков атеросклероза. Материалом исследования были образцы ДНК, выделенные из клеток крови участников исследования. Выделение ДНК проводилось фенол-хлороформным методом. Выделенная ДНК была использована для определения процента гетероплазмии по 9 митохондриальным мутациям, с использованием метода ПЦР в реальном времени. **Результаты.** Были идентифицированы гаплотипы мутаций митохондриального генома, ассоциированные с фенотипическими проявлениями предрасположенности к атеросклеротическим поражениям. Преобладающие антиатеросклеротические гаплотипы CGAG и CGGG встречались у 21,3% участников исследования. Преобладающие проатеросклеротические гаплотипы TAAA, TAGG и TAGA встречались у 44,8% участников исследования. Таким образом, было установлено, что существуют несколько наиболее распространенных гаплотипов мутаций митохондриального генома, охватывающих около 65% популяции; 2/3 этих гаплотипов связаны с повышенной предрасположенностью к атеросклерозу. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что предположительная степень генетического риска митохондриального «гаплотипа» по мутациям *m.3256C>T*, *m.12315G>A*, *m.13513A>G* и *m.15059G>A* линейно связана с абсолютной толщиной интимо-медиального слоя сонных артерий и выраженностью атеросклеротических бляшек в обследованной группе участников экспериментально-клинического исследования.

Ключевые слова: мутация; гаплотип; митохондриальный; патология; гетероплазмия.

Для цитирования: Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Гаплотипы мутаций *m.3256C>T*, *m.12315G>A*, *m.13513A>G* и *m.15059G>A* митохондриального генома, ассоциированные с фенотипическими проявлениями предрасположенности к атеросклеротическим поражениям. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 37–42.

Для корреспонденции: Митрофанов Константин Юрьевич, мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии, e-mail: kyu-mitrofanov@gmail.com

Финансирование. Работа проводилась при поддержке Министерства образования и науки РФ, проект RFMEFI61314X0006.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.06.2016

Mitrofanov K.Yu.^{1,2}, Zhelankin A.V.^{1,2}, Sazonova M.A.^{1,3}, Postnov A.Yu.³,
Sobenin I.A.^{1,3}, Karagodin V.P.⁴, Orekhov A.N.^{1,2}

Haplotype of the mutations *m.3256C>T*, *m.12315G>A*, *m.13513A>G* and *m.15059G>A* mitochondrial genome associated with phenotypic expression of the predisposition to atherosclerotic lesions

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia, st. Baltiyskaya, 8

² — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, Moscow 143025, Russia, Moscow region, Skolkovo, st. Novaya, d.100

³ — Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow 121552, Russia, Cherepkovskaya 3rd st., 15-a

⁴ — Plekhanov Russian University of Economics, Moscow 115054, Russia, Stremyanniy pereulok, 36

Mitochondrial genome mutations haplotypes associated with phenotypic manifestations of predisposition to atherosclerotic lesions were identified. The data suggests the existence of several «haplotypes» mitochondrial mutations associated with an increased risk of atherosclerosis. To formulate names of mitochondrial genome «haplotypes» the principle of individual heteroplasmy indicators relative to the mid-point was used. The median value for heteroplasmy level of mutations m.3256C>T amounted to 17.5%, mutation m.12315G>A — 28%, mutation m.13513A>G — 19.5%, and mutation m.15059G>A — 39%. On the basis of the estimated degree of genetic risk (СРЕМ) most small and meaningful options for aggregate mutations m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G and m.15059G>A are «haplotype» CGAG (lowest susceptibility to atherosclerosis) and TAGA (the greatest susceptibility to atherosclerosis) respectively; other possible combinations are intermediate. Prevailing anti-atherosclerotic haplotype CGAG and CGGG met at 21.3% of survey participants. The prevailing proatherosclerotic haplotype TAAA, TAGG and TAGA met at 44.8% of survey participants. 2/3 of these haplotypes are associated with increased risk of atherosclerosis. Approximate extent of the genetic risk of mitochondrial «haplotype» on mutations, m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G and m.15059G>A and linearly related to absolute thickness intimo-medial layer of the carotid arteries and the manifestation of atherosclerotic plaques in the surveyed group of persons-participants of experimental clinical studies. **The purpose.** Find an association between atherosclerosis manifestations (TIMS, plaques) and gapoltipami mutations of the mitochondrial genome. **Methods.** The object of the research were 130 people: patients with coronary artery disease who underwent myocardial infarction, patients with ultrasound evidence of atherosclerosis, and relatively healthy, with no ultrasound evidence of atherosclerosis. The material of the studies were DNA samples isolated from blood cells collected from study participants. DNA extraction was performed with phenol-chloroform method. The isolated DNA was used to determine the percentage of mitochondrial heteroplasmy 9 mutations using PCR in real time. **Results.** Haplotypes of mutations of the mitochondrial genome have been identified associated with the phenotypic manifestations of susceptibility to atherosclerotic lesions. The prevailing anti-atherosclerotic and haplotypes CGAG CGGG occurred in 21.3% of study participants. Prevailing atherosclerotic haplotypes TAAA, TAGG and TAGA occurred in 44.8% of study participants. Thus, it was found that there are a few common haplotypes of mutations of the mitochondrial genome, covering about 65% of the population; 2/3 of these haplotypes is associated with increased susceptibility to atherosclerosis. **Conclusion.** The results indicate that the presumed degree of genetic risk of mitochondrial «haplotype» for mutations m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G and m.15059G>A is linearly related to the absolute thickness of intima-media layers of the carotid arteries and the severity of atherosclerotic plaques in the studied group of persons — participants of experimental and clinical studies.

Keywords: mutation; haplotype; mitochondrial; pathology; heteroplasmy.

For citation: Mitrofanov K.Yu., Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Postnov A.Yu., Sobenin I.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Haplotype of the mutations m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G and m.15059G>A mitochondrial genome associated with phenotypic expression of the predisposition to atherosclerotic lesions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61 (1): 37–42. (in Russ.).*

For correspondence: Mitrofanov K.Yu., Junior Researcher, Leading Researcher work Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia, st. Baltiyskaya, 8, e-mail: kymitrofanov@gmail.com

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

Funding. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, the project RFMEFI61314X0006.

Received 01.06.2016

Введение

В России, как и в большинстве индустриальных стран, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают первое место в структуре инвалидизации и смертности. Несмотря на существенные достижения в области медицины и биологии, заболеваемость и смертность от атеросклеротических заболеваний остаются на высоком уровне, в то время как арсенал эффективных терапевтических средств и адекватных целей антиатеросклеротической терапии весьма ограничен [1]. Современные алгоритмы оценки сердечно-сосудистого риска, учитывающие совокупное взаимодействие нескольких факторов риска, в состоянии объяснить около 70% варибельности возникновения острого инфаркта миокарда [2, 3].

В качестве важного и перспективного компонента эффективной системы оценки предрасположенности к атеросклеротическим заболеваниям следует рассматривать анализ гаплотипов генов предрасположенности к ССЗ. Так, при различных патологиях человека выявлена ассоциация различных заболеваний (например, стеноза коронарных сосудов, сахарного диабета, глухоты, инфаркта миокарда, кардиомиопатий) с мутациями митохондриального генома, локализованными в кодирующих участках генов и, возможно, возникающими в процессе онтогенеза [4, 5]. При этом практически неразработанным направлением исследований является изучение связи митохондриальных мутаций с возникновением и развитием атеросклеротических поражений в артериях человека, в част-

ности с ишемической болезнью сердца (ИБС) [6—10]. Данные мутации могут вызывать дефекты в белковых цепях некоторых дыхательных ферментов и транспортных РНК (тРНК), синтезирующихся непосредственно в митохондриях [8—10, 11—15]. Это приводит, в частности, к уменьшению концентрации данных ферментов и тРНК или полной их дисфункции в митохондриях, что, в свою очередь, ведет к дисфункции митохондрий в организме человека, с большой вероятностью способствующей возникновению и развитию атеросклероза [3, 14—18].

Методика

Материалом исследования были образцы ДНК, выделенные из клеток крови, взятой у 130 участников исследования. Объектом исследования были больные ИБС, перенесшие инфаркт миокарда, пациенты с УЗИ признаками атеросклероза. Больные проходили обследование в кардиологическом центре им. Мясникова и в поликлинике МГУ. В качестве контрольной группы были взяты 42 условно здоровых донора, не имеющих УЗИ признаков атеросклероза.

Выделение ДНК

Кровь после забора хранили при -20°C . Выделение ДНК проводилось фенол-хлороформным методом. Концентрацию ДНК в полученной пробе определяли на спектрофотометре NanoPhotometer Pearl UV/Vis с SDRAM P-34 («IMPLEN», Германия). Для работы с коллекцией пробы ДНК разводили в ТЕ-буфере до концентрации 0.03 мкг/мкл, помещали разведённые образцы в отдельные пробирки. После измерения концентрации пробы ДНК хранили при -20°C .

Полимеразная цепная реакция реального времени

Выделенная ДНК была использована для определения процента гетероплазии по 9 митохондриальным мутациям, с использованием метода ПЦР в реальном времени. Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома человека всех 9 проанализи-

рованных мутаций был измерен с помощью метода выплечения 5'-концевой метки (TaqMan Assay).

Для каждой из 9 мутаций были разработаны зонды TaqMan, характеристики которых приведены в табл. 1.

Дизайн праймеров и зондов (табл. 1) был проведён для девяти мутаций митохондриального генома с использованием следующих программ [19—22]:

- primer 3;
- oligo calc;
- клиент-сервер DINAMELT;
- база данных Mitomap.

Для определения последовательностей праймеров была использована Кембриджская последовательность мтДНК человека, версия J01415.2, идентификационный номер GenBank NC_012920 gi:251831106.

Проверку специфичности праймеров и зондов проводили на приборе Real Time PCR System 7500 Fast («Applied Biosystems», США). Также для каждого из видоспецифичных зондов подобраны флуоресцентные красители, спектры флуоресценции которых не перекрывались. Регистрацию сигнала ПЦР в реальном времени проводили по каналам, соответствующим флуорофорам FAM и ROX, детектирующим продукт амплификации нормального и мутантного аллеля (соответственно).

ПЦР-анализ с выплечением 5'-концевой метки (TaqMan система) проводили на приборе Real Time PCR System 7500 Fast («Applied Biosystems», США). 10 мкл реакционной смеси содержало 1x TaqMan Buffer, 3 mM MgCl_2 , 250 мкМ каждого dNTP, 300 нМ праймеры, 300 нМ гибридационных зондов, 0,5 ед. Taq-полимеразы («Хеликон», Москва), 4 мкл анализируемой ДНК.

ПЦР, с измерением интенсивности флуоресценции, проводили по следующему алгоритму:

1. Цикл общей денатурации в течение 2 мин при температуре 94°C ;

2. Этап амплификации с флуоресцентной детекцией. Он включал в себя денатурацию в течение 10 с при температуре 94°C и отжиг, при температуре, специфичной для каждой исследуемой мутации ($61\text{—}67^{\circ}\text{C}$), в течение 15 с.

Таблица 1

Зонды и праймеры для ПЦР-РВ TAQMAN

Мутация	Праймеры	Зонды
m.3256C>T	F ataccsacaccsccscaag R aagaagaggaattgaacctctgact	5'-ROX- gcagagcccggtaatcgtataaaaactta -BHQ-2 -3' 5'-FAM- agagcccggtaatcgcataaaaacttaaa -BHQ-1 -3'
m.12315G>A	F cagctatccattggtcttaggc R ggaagtcagggttaggggtgt	5'-ROX- ccaaaaattttagtcaactccaataaaag -BHQ-2 -3' 5'-FAM- ccaaaaattttgtgcaactccaataaa -BHQ-2 -3'
m.13513A>G	F gcagcctagcattagcagga R ataggcctcaggcgtttgt	5'-ROX- caggtttctactccaaaaccacatcatc -BHQ-2 -3' 5'-FAM- caggtttctactccaaaaccacatcatc -BHQ-2 -3'
m.15059G>A	F caatggcgcctcaatattct R caggaggataatgccgatgt	5'-ROX- gggcaggcctatattacagatcatttct -BHQ-2 -3' 5'-FAM- gcgaggcctatattacgatcatttct -BHQ-2 -3'

Статистический анализ

Данные были обработаны с использованием пакета программ SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), SigmaPlot 12 (SSI, San Jose, California, USA) и программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Вариабельность процента гетероплазмии оценивалась с помощью описательной статистики и критерия Т. Для оценки однородности дисперсий была использована статистика Ливиня. Мутационная нагрузка рассчитана с помощью логит-регрессионного и пробит-регрессионного анализов, а также теста по Манну—Уитни.

Результаты и обсуждение

Были идентифицированы гаплотипы мутаций митохондриального генома, ассоциированные с фенотипическими проявлениями предрасположенности к атеросклеротическим поражениям. Преобладающие антиатеросклеротические гаплотипы CGAG и CGGG встречались у 21,3% участников исследования. Преобладающие проатеросклеротические гаплотипы TAAA, TAGG и TAGA встречались у 44,8% участников исследования. Таким образом, было установлено, что существуют несколько наиболее распространенных гаплотипов мутаций митохондриального генома, охватывающих около 65% популяции; 2/3 этих гаплотипов связаны с повышенной предрасположенностью к атеросклерозу. Традиционная характеристика гаплотипа, основанная на простом определении нали-

чия мутантного аллеля, используемая при характеристике ядерного генома, неадекватна потому, что в одном образце мтДНК присутствуют в различных соотношениях молекулы, несущие нормальный («дикий тип») и мутантный аллель. Для формулирования названий гаплотипов митохондриального генома был использован принцип распределения индивидуальных показателей гетероплазмии относительно медианы.

Данные, приведенные в табл. 2, позволяют предположить существование ряда «гаплотипов» митохондриальных мутаций, ассоциированных с повышенным риском атеросклероза. По критерию предположительной степени генетического риска (ПСГР) самым незначительным и значимым вариантами для совокупности мутаций m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G и m.15059G>A являются «гаплотипы» CGAG (наименьшая предрасположенность к атеросклерозу) и TAGA (наибольшая предрасположенность к атеросклерозу) соответственно; остальные возможные сочетания занимают промежуточное положение. Мутации митохондриального генома характеризуются явлением гетероплазмии, когда в одном образце ДНК присутствуют в различных соотношениях молекулы, несущие нормальный («дикий тип») и мутантный аллель. Поэтому традиционная характеристика «гаплотипа», основанная на простом определении наличия мутантного аллеля, которая используется при характеристике ядерного генома, неадекватна. Для формулирования названий «гаплотипов» митохондриального генома был использован принцип

Таблица 2

Теоретические варианты «гаплотипов» митохондриального генома по мутациям m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G и m.15059G>A

Гаплотип	Число антиатеросклеротических аллелей	Число проатеросклеротических аллелей	Предположительная степень генетического риска "гаплотипа"	Частота в исследованной выборке, %
CGAG	4	0	0	10,4
CAAG	3	1	1	0,5
CGAA	3	1	1	4,2
CGGG	3	1	1	10,9
TGAG	3	1	1	1,6
CAAA	2	2	2	2,1
CAGG	2	2	2	4,2
CGGA	2	2	2	4,7
TAAG	2	2	2	2,6
TGAA	2	2	2	3,6
TGGG	2	2	2	5,7
CAGA	1	3	3	4,7
TAAA	1	3	3	33,3
TAGG	1	3	3	7,3
TAGA	0	4	4	4,2

«Гаплотипы» мутаций митохондриального генома и предрасположенность к атеросклерозу

Показатель	Предположительная степень генетического риска "гаплотипа"					P (Манн—Уитни)
	0 (n = 20)	1 (n = 33)	2 (n = 44)	3 (n = 87)	4 (n = 8)	
ТИМС ОСА, мкм	782 (118)	814 (121)	854 (173)	922 (175)	823 (150)	<0,001
Бляшки, баллы	0,65 (0,81)	0,67 (0,82)	0,61 (0,81)	1,11 (0,88)	0,25 (0,46)	<0,001

распределения индивидуальных показателей гетероплазмы относительно медианы. Значение медианы для уровня гетероплазмы по мутации m.3256C>T составило 17,5%, по мутации m.12315G>A — 28%, по мутации m.13513G>A — 19,5%, и по мутации m.15059G>A — 39%.

Наиболее вероятные варианты «гаплотипов» (наиболее часто встречающиеся в исследованной выборке) и их характеристики, определенные на соотношении антиатеросклеротических и проатеросклеротических аллелей, приведены в таблице (табл. 2).

Предположительная степень генетического риска «гаплотипа» приведена в баллах (0 — наименьшая ПСГР, имеются только антиатеросклеротические аллели, соотношение 4:0; 1 — низкая ПСГР, преобладают антиатеросклеротические аллели, соотношение 3:1; 2 — умеренная ПСГР, равное соотношение антиатеросклеротических аллелей, соотношение 2:2; 3 — повышенная ПСГР, преобладают проатеросклеротические аллели, соотношение 1:3; 4 — высокая ПСГР, имеются только проатеросклеротические аллели, соотношение 0:4).

Анализ частот наиболее распространенных «гаплотипов» мутаций митохондриального генома (доля в выборке более 5%) представлен в табл. 2.

Наиболее распространенные антиатеросклеротические «гаплотипы» CGAG и CGGG встречались у 21,3% участников исследования (табл. 2). В целом, 27,6% участников исследования можно охарактеризовать как лиц, имеющих низкую генетическую предрасположенность к атеросклерозу. Наиболее распространенные проатеросклеротические «гаплотипы» TAAA, TAGG и TAGA встречались у 44,8% участников исследования. В целом, 49,5% участников исследования можно охарактеризовать как лиц, имеющих высокую генетическую предрасположенность к атеросклерозу. Частота выявления для остальных «гаплотипов» составляла менее 6%. Таким образом, существуют несколько весьма распространенных «гаплотипов» мутаций митохондриального генома, охватывающих около 65% выборки населения различных регионов мира; 2/3 этих «гаплотипов» связаны с повышенной предрасположенностью к атеросклерозу. Эти данные вполне сочетаются с эпидемиологическими показателями распространенности атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

Анализ ассоциации совокупности мутаций («гаплотипов») с предрасположенностью к атеросклерозу представлен в табл. 3.

Из данных, представленных в табл. 3, следует, что предположительная степень генетического риска митохондриального «гаплотипа» по мутациям m.3256C>T, m.12315G>A, m.13513A>G и m.15059G>A линейно связана с абсолютной толщиной интимо-медиального слоя сонных артерий и выраженностью атеросклеротических бляшек в обследованной группе лиц — участников экспериментально-клинического исследования.

References

1. Temchenko A.V., Nikiforov N.G., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Karagodin V.H., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Achievements in therapy of atherosclerosis. *Pathogenesis* 2013; 11(2): 11-8.
2. Bruckmeier B.V. *Pocket guide to prevention of coronary heart disease. International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease*. 2003, pp. 128.
3. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Zhelankin A.V., Myasoedova V.A., Postnov A.Y., Nurbaev S.D., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Mutation C3256T of mitochondrial genome in white blood cells: novel genetic marker of atherosclerosis and coronary heart disease. *PLoS One*. 2012; 7(10):1-7.
4. Chinnery P.F., Thorburn D.R., Samuels D.C. et al. The inheritance of mtDNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends. Genet.* 2000; 16: 500-5.
5. Kaufmann P., Koga Y., Shanske S. et al. Mitochondrial DNA and RNA processing in MELAS. *Ann. Neurol.* 1996; 40: 172-80.
6. Mitrofanov K.Y., Sazonova M.A. Association mitochondrial mutations of the human genome with the clinical manifestations of coronary heart disease. *Problemi i perspektivy sovremennoy nauki*. 2011; 3(1): 92-6. (in Russian)
7. Singh V.N. *Coronary Heart Disease*. Medicine health, 2002.
8. Sazonova M.A., Nurbaev S.D., Chicheva M.M., Mitrofanov K.Y., Orekhov A.N., Postnov A.Y., Sobenin I.A. Detection of mitochondrial gene mutations of cytochromes B and C in human aortic intima lipofibrous plaques (message 1). *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; (4):62-5. (in Russian)
9. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Chicheva M.M., Mitrofanov K.Y., Zhelankin A.V. Association of RNA genes of mitochondrial heteroplasmy mutations c homogenates of diseased atherosclerotic aortic intima (message 2). *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; (4):67-70. (in Russian)
10. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Chicheva M.M., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Analysis of heteroplasmy some subunit genes NADH dehyd-

rogenase in homogenates of atherosclerotic lesions of the intima of the aorta (message 3). *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; (4):71-3. (in Russian)

11. Ingman M., Kaessmann H., Paabo S., Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 2000; 408: 708-13.

12. Lightowlers R.N., Chinnery P.F., Turnbull D.M., Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends. Genet.* 1997; 13: 450-5.

13. Robinson B.H. Human Complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect *Biochem. Biophys. Acta.* 1998; 1364: 271-86.

14. Sukhorukov V.S. *Disorders of cellular energy [narushe-niya kletочноy energetiki]*. Moscow: Moskovskij nii pediatrii i detskoj hirurgii minzdrava RF; 2002. (in Russian)

15. Sukernik R.I., Derbeneva O.A. Starikovskaya E.B., Mitochondrial genome and human mitochondrial diseases. *Genetika*, 2002; 38(2): 1-10. (in Russian)

16. Ivanova M.M., Borodachev E.N. Sazonova M.A. Human diseases associated with mutations in the mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; (3):115-22. (in Russian)

17. Mitrofanov K.Y., Sazonova M.A. Association of point mutations of mitochondrial and nuclear genomes of human coronary heart disease. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; (2):51-5. (in Russian)

18. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Myasoedova V.A., Kirichenko T.V., Ivanova M.M., Postnov A.Y., Orekhov A.N. The polymorphism of 3256S/T mitochondrial DNA as a marker of coronary heart disease and atherosclerosis. *Problemi i perspektivy sovremennoy nauki.* 2011; 3(1):108-10. (in Russian)

19. Primer 3 version 4.0 www.frodo.wi.mit.edu/primer3/.

20. Oligocalculator www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html.

21. DinaMelt web server www.mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt.

22. Mitomap server www.mitomap.org/MITOMAP.

Сведения об авторах:

Желанкин Андрей Викторович, канд. биол. наук, науч. сотр.

Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории ангиопатологии

Постнов Антон Ювенальевич, доктор мед. наук, зав. лаб. сердечно-сосудистой хирургии

Собенин Игорь Александрович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр.

Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф. биохимии

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.13-004.6-092

Калинкин М.Н., Щеглова Н.Е.

МикроРНК и полиморфизм генов их биогенеза в патогенезе атеросклероза

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, 170100, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

Цель исследования — изучение экспрессии проангиогенных и антиангиогенных микроРНК, при атеросклерозе и особенностей полиморфизма генов их биогенеза. **Методика.** Обследовано 30 мужчин, страдающих гипертонической болезнью (ГБ), 20 мужчин, имеющих верифицированный диагноз ИБС постинфарктный кардиосклероз (ИБС ПИКС) и 15 здоровых мужчин. У всех больных в плазме крови определяли проангиогенные miR-126 и miR-155 и антиангиогенные miR-221 и miR-222. В ходе генотипирования определяли однонуклеотидные полиморфизмы генов, участвующих в биогенезе микроРНК, таких, как *AGO1* (A/G), *DGCR8* (G/A), *GEMIN4* (A/G), *DROSHA* (A/C). Проводили анализ ассоциации изменения экспрессии изучаемых микроРНК и полиморфизма генов, с частотой встречаемости ГБ и ИБС ПИКС. **Результаты.** Обнаружена ассоциация между генотипом AA гена *GEMIN4* и риском развития ГБ. При изучении экспрессии микроРНК, уровни проангиогенной miR-126 и антиангиогенных miR-221 и miR-222 в группах ГБ и ИБС ПИКС статистически значимо превышали аналогичные показатели в контрольной группе, в то время как уровень экспрессии проангиогенной miR-155 в плазме крови остается неизменным как в группе ГБ, так и у больных ИБС ПИКС. Изучение интегральных портретов ковариационных матриц и дисперсии микроРНК позволило сделать вывод, что в контрольной группе здоровых людей доминирующая вариационная роль отводится miR-126, а в группах больных ГБ и ИБС ПИКС — miR-221. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что количественная и качественная оценка изучаемых miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 в группах больных ГБ и ИБС ПИКС подтверждает корреляцию данных микроРНК с исследуемыми заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: атеросклероз; патогенез; гипертоническая болезнь; постинфарктный кардиосклероз; микроРНК; полиморфизм генов; экспрессия.

Для цитирования: Калинкин М.Н., Щеглова Н.Е. МикроРНК и полиморфизм генов их биогенеза в патогенезе атеросклероза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 43–50.

Для корреспонденции: Щеглова Наталья Евгеньевна, канд. мед. наук, доцент кафедры патологической физиологии, e-mail: natali.sh45@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2016

Kalinkin M.N., Shcheglova N.E.

MicroRNAs and polymorphism of genes of biogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis

FSBSI HE Tver State Medical University MU MOH Russia; 4, ul. Sovetskaya, Tver, 170100, Russia

The purpose — to determine the condition expression of pro-angiogenic and anti-angiogenic microRNAs and specifics of gene polymorphisms their biogenesis in the severe atherosclerosis and to introduce the pathophysiologic analysis of the significance of the data. **Methods.** The study included 30 men suffering from essential hypertension, 20 men who have the diagnosis of cardiosclerosis and 15 healthy men. Proangiogenic miR-126 and miR-155, angiogenic miR-221 and miR-222 were defined in the blood plasma for each patient. During genotyping single nucleotide polymorphisms of genes involved in the biogenesis microRNAs, such as *AGO1* (A/G), *DGCR8* (G/A), *GEMIN4* (A/G), *DROSHA* (A/C) were determined. The analysis of the association of changes in the expression of microRNAs and polymorphisms of genes with the incidence of essential hypertension and cardiosclerosis was carry out. **Results.** We found the association between genotype AA *GEMIN4* gene and the risk of essential hypertension. In the study of microRNAs expression levels of proangiogenic miR-126 and antiangiogenic miR-221, miR-222 in patients with essential hypertension and cardiosclerosis were significantly higher than in the control group. While the level of expression of proangiogenic miR-155 in the blood plasma remains unchanged in both groups. The study of integral portraits of covariance matrices and variance miRNAs led to the conclusion that in the control group of healthy people the dominant variation role belongs miR-126 and in the groups of patients with es-

sential hypertension and cardiosclerosis — miR-221. **Conclusion.** The results indicate that the quantitative and qualitative evaluation of the studied miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 in patients with essential hypertension and cardiosclerosis confirms the correlation of these microRNAs with the studied diseases of the cardiovascular system.

Keywords: atherosclerosis; pathogenesis; essential hypertension; cardiosclerosis; microRNA; gene polymorphism; expression.

For citation: Kalinkin M.N., Shcheglova N.E. MicroRNAs and polymorphism of genes of biogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(1): 43–50. (in Russ.).

For correspondence: Natalia E. Shcheglova, Candidate of Medical Sciences, Researcher Federal State Budgetary Scientific Institution HE Tver State Medical University MU MOH Russia; 4, ul. Sovetskaya, Tver, 170100, Russian Federation, e-mail: natali.sh45@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kalinkin M.N., <http://orcid.org/0000-0001-5799-4147>

Shcheglova N.E., <http://orcid.org/0000-0003-0304-4212>

Received 15.11.2016

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) лидируют в структуре причин смертности населения экономически развитых стран. Процессы атеросклероза, тромбоза и артериальной гипертензии составляют патоморфологическую основу заболеваний сердечно-сосудистой системы, а нарушение мозгового кровообращения и ишемическая болезнь сердца (ИБС) — наиболее частые причины летальных исходов [1, 2].

В настоящее время проводятся многочисленные исследования с целью изучения роли микроРНК в молекулярно-генетических механизмах развития ССЗ. Появляются новые данные о различном биологическом влиянии микроРНК на компоненты сердечно-сосудистой системы. Согласно литературным источникам, нарушение функционирования определенных микроРНК может способствовать развитию таких патологических состояний как ИБС, постинфарктное ремоделирование миокарда, хроническая сердечная недостаточность [3–5]. Вместе с тем, следует указать, что данные количественных и качественных характеристик экспрессии микроРНК в различные периоды развития атеросклероза в литературе противоречивы. В связи с этим проведение подобных исследований представляется, безусловно, актуальным, особенно с учетом распространенности атеросклероза и его осложнений в популяции и необходимости разработки эффективных методов их терапии и профилактики.

Цель исследования — выяснение в условиях выраженного атеросклероза состояния экспрессии проангиогенных и антиангиогенных микроРНК, особенностей полиморфизма генов их биогенеза.

Методика

В исследование были включены 65 мужчин, 50 из которых находились на стационарном лечении в кардиологическом отделении ГБУЗ Областной клинической больницы города Твери, и 15 здоровых мужчин.

Сформированы выборки из 3 групп сравнения. В 1-ю группу (контроль) включили 15 здоровых мужчин от 29 до 47 лет, 2-я группа состояла из 30 пациентов, с гипертонической болезнью (ГБ) в возрасте от 29 до 65 лет. Критерии групповой принадлежности: мужской пол и наличие ГБ I—II стадии без систолической дисфункции миокарда левого желудочка [6] и отсутствие на момент обследования диагноза ИБС. В 3-ю группу были включены 20 мужчин, имеющих в анамнезе подтвержденный клинически и лабораторно диагноз ИБС постинфарктный кардиосклероз (ИБС ПИКС) в возрасте от 46 до 84 лет. Критерии исключения: лица, страдающие сахарным диабетом и другими эндокринопатиями, сопутствующими заболеваниями почек, легких, желудочно-кишечного тракта, печени, заболеваниями крови, наследственными болезнями и нарушениями обмена веществ, отягощенным аллергологическим анамнезом, аллергическими заболеваниями и лица, имеющие профессиональные вредности.

У всех обследуемых определяли следующие параметры: показатели общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и рассчитанный по классической формуле коэффициент атерогенности (КА):

$$КА = (ОХС - ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП$$

Генетические исследования были проведены на базе молекулярно-генетической лаборатории ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России. Из цель-

ной крови выделяли геномную ДНК с последующим генотипированием. У всех больных в плазме крови определяли следующие микроРНК: проангиогенные miR-126 и miR-155; антиангиогенные miR-221 и miR-222.

Тотальная РНК, включая микроРНК, была получена комбинированным методом из плазмы крови с помощью набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) и лизирующего реагента TRIzol® LS Reagent (Invitrogen, США) [7, 8].

Для образцов тотальной микроРНК с концентрациями от 25 нг/мкл проводили обратную транскрипцию на четырехканальном амплификаторе «Veriti» («Applied Biosystems», США) для получения комплементарной ДНК (кДНК) с использованием набора TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit («Applied Biosystems», США) по стандартной схеме, представленной производителем.

Далее проводили ПЦР в режиме реального времени по стандартному протоколу, предложенному производителем, с помощью набора Taq Man Small RNA Assays («Applied Biosystems», США) с применением полученной кДНК и праймеров miR-126, 155, 221, 222. В качестве эндогенного контроля использовали праймер RNU6B, результаты амплификации которого использовали для нормировки [9, 10].

Тотальную геномную ДНК выделяли из цельной венозной крови сорбентным методом с использованием набора «Diatom DNA Prep 100» («Лаборатория «Изоген», Россия). В ходе генотипирования определяли однонуклеотидные полиморфизмы генов, участвующих в биогенезе микроРНК, *AGO1*, *DGCR8*, *GEMIN3*, *GEMIN4*, *DROSHA* с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием набора праймеров и аллель-специфических гибридизационных зондов («Applied Biosystems», США). В качестве детектирующего амплификатора использовали систему регистрации ПЦР «ABI Prism 7500» («Applied Biosystems», США).

Математико-статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием табличного процессора Microsoft Excel, системы компьютерной математики и моделирования MATLAB с пакетами расширения *Statistics Toolbox* и *Bioinformatics Toolbox* фирмы Math Works и пакета «SPSS 19.0».

Расчет частот встречаемости гомозигот и гетерозигот проводился путем построения таблицы сопряженности с последующим применением закона Харди—Вайнберга и использованием метода χ^2 с помощью программы DeFinetti, размещенной в свободном доступе на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия). Оценку риска проводили с по-

мощью показателя отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Для расчета количественного изменения микроРНК использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$, предложенный К.Ж. Livak и Т.Д. Schmittgen [11].

$\Delta\Delta Ct$ рассчитывается по формуле:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR} - Ct_{RNU6B})_{\text{опытный образец}} - (Ct_{miR} - Ct_{RNU6B})_{\text{контрольный образец}}$$

где Ct — пороговое значение цикла, полученное в ходе проведения ПЦР, при котором флуоресценция впервые фиксируется значимо выше порогового уровня [12].

Для оценки статистической значимости разности средних в двух группах при нормальном распределении признака для независимых переменных использовался *t*-критерий Стьюдента. При распределении, отличающемся от нормального, проводили попарное сравнение с помощью непараметрического *U*-критерия Манна—Уитни. За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Характеристика показателей липидного метаболизма

При изучении показателей концентрации ОХС и ХС ЛПВП средние значения уровня плазменного ОХС в контрольной группе (1-я гр.) оказались в пределах $3,74 \pm 0,19$ ммоль/л, в группе больных ГБ (2-я гр.) — $5,67 \pm 0,19$ ммоль/л, в группе больных ИБС ПИКС (3-я гр.) — $5,87 \pm 0,18$ ммоль/л. Содержание ХС ЛПВП в плазме крови в 1-й группе составило $1,17 \pm 0,04$ ммоль/л, во 2-й группе — $1,16 \pm 0,04$ ммоль/л, в 3-й группе — $0,92 \pm 0,07$ ммоль/л.

Содержание ОХС в плазме крови оказалось статистически значимо выше в группах больных ГБ и ИБС ПИКС в сравнении с контролем. Также в группе больных ИБС ПИКС было обнаружено статистически значимое снижение концентрации плазменного ХС ЛПВП по сравнению с контрольной группой. Существенных различий содержания ХС ЛПВП между группой контроля и группой больных ГБ обнаружено не было. Вместе с тем, группы пациентов с ГБ и ИБС ПИКС характеризовались высокими значениями коэффициента атерогенности ($КА \geq 4$). Как у больных ГБ, так и у больных ИБС ПИКС наблюдалось статистически значимое повышение данного показателя в сравнении с контролем.

Обобщая вышеизложенное, можно сделать заключение о наличии выраженного манифестирующего атеросклероза у обследованных пациентов, что подтверждается существованием атерогенных расстройств липидного обмена, таких, как гиперхолесте-

ринемия, гипоальфалипотеинемия, высокий показатель КА, а также сформированной артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью, возникшей вследствие расстройств коронарного кровоснабжения.

Изучение полиморфизмов генов AGO1, DGCR8, GEMIN3, GEMIN4, DROSHA. Распределение частот генотипов вышеперечисленных генов в исследуемых выборках соответствовало равновесию Харди—Вайнберга. Статистически значимого различия между частотой встречаемости полиморфизмов генов *AGO1, DGCR8, GEMIN3, DROSHA* и частотой случаев ГБ и ИБС ПИКС у мужчин выявлено не было.

Обнаружена ассоциация между частотой распределения генотипов и аллелей полиморфизма гена *GEMIN4* и частотой развития ГБ. Данные представлены в табл. 1.

Так, носительство аллеля А и генотипа АА в настоящем исследовании увеличивает частоту случаев

ГБ в 3,05 и 5,23 раза. В то же время носители генотипов АС и СС имеют пониженный риск развития ГБ (OR = 0,42 и 0,4), также как и носители аллеля С (OR = 0,33). В связи с этим, генотип АА гена *GEMIN4* можно представить в качестве генотипа риска развития ГБ. Связь между полиморфизмом гена *GEMIN4* и риском развития ИБС ПИКС не установлена.

Таким образом, только частота гомозиготного носительства мажорного аллеля А гена *GEMIN4* в настоящем исследовании коррелирует с частотой случаев развития ГБ. Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что анализ комбинации неблагоприятных генотипов по генам биогенеза микроРНК позволяет выделить среди больных группы с низким, средним и высоким риском развития различных проявлений выраженного атеросклероза.

Показатели уровня экспрессии miR-126, miR-155, miR-221, miR-222. Согласно современ-

Таблица 1

Частота генотипов и аллелей полиморфизма гена *GEMIN4*, ассоциированных с ГБ

Ген	Генотип	Распределение генотипов, n (%)				Критерий различий при df = 1, χ^2 (p)	OR (95% CI)
		Группа контроля, n = 15		Больные ГБ, n = 30			
		n	%	n	%		
<i>GEMIN4</i>	Генотип АА	3	20,0	17	56,7	4,21 (0,040) *	5,23 (1,22-2,45)
	Генотип СС	5	33,3	5	16,7		0,40 (0,09-1,69)
	Генотип АС	7	46,7	8	26,6		0,42 (0,11-1,52)
	Аллель А	0,433		0,700		5,98 (0,014) *	3,05 (1,23-7,57)
	Аллель С	0,567		0,300			0,33 (0,13-0,81)

Примечание. OR — отношение шансов; CI — 95% доверительный интервал; * — статистическая значимость различий (p<0,05).

Таблица 2

Показатели уровня экспрессии miR-126, 155, 221, 222 у больных ГБ и ИБС ПИКС

Исследуемая группа	ΔCt (M ± m)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
miR-126			
Больные ГБ (n = 30)	-9,71 ± 0,74	-8,00	256,00
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-9,77 ± 0,92	-8,06	266,87
miR-155			
Больные ГБ (n = 30)	-4,23 ± 0,61	-1,20	2,29
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-5,02 ± 0,94	-1,90	3,73
miR-221			
Больные ГБ (n = 30)	-8,54 ± 0,98	-7,61	195,36
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-8,96 ± 1,13	-8,03	261,38
miR-222			
Больные ГБ (n = 30)	-7,81 ± 0,59	-7,74	213,78
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-7,69 ± 0,81	-7,62	196,72

Примечание. $\Delta Ct = (Ct_{miR} - Ct_{RNU6B})$, $\Delta\Delta Ct$ — разность между значениями ΔCt исследуемого образца и контрольного; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ — формула для подсчета уровня экспрессии исследуемой микроРНК.

ным представлениям, изменение уровня экспрессии только одной микроРНК не может быть надежным индикатором развития патологического состояния организма. Только изменение уровня экспрессии сразу нескольких микроРНК может иметь значение в диагностике заболеваний [13]. В табл. 2 приведены уровни экспрессии изучаемых микроРНК.

Так, у больных ГБ уровень экспрессии проангиогенной miR-126 оказался в 256 раз выше по сравнению с контролем, а у больных ИБС ПИКС этот показатель оказался выше почти в 267 раз. Прямые доказательства участия данной микроРНК в патогенезе ССЗ в литературе отсутствуют, хотя, по данным некоторых авторов, miR-126 может играть важную роль в сосудистой патологии и процессах внутрисосудистого ремоделирования [13—15]. Уровень проангиогенной miR-155 в плазме крови остается неизменным как в группе ГБ, так и у больных ИБС ПИКС.

В то же время, было установлено, что уровень экспрессии антиангиогенной miR-221 оказался в 195 раз выше у больных ГБ и в 261 раз выше у больных ИБС ПИКС по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. Статистическая значимость оценки результатов данного исследования согласуется с рядом данных литературы, указывающих, что уровень miR-221 повышается в интиме после повреждения стенки сосуда, а также участвует в подавлении пролиферации эндотелиальных клеток и процессах ангиогенеза [16, 17]. Уровень экспрессии антиангиогенной miR-222 увеличивается в 213 раз у больных ГБ и в 196 раз у больных ИБС ПИКС по сравнению с используемыми нами контрольными данными. Следует отметить, что роль miR-222 в патологии сердечно-сосудистой системы в литературе не обозначена. Соответствующей информации в доступной нам литературе обнаружено не было.

Проведение попарного сравнения показателей ΔCt контрольной группы с группами ГБ и ИБС ПИКС с помощью U-критерия Манна—Уитни подтверждает правильность сделанных выводов о значимой роли miR-126, miR-221, miR-222 в патогенезе атеросклероза и его осложнений.

Так, согласно данным проведенных нами исследований, обнаружено, что уровни экспрессии miR-126, miR-221, miR-222 у больных ГБ и ИБС ПИКС статистически значимо превышают аналогичные показатели контрольной группы здоровых людей. С другой стороны, статистически значимого изменения уровня экспрессии miR-155 в настоящем исследовании выделено не было (табл. 3).

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что уровни экспрессии проангиогенных miR-126, и антиангиогенных miR-221, miR-222 у больных ГБ и ИБС ПИКС статистически значимо превышают аналогичные показатели контрольной группы. С другой стороны, изменение уровня экспрессии miR-155 не удалось ассоциировать с изученными нами заболеваниями, что, возможно, указывает на отсутствие выраженной роли miR-155 в патогенезе атеросклероза.

Качественные характеристики miR-126, miR-155, miR-221, miR-222. Для определения взаимосвязей между изучаемыми микроРНК в исследуемых группах был проведен корреляционный анализ Спирмена и рассчитан коэффициент ковариации [18].

В качестве специфического интегрального портрета исследуемых групп, отражающего взаимосвязи микроРНК в пределах выборки, использовалась ковариационная матрица, полученная при сведении в единую таблицу коэффициентов ковариации.

Ниже приведены интегральные портреты исследуемых групп (рис. 1—3).

Анализ интегрального портрета контрольной группы здоровых людей (рис. 1) позволяет заключить, что доминирующая роль в этой группе отводится экспрессии проангиогенной miR-126.

На рис. 2 изображен интегральный портрет группы больных ГБ, при анализе которого можно сделать вывод, что в изучаемой группе доминирующее положение занимает антиангиогенная miR-221.

При анализе данных, представленных на рис. 3, отражающего интегральный портрет группы больных

Таблица 3

Сравнение показателей ΔCt в контрольной группе, у больных ГБ и ИБС ПИКС с помощью U-критерия Манна—Уитни ($M \pm \delta$)

Показатель	Группа контроля (n = 15)	Больные ГБ (n = 30)	Больные ИБС ПИКС (n = 20)
$\Delta Ct_{miR-126}$	-1,71 \pm 3,37	-9,71 \pm 4,03*	-9,77 \pm 4,10**
$\Delta Ct_{miR-155}$	-3,12 \pm 1,33	-4,23 \pm 3,36	-5,02 \pm 4,22
$\Delta Ct_{miR-221}$	-0,93 \pm 2,47	-8,54 \pm 5,36*	-8,96 \pm 5,07**
$\Delta Ct_{miR-222}$	-0,07 \pm 2,73	-7,81 \pm 3,24 *	-7,69 \pm 3,63**

Примечание. * — статистическая значимость различий ($p < 0,001$) между группой больных ГБ и контрольной; ** — статистическая значимость различий ($p < 0,001$) между группой больных ИБС ПИКС и контрольной.

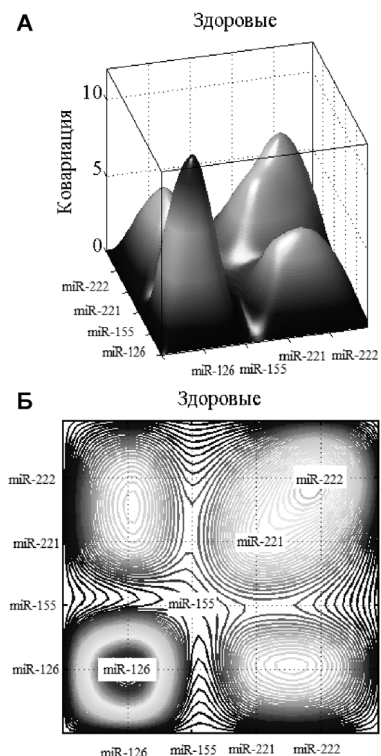


Рис. 1. Портрет группы контроля: А — объёмная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; Б — линии одинакового уровня.

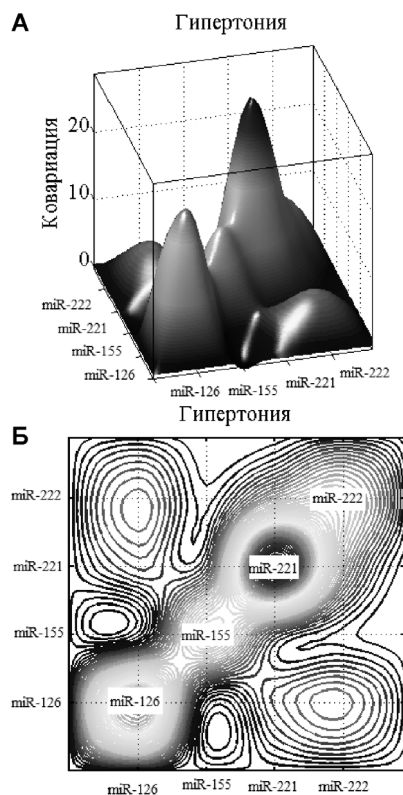


Рис. 2. Портрет группы больных ГБ: А — объёмная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; Б — линии одинакового уровня.

ИБС ПИКС, можно заключить, что в этой группе в спектре изучаемых микроРНК, доминирует антиангиогенная miR-221.

Таким образом, сравнение интегральных портретов исследуемых групп (рис. 1—3), отражающих взаимосвязи микроРНК, позволяет сделать вывод о доминировании в контроле проангиогенной miR-126, а в группах больных ГБ и ИБС ПИКС — антиангиогенной miR-221. Для подтверждения характера изменчивости спектра микроРНК, входящих в состав выборки группы пациентов, была рассчитана дисперсия. На рис. 4 в обобщенном виде показано распределение дисперсии микроРНК по группам пациентов.

Можно предположить, что преобладание экспрессии miR-126 в группе здоровых людей связано с ее постоянным и стабильным влиянием в физиологических условиях на процесс пролиферации эндотелиоцитов [15, 16]. Доминирование антиангиогенной miR-221 у больных ГБ и ИБС ПИКС, по-видимому, может рассматриваться как ответная реакция в ответ на атероматозную альтерацию интимы артерий при ГБ и ИБС ПИКС. На данный факт указывают и другие авторы [16, 17]. В то же время антиангиогенная miR-222 занимает последнее место в спектре доминирования исследуемых микроРНК у больных ГБ и ИБС ПИКС, что вступает в определенное противоречие с проведенными нами рассуждениями патофизиологического характера. Тем не менее, выявление в настоящем исследовании различий в экспрессионной иерархии различных микроРНК в норме и в условиях атерогенеза имеет, безусловно, патофизиологическую перспективу в изучении молекулярных основ развития атеросклероза и его осложнений.

Таким образом, в условиях прогрессирующего атеросклероза у человека существенно изменяются количественные и качественные параметры соотношения микроРНК в плазме крови. При изучении проангиогенных микроРНК в плазме крови при ГБ и ИБС ПИКС повышается уровень miR-126. При этом значительно возрастает содержание и антиангиогенных плазменных микроРНК — miR-221 и miR-222, что свидетельствует о проявлении одного из компенсаторно-приспособительных механизмов при атеросклерозе у человека. В группе здоровых людей установлено преобладание среди плазменных микроРНК проангиогенной miR-126. В то же время в условиях атерогенеза у человека выявлено доминирование антиангиогенной miR-221, что подтверждает долговременное включение защитных сосудистых реакций при атеросклерозе. При изучении полиморфизмов генов, регулирующих биогенез микроРНК, выявлено существование статистически значимых ассоциаций между частотой гомозиготного носительства

мажорного аллеля А гена *GEMIN4* и частотой встречаемости ГБ, ведущего фактора развития атеросклероза. Статистически значимой корреляции между полиморфизмами других генов биогенеза микроРНК, а именно *AGO1*, *DGCR8*, *GEMIN3*, *DROSHA* и частотой ГБ и ИБС ПИКС не установлено.

Полученные результаты обосновывают представление о патофизиологической роли ряда компонентов молекулярно-генетического аппарата человека, а, именно, miR-126, miR-221, miR-222 и полиморфизма гена их биогенеза *GEMIN4* в стадии выраженного атеросклероза.

References

1. Koryagina N.A., Petrishchev A.V. The possibility of using anti-sclerotic therapy in clinical practice. *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2012; 4: 31-5. (in Russian)
2. Torshin I.Yu., Gromova O.A. Cardiovascular disease, vascular brain disorders and molecular genes. Association studies and the pathophysiology of cardiovascular disease. *Trudnyy patsient*. 2008; 2-3: 15-9. (in Russian)
3. Fasarano P., Greco S., Ivan M. et al. MicroRNA: Emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 125: 92-104.
4. Stather P.W., Sylvius N., Wild J.B. et al. Differential MicroRNA Expression Profiles in Peripheral Arterial Disease. 2013; 6(5): 490-7.
5. Stefano V.D., Zaccagnini G., Capogrossi M.C., Martelli F. MicroRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*. 2011; 55: 111-8.
6. Chazova I.E., Ratova L.G., Boytsov S.A. Diagnosis and treatment of hypertension (Recommendations of the Russian Medical Society for Arterial Hypertension and the Russian Society of Cardiology). *Sistemnye gipertenzii*. 2010; 3: 5-27. (in Russian)
7. Keller A., Leidinger P., Gislesfoss R. et al. Stable serum miRNA profiles as potential tool for non-invasive lung cancer diagnosis. *RNA Biology*. 2011; 8(3): 506-16.
8. Shah A.A., Leidinger P., Keller A. MiRNA expression patterns in *Tff2* knock-out mice correlate with cellular pathways of neoplastic development and caloric metabolism. *Int. J. Mol. Med*. 2012; 29(4): 637-43.
9. Lamba V., Ghodke-Puranik Y., Guan W., Lamba J.K. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Research Notes*. 2014; 7:129.
10. Song J., Bai Z. Identification of Suitable Reference Genes for qPCR Analysis of Serum microRNA in Gastric Cancer Patients. 2012; 57(4): 897-904.
11. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.
12. Navidshad B., Liang J.B., Jahromi M.F. Correlation Coefficients Between Different Methods of Expressing Bacterial Quantification Using Real Time PCR. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13: 2119-132.
13. Hu J., Zeng L., Huang J. et al. MiR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion

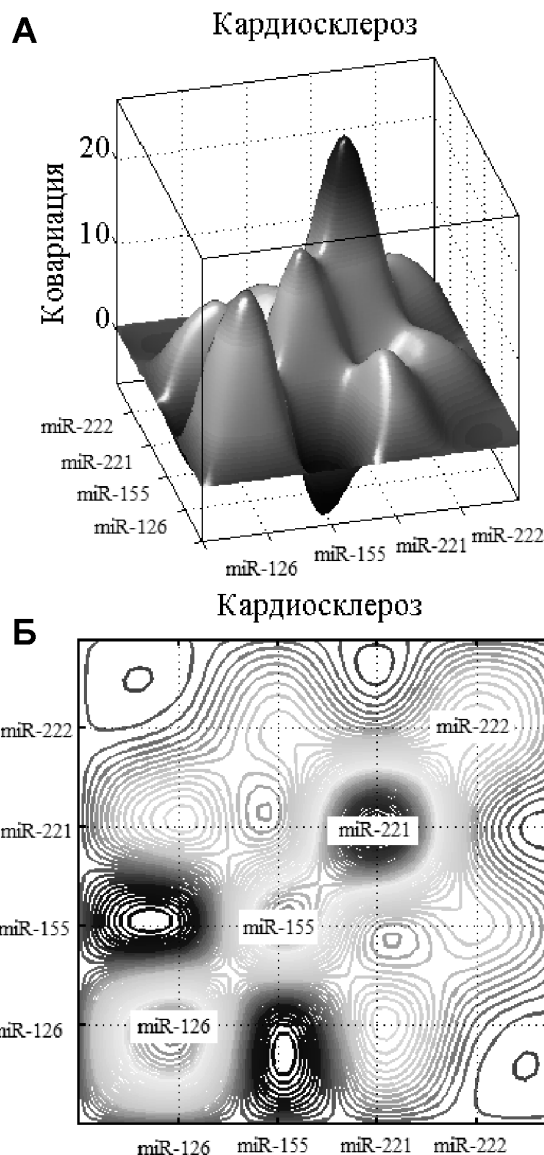


Рис. 3. Портрет группы больных ИБС ПИКС: А – объемная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; Б – линии одинакового уровня.

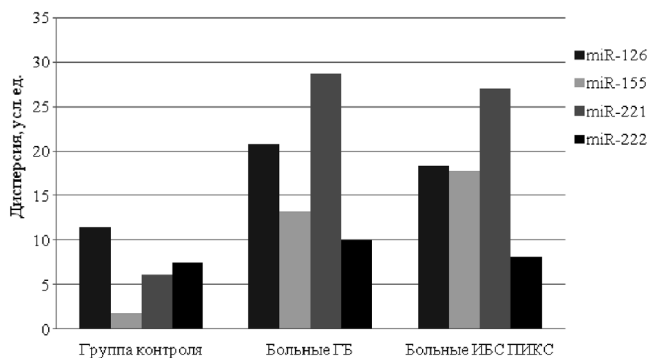


Рис. 4. Распределение дисперсии микроРНК в группах контроля и больных ГБ и ИБС ПИКС.

spinal cord injury in rats. *Brain Research*. 2015; 1608: 191-202.

14. Hulsmans M., Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovascular Research*. 2013; 100: 7-18.

15. Jiang Y., Wang H., Cao H. et al. Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular diseases. *Sci. Rep.* 2014; 4: 5026.

16. Leung A., Trac C., Jin W. et al. Novel Long Non-Coding RNAs Are Regulated by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 2013; 113(3): 266-78.

17. Staszal T., Zapała B., Polus A. et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2011; 121(10): 361-7.

18. Soshnikova L.A., Tomashevich V.N. Multivariate statistical analysis. [*Mnogomernyy statisticheskiy analiz*]. Moscow: YuNTI-DANA; 1999. (in Russian)

Сведения об авторах:

Калинкин Михаил Николаевич, доктор мед. наук, проф., зав. кафедрой патологической физиологии

© Коллектив авторов, 2017

УДК 612.146.3: 616.151.4-073.213: 599.323.45

Алиев О.И., Анищенко А.М., Сидехменова А.В., Шаманаев А.Ю.,
Чернышева Г.А., Плотников М.Б.

Гемореологические показатели у крыс SHR в периоды возрастания и стабильно высокого артериального давления

НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, 634028, г. Томск, пр. Ленина, д. 3

Цель исследования — изучить гемореологические параметры и их взаимосвязь в периоды возрастания и стабильно высокого артериального давления (АД) у крыс линии SHR. **Методика.** Эксперименты проведены на 30 крысах линии Wistar-Kyoto (WKY) и 40 крысах линии со спонтанной гипертензией (SHR). Гемореологические параметры (вязкость цельной крови и плазмы, гематокрит, концентрация плазменного фибриногена, агрегация и деформируемость эритроцитов) были изучены у крыс линии SHR в период возрастания (7—8 нед.) и период стабильно высокого (16—17 нед.) АД в сравнении с нормотензивными крысами того же возраста. **Результаты.** Проведенные исследования показали, что в период развития артериальной гипертензии (возраст 7—8 нед.) у крыс линии SHR по сравнению с крысами линии WKY, наблюдается повышенная вязкость крови за счет возрастания величины гематокрита. В период стабильно высокого артериального давления (возраст 16—17 нед.) у крыс линии SHR вязкость крови выше, чем у крыс линии WKY, за счет повышенного гематокрита и эритроцитарной гиперагрегации. **Заключение.** Усиление агрегации эритроцитов у крыс линии SHR при отсутствии различий в содержании фибриногена с крысами линии WKY, позволяет предполагать, что это может быть результатом изменения структуры эритроцитарных мембран. Анализ динамики и корреляционных взаимосвязей гемореологических параметров у крыс линии SHR в периоды возрастания и стабильно высокого артериального давления указывают на участие реологических свойств крови в процессе формирования артериальной гипертензии.

Ключевые слова: артериальная гипертензия; SHR; WKY; вязкость крови; агрегация эритроцитов.

Для цитирования: Алиев О.И., Анищенко А.М., Сидехменова А.В., Шаманаев А.Ю., Чернышева Г.А., Плотников М.Б. Гемореологические показатели у крыс SHR в периоды возрастания и стабильно высокого артериального давления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 51—57.

Для корреспонденции: Плотников Марк Борисович, доктор биол. наук, проф., заведующий отделом фармакологии НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, e-mail: mbr2001@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-25-00017).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.05.2016

Aliev O.I., Anishhenko A.M., Sidehmenova A.V., Shamanaev A.Y., Chernysheva G.A., Plotnikov M.B.

Hemoreological parameters in spontaneously hypertensive rats during the stages of increasing and stable blood pressure

Research Institute of Pharmacology named after E.D. Goldberg, Tomsk NSMC, Tomsk, Lenina av., 3, 634028, Russia

The purpose was to study hemoreological parameters and their correlations with the blood pressure (BP) in SHR rats at the periods of increasing and stable high BP as compared to normotensive rats WKY. **Methods.** The experiments were carried out on 30 Wistar-Kyoto (WKY) and 40 spontaneously hypertensive rats (SHRs). During (7—8 week) and after (16—17 week) the increasing of the blood pressure, hemoreological parameters (blood and plasma viscosity, hematocrit, plasma fibrinogen concentration, RBC aggregation and deformability) were measured in SHRs and were compared to normotensive rats. **Results.** It was shown that during the increasing of the blood pressure (7—8 week) SHRs have increased blood viscosity due to the high hematocrit values. At the stable stages (16—17 week) SHRs also have increased blood viscosity and high hematocrit values, but moreover RBC hyperaggregation was observed. **Conclusion.** Enhancement of RBC aggregation in SHR rats with no difference in fibrinogen rats supposes that it may be the result of changes in the structure of erythrocyte membranes. Analysis of the dynamics and the correlation relationships between hemoreological parameters and blood pressure in SHRs shows the magnitude of the hemoreological parameters in the pathogenesis of arterial hypertension.

Keywords: arterial hypertension; SHR; WKY; blood viscosity; erythrocyte aggregation.

For citation: Aliev O.I., Anishhenko A.M., Sidehmenova A.V., Shamanaev A.Y., Chernysheva G.A., Plotnikov M.B. Hemoreological parameters in spontaneously hypertensive rats during the stages of increasing and stable blood pressure. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(1): 51–57. (in Russ.).

For correspondence: Mark B. Plotnikov, DSc., Professor, Head, Department of Pharmacology, Research Institute of Pharmacology named after E.D. Goldberg, Tomsk NSMC, 3 Lenin St., Tomsk 634028, Russia, e-mail: mbp2001@mail.ru

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

Funding. This study was conducted with the financial support of the Russian Science Foundation (project N 14-25-00017).

Information about authors:

Aliev O.I. [http:// orcid.org/0000-0001-9788-1235](http://orcid.org/0000-0001-9788-1235)

Anishhenko A.M. [http://orcid.org/ 0000-0002-8377-4129](http://orcid.org/0000-0002-8377-4129)

Sidehmenova A.V. <http://orcid.org/0000-0003-3171-667X>

Shamanaev A.Y. <http://orcid.org/0000-0003-2348-1444>

Chernysheva G.A. <http://orcid.org/0000-0002-6438-5734>

Plotnikov M.B. <http://orcid.org/0000-0003-2348-1444>

Received 25.05.2016

Введение

Реологические свойства крови — одна из детерминант, определяющих величину кровотока на различных уровнях. Вязкость крови на системном уровне является компонентом периферического сопротивления [1]. Изменение напряжения сдвига на стенке артерий, запускает механизм эндотелийзависимой вазодилатации [2]. Агрегация и деформируемость эритроцитов играют значимую роль на микроциркуляторном уровне [3, 4]. В настоящее время вовлеченность изменений реологических свойств крови в патогенез ряда сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе и артериальной гипертензии, не вызывает сомнения [5, 6]. В большом количестве исследований показано наличие сдвигов гемореологических параметров как при артериальной гипертензии у человека, так и на различных экспериментальных моделях артериальной гипертензии у животных [7, 8]. Вместе с тем, вопрос о том, что нарушения реологических свойств крови являются следствием повышенного артериального давления или, наоборот, являются одной из причин формирования гипертензии остается нерешенным [9—11]. Подходом к решению данной задачи может быть исследование реологических свойств крови в различные периоды развития артериальной гипертензии.

Цель работы — исследование гемореологических параметров и их взаимосвязи на стадии возрастания артериального давления (АД) и на стадии стабильно высокого АД на модели спонтанной артериальной гипертензии у крыс.

Методика

Эксперименты проведены на животных категории SPF: 30 нормотензивных крысах самцах линии Wistar-Kyoto (WKY) и 40 крысах самцах линии SHR со спонтанной гипертензией (spontaneously hypertensive rats), полученных из вивария ИБХ РАН, г.Пушино. В виварии НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга животные содержались в неполной барьерной системе при следующих параметрах окружающей среды: температура — 20—24°C, относительная влажность — 50 ± 20%, воздухообмен 12—15 объемов помещения в час, световой режим — 12:12 ч. Содержание животных и уход за ними осуществлялись в соответствии с правилами, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Протокол исследования утвержден комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол № 93062015).

Гемореологические параметры у крыс оценивали в возрасте 7—8 нед. (15 животных линии WKY массой 165 ± 10 г и 20 животных линии SHR массой 156 ± 2 г) и в возрасте 16—17 нед. (15 животных линии WKY массой 326 ± 5 г и 20 животных линии SHR массой 296 ± 8 г). У крыс линии SHR возраст 7—8 нед. приходится на период возрастания АД, а возраст 16—17 нед. — на период стабильно высокого АД.

У бодрствующих крыс АД определяли у корня хвоста с помощью блока неинвазивного измерения

артериального давления у мелких животных NIBP200A («Biopac Systems, Inc.», США), соединенного с высокоскоростной системой сбора данных MP150 («Biopac Systems, Inc.», США). Запись и обработка данных производилась на компьютере с помощью программы «AcqKnowledge 4.2 for MP150». Все манипуляции с животными выполняли в утренние часы. Перед началом исследования крыс несколько раз помещали в удерживающую камеру, чтобы адаптировать их к экспериментальным процедурам. Измерение АД проводили при постоянной температуре (32°C), для чего использовали блок для подогрева животных TAILHEAT.

Для оценки гемореологических параметров пробы крови в объеме 2,5 мл забирали у наркотизированных крыс (тиопентал натрий, 80 мг/кг) из левой общей сонной артерии. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Вязкость цельной крови измеряли на ротационном вискозиметре Brookfield DV-II+Pro с системой «конус/плоскость» при температуре 36°C в диапазоне скоростей сдвига от 15 до 450 с⁻¹, вязкость плазмы — при скорости сдвига 450 с⁻¹. Гематокрит определяли методом центрифугирования в стеклянных капиллярах (центрифуга РС-6, 2000 об./мин, время центрифугирования 15 мин) и выражали в процентах. Концентрацию фибриногена в плазме оценивали методом тромбообразования Клауса с использованием набора реагентов для определения концентрации фибриногена «Фибриноген-тест» на гемокоагулометре «Cormay KG-4». Агрегацию и деформируемость эритроцитов исследовали на анализаторе RheoScan-AnD 300. Агрегацию эритроцитов оценивали методом силектометрии [12], деформируемость эритроцитов — методом эктацитометрии в диапазоне напряжений сдвига 1—20 Па [13]. После забора крови животных умерщвляли дополнительным введением наркозного средства.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Statistica 8.0». Рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку

среднего значения. Межгрупповые различия оценивали с использованием непараметрических тестов Краскела—Уоллиса и Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Взаимосвязь параметров оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона (r).

Результаты и обсуждение

У крыс SHR в возрасте 7—8 недель средние значения систолического АД превышали значения аналогичных показателей у крыс WKY на 19% (табл. 1).

В период возрастания АД у крыс SHR вязкость цельной крови в диапазоне скоростей сдвига 15—450 с⁻¹ изменялась от $6,05 \pm 0,17$ до $3,53 \pm 0,05$ мПа·с, что статистически значимо выше по сравнению со значениями у крыс линии WKY аналогичного возраста, у которых вязкость крови в диапазоне скоростей сдвига 15—450 с⁻¹ изменялась от $4,88 \pm 0,21$ до $3,33 \pm 0,07$ мПа·с (рис. 1, А).

В возрасте 7—8 нед. у крыс линии SHR гематокрит был статистически значимо выше по сравнению с величиной показателя ($43 \pm 1\%$) у животных линии WKY (табл. 1). У крыс линий SHR и WKY (7—8 нед.) значения вязкости плазмы и фибриногена соответственно статистически значимо между собой не различались (табл. 1). Полупериод агрегации эритроцитов и агрегационный индекс у крыс линии SHR статистически значимо не отличается от аналогичных значений крыс линии WKY (рис. 2). Индекс элонгации эритроцитов в группе гипертензивных животных изменялся в диапазоне напряжений сдвига 1—20 Па и статистически значимо не отличался от соответствующих значений у нормотензивной линии животных (табл. 2).

Таким образом, в период развития артериальной гипертензии у крыс линии SHR по сравнению с крысами линии WKY, наблюдается повышенная вязкость крови за счет возрастания величины гематокрита.

Таблица 1

Систолическое артериальное давление (САД), гематокрит, вязкость плазмы и содержание фибриногена в плазме у крыс линии SHR в периоды возрастания (возраст 7—8 нед.) и стабильно высокого артериального давления (возраст 16—17 нед.) и у нормотензивных крыс линии WKY соответствующего возраста

Возраст	Группа	САД, мм рт.ст.	Гематокрит, %	Вязкость плазмы, мПа·с	Фибриноген, г/л
7—8 нед.	WKY	133 ± 5	43 ± 1	1,00 ± 0,01	1,80 ± 0,08
	SHR	158 ± 4*	46 ± 1*	1,01 ± 0,01	1,76 ± 0,07
16—18 нед.	WKY	125 ± 4	46 ± 1 ⁺	1,04 ± 0,01 ⁺	1,87 ± 0,09
	SHR	188 ± 5**	48 ± 1**	1,04 ± 0,01 ⁺	1,94 ± 0,14

Примечание. * — статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению со значениями у крыс линии WKY соответствующего возраста; ⁺ — статистически значимое ($p < 0,05$) по сравнению со значениями у крыс в возрасте 7—8 нед.

Таблица 2

Индекс элонгации эритроцитов при различных напряжениях сдвига у крыс линии SHR в периоды возрастания (возраст 7—8 нед.) и стабильно высокого артериального давления (возраст 16—17 нед.) и у нормотензивных крыс линии WKY соответствующего возраста

Возраст	Группа	Напряжение сдвига, Па				
		1	3	7	10	20
7—8 нед.	WKY	0,226 ± 0,006	0,370 ± 0,004	0,465 ± 0,003	0,498 ± 0,001	0,537 ± 0,002
	SHR	0,216 ± 0,005	0,368 ± 0,003	0,456 ± 0,003	0,487 ± 0,003	0,535 ± 0,003
16—18 нед.	WKY	0,207 ± 0,004 ⁺	0,352 ± 0,003 ⁺	0,442 ± 0,003 ⁺	0,472 ± 0,002 ⁺	0,516 ± 0,003 ⁺
	SHR	0,203 ± 0,006 ⁺	0,347 ± 0,003 ⁺	0,441 ± 0,002 ⁺	0,473 ± 0,002 ⁺	0,520 ± 0,002 ⁺

Примечание. ⁺ — статистически значимое различие (p<0,05) по сравнению со значениями у крыс в возрасте 7—8 нед.

У крыс SHR в возрасте 16—17 нед. систолическое АД было выше на 50%, чем у крыс WKY.

В период стабильно высокого АД у крыс SHR вязкость цельной крови в диапазоне скоростей сдвига 15—450 с⁻¹ была статистически значимо выше (на 15—19%) как по сравнению с линией крыс WKY аналогичного возраста, так и на 12—16% по сравнению с крысами линии SHR в возрасте 7—8 нед. У крыс линии WKY величина вязкости крови в возрасте 16—17 нед. была также статистически значимо выше (на 7—16%) по сравнению с периодом 7—8 нед. (рис. 1, Б).

У крыс линии SHR, как и у крыс линии WKY с возрастом наблюдалось статистически значимое увеличение гематокрита. К 16-й—18-й нед. жизни у крыс линии SHR гематокрит был статистически значимо выше по сравнению с величиной показателя у животных линии WKY аналогичного возраста (табл. 1). У крыс линий SHR и WKY значения вязкости плазмы значимо не различались (табл. 1), содержание фибриногена в плазме статистически значимо между собой также не различались. Полу период агрегации эритроцитов и агрегационный индекс у крыс линии SHR в возрасте 16—17 нед. статистически значимо отличались как от величин показателей

у крыс линии WKY соответствующего возраста, так и от значений у крыс SHR в период возрастания АД. Данные свидетельствуют об усилении агрегации эритроцитов (рис. 2).

Индекс элонгации эритроцитов в группе гипертензивных животных в возрасте 16—18 нед. в диапазоне напряжений сдвига 1—20 Па значимо не отличался от соответствующих значений у нормотензивной линии животных (табл. 2). Индекс элонгации эритроцитов у крыс линий SHR и WKY в возрасте 16—17 нед. во всем исследованном диапазоне скоростей сдвига был статистически значимо ниже по сравнению с аналогичными значениями в возрасте 7—8 нед. (табл. 2).

Таким образом, к 16-й — 18-й нед. как у крыс линии WKY, так и у линии SHR произошло изменение величины ряда гемореологических параметров по сравнению с 7—8 нед. жизни. Наблюдался рост гематокрита, вязкости плазмы, снижение индекса элонгации эритроцитов и соответственно увеличение вязкости крови во всем диапазоне исследованных скоростей сдвига. В период стабильно высокого АД у крыс линии SHR вязкость крови выше, чем у крыс линии WKY, за счет повышенного гематокрита и эритроцитарной гиперагрегации. Усиление агрегации эритро-

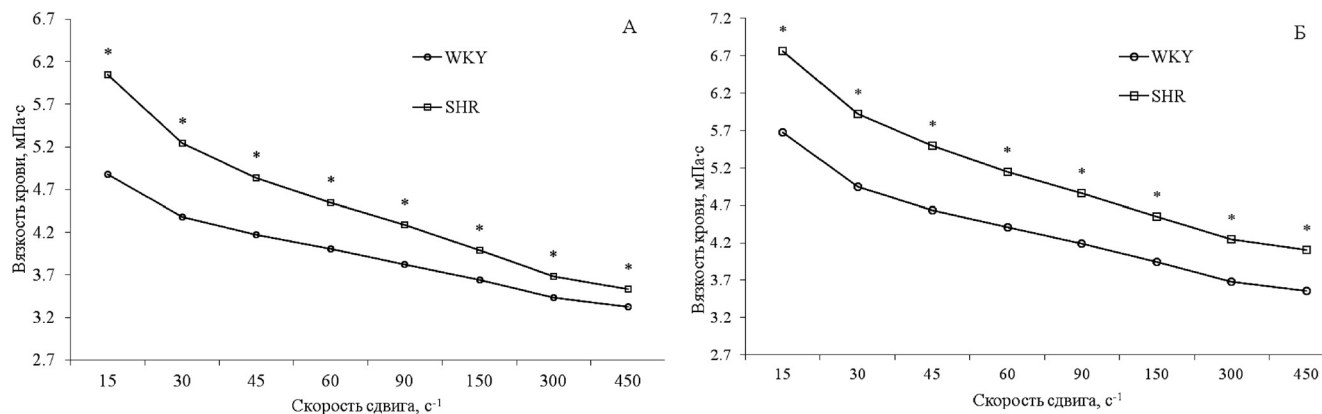


Рис. 1. Вязкость цельной крови у крыс SHR и WKY в возрасте 7—8 нед. в период возрастания артериального давления (А) и в период стабильно высокого артериального давления (Б).

цитов у крыс линии SHR при отсутствии различий в содержании фибриногена с крысами линии WKY, позволяет предполагать, что это может быть результатом изменения структуры эритроцитарных мембран.

Полученные данные показали наличие значимого различия гемореологических параметров в четырех сформированных группах исследования. Эти различия были связаны как с возрастом, так и с принадлежностью к линии гипертензивных или нормотензивных животных. На этапе возрастания АД у крыс линии SHR повышенный гематокрит вполне закономерно приводил к более высоким значениям вязкости крови. Увеличение гематокрита является характерным для линии SHR и наблюдается еще в период до значимого повышения АД по сравнению с нормотензивными линиями крыс [14]. Несмотря на то, что другие гемореологические параметры нормотензивных и гипертензивных крыс в данный период не различались, характер корреляционных взаимосвязей вязкости крови с параметрами, ее определяющими внутри каждой из линий крыс существенно отличался. У крыс линии WKY статистически значимая положительная корреляция средней силы выявлена только между вязкостью крови в диапазоне скоростей сдвига $45\text{--}90\text{ с}^{-1}$ и гематокритом ($r = +0,52\text{--}+0,54$, $p < 0,05$). Значимые взаимосвязи вязкости крови с другими гемореологическими параметрами отсутствовали. У крыс линии SHR, вязкость крови во всем исследованном диапазоне скоростей сдвига значимо коррелировала с гематокритом ($r = +0,64\text{--}+0,80$, $p < 0,05$). Кроме того, была выявлена положительная корреляция средней и высокой силы ($r = +0,56\text{--}+0,84$, $p < 0,05$) между индексом элонгации эритроцитов при напряжениях сдвига $3\text{--}20\text{ Па}$ и вязкостью крови во всем исследованном диапазоне. На

первый взгляд, данный положительный коэффициент корреляции представляется «аномальным», так как более высокой деформируемости эритроцитов должны соответствовать сниженные значения вязкости крови. Однако вязкость крови является интегральным показателем вклада различных факторов (гематокрит, вязкость плазмы, содержание фибриногена, агрегация и деформируемость эритроцитов), изменяться которые могут как независимо друг от друга, так и взаимосвязано, влияя в различном направлении и в разной степени. В данном случае, вероятно, чем выше гематокрит у животного, тем больше молодых форм эритроцитов с улучшенной деформируемостью [15, 16], что отражается в конечном итоге, в подобной картине корреляционных взаимосвязей. На данном этапе у крыс SHR повышение гематокрита можно рассматривать как типичную компенсаторную реакцию на тканевую гипоксию, однако это ведет к повышению вязкости крови и еще большему увеличению периферического сопротивления.

К 16—17 нед. жизни картина корреляционных связей между вязкостью крови и факторами, ее определяющими менялась как у нормотензивных, так и гипертензивных крыс. Так, у крыс линии WKY наблюдалась закономерная взаимосвязь вязкости крови на низких скоростях сдвига ($15\text{--}90\text{ с}^{-1}$) и показателями, характеризующими агрегационную активность эритроцитов. Вязкость крови коррелировала как с полупериодом агрегации эритроцитов ($r = -0,52\text{--}-0,54$, $p < 0,05$), так и с индексом агрегации ($r = +0,55\text{--}+0,64$, $p < 0,05$). У крыс линии SHR в период стабильно высокого АД, так же, как и в период возрастания АД, сохранялась высокая корреляция между вязкостью крови во всем исследованном диапазоне скоростей сдвига и гематокритом ($r = +0,68\text{--}+0,91$, $p < 0,05$). При этом исчезала

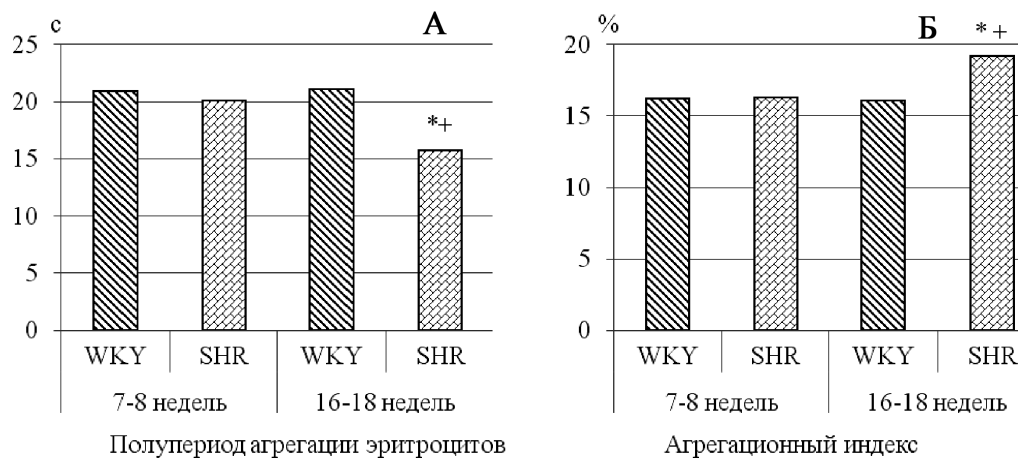


Рис. 2. Полупериод агрегации эритроцитов (А) и агрегационный индекс (Б) у крыс SHR и WKY в периоды возрастания АД и стабилизации высокого АД.

взаимосвязь вязкости крови и индекса элонгации эритроцитов. Корреляционные взаимосвязи показателей эритроцитарной агрегации с вязкостью крови у крыс SHR в период стабильно высокого АД отличались как качественно, так и количественно от нормотензивных крыс соответствующего возраста. Наблюдалась отрицательная корреляция высокой силы между вязкостью крови в области низких скоростей сдвига и полупериодом агрегации эритроцитов ($r = -0,72$ — $-0,79$, $p < 0,05$). Наряду с этим вязкость крови и в области высоких скоростей сдвига (150 — 450 c^{-1}) также коррелировала с полупериодом агрегации эритроцитов ($r = -0,59$ — $-0,71$, $p < 0,05$). У агрегационного индекса выявлена слабая корреляция с вязкостью крови в диапазоне скоростей сдвига 300 — 450 c^{-1} ($r = +0,45$ — $+0,48$, $p < 0,05$) и корреляция средней силы ($r = +0,59$ — $+0,75$, $p < 0,05$) с вязкостью крови в диапазоне 150 — 450 c^{-1} . О повышении агрегации эритроцитов при артериальной гипертензии известно достаточно давно [17]. Известно также, что для разрушения эритроцитарных агрегатов достаточно невысоких сдвиговых напряжений [18]. Однако полученные данные показывают, что в период стабильно высокого АД агрегация эритроцитов связана с вязкостью крови на таких скоростях сдвига, которые характерны для резистивных сосудов (артерий и артериол) и, следовательно, может вносить определенный вклад в общее периферическое сопротивление.

Заключение

Среди ряда механизмов, участвующих в развитии и течении артериальной гипертензии, основное внимание уделяют общему периферическому сопротивлению сосудов и сердечному выбросу [19]. Эти показатели являются главными мишенями основных классов антигипертензивных средств (блокаторы кальциевых каналов, бета-блокаторы, альфа-блокаторы и др.). Вместе с тем, кровоток в сосудах зависит не только от их тонуса, но и от вязкости крови [20]. Проведенные исследования динамики и взаимосвязи гемореологических параметров у крыс линии SHR в периоды возрастания и стабильно высокого АД позволяют говорить о вовлечении факторов, влияющих на реологические свойства крови в процесс формирования артериальной гипертензии. Одним из существенных, в этом отношении, гемореологических параметров является гематокрит. У крыс SHR гематокрит повышен как в период возрастания, так и в период стабильно высокого АД. Вне зависимости от того, компенсаторная это реакция на раннюю тканевую гипоксию или генетическая особенность присущая данной линии, эти изменения приводят к увеличению вязкости крови

и как следствие, повышению периферического сопротивления. В период стабильно высокого АД наряду с гематокритом возрастает и агрегация эритроцитов, вызывая еще большее увеличение вязкости крови. Сдвиги гемореологических параметров происходят не одновременно, а формируются в течение всего периода развития артериальной гипертензии, что указывает на значимость их участия в процессах компенсации и декомпенсации кровообращения.

References

1. Lowe G.D. Blood rheology in arterial disease. *Clinical Science*. 1986; 71(2): 137-46.
2. Rush J.W.E., Ford R.J. Nitric oxide, oxidative stress and vascular endothelium in health and hypertension. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2007; 37(1-2): 187-92.
3. Cicco G., Carbonara M.C.; Stingi G.D., Pirrelli A. Cytosolic calcium and hemorheological patterns during arterial hypertension. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2001; 24(1): 25-31.
4. Cho S., Namgung B., Kim H.S., Leo H.L., Kim S. Effect of erythrocyte aggregation at pathological levels on NO/O₂ transport in small arterioles. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015; 59(2):163-75.
5. Pop G.A., Duncker D.J., Gardien M., Vranckx P., Versluis S., Hasan D., Slager C.J. The clinical significance of whole blood viscosity in (cardio)vascular medicine. *Neth Heart J*. 2002; 10(12): 512-6.
6. Jung F., Pindur G., Ohlmann P., Spitzer G., Sternitzky R., Franke R.P., Leithduser B., Wolf S., Park J.W. Microcirculation in hypertensive patients. *Biorheology*. 2013; 50(5-6): 241-255.
7. Plotnikov M.B., Aliev O.I., Koltunov A.A., Maslov M.Y. Hyperviscosity syndrome in spontaneously hypertensive rats: an analysis of the adequacy of the model. *Byulleten Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*. 1998; 126(8): 150-1. (in Russian)
8. Windberger U., Bartholovitsch A. Hemorheology in spontaneous animal endocrinopathies. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2004; 31(3): 207-15.
9. Meiselman H. Hemorheologic alterations in hypertension: chicken or egg? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1999; 21(3-4): 195-200.
10. Bogar L. Hemorheology and hypertension: not «chicken or egg» but two chickens from similar eggs. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2002; 26 (2): 81-83.
11. Meiselman H.J., Baskurt O.K. Hemorheology and hemodynamics: Dove andare? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2006; 35 (1-2): 37-43.
12. Shin S., Yang Y., Suh J. Microchip-based cell aggregator using stirring-disaggregation mechanism. *Korea-Australia Rheology Journal*. 2007; 19(3): 109-15.
13. Shin S., Ku Y., Park M., Suh J. Measurement of red cell deformability and whole blood viscosity using laser-diffraction slit rheometer. *Korea-Australia Rheology Journal*. 2004; 16(2): 85-90.
14. Plotnikov M.B., Aliev O.I., Anishchenko A.M., Sidkhenova A.V., Shamanaev A. Yu., Fedorova E.P. Dynamics of blood pressure and quantity indices of erythrocytes in SHR in early period of arterial hypertension forming. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2015; 101(7): 822-8. N. (in Russian)

15. Tillmann W., Levin C., Prindull G., Schroter W. Rheological property of young and aged human erythrocytes. *Klin. Wochenschr.* 1980; 58 (11): 569-74.

16. Hashimoto S., Mochizuki S., Morita Y., Otani H., Imamura H., Iwasaka T. Effect of aging on deformability of erythrocytes in shear flow. *Systemics, cybernetics and informatics.* 2005; 3(1): 90-93.

17. Lominadze D., Schuschke D.A., Joshua I.G., Dean W.L. Increased ability of erythrocytes to aggregate in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 2002; 24(5): 397-406.

18. Baskurt O., Meiselman H. Cellular determinants of low-shear blood viscosity. *Biorheology.* 1997; 34(3): 235-247.

19. Shevchenko O.P., Praskurnichij E.A., Jahno N.N. *Arterial hypertension and cerebral stroke [Arterial'naya gipertoniya i cerebral'nyy insult]*. Moscow: Reafarm; 2001. (in Russian)

20. Hoiegggen A., Fossum E., Nesbitt S.D., Palmieri V., Kjeldsen S.E. Blood viscosity, plasma adrenaline and fasting insulin in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. ICARUS, a LIFE Substudy. Insulin CA-Rotids US Scandinavica. *Blood Press.* 2000; 9 (2-3): 83-90.

Сведения об авторах:

Алиев Олег Ибрагимович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга

Анищенко Анна Марковна, доктор мед. наук, науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга

Сидехменова Анастасия Викторовна, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга

Шаманаев Александр Юрьевич, канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга

Чернышева Галина Анатольевна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.155.194.18-021.5-092

Косарева П.В., Сивакова Л.В., Самodelкин Е.И., Шаклеина С.М., Федык О.В.

Аутоиммунные реакции и реакция костного мозга крыс при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса

Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614000, г. Пермь, Россия, ул. Петропавловская, д. 26

Цель исследования — изучение в эксперименте иммунных реакций и реакции костного мозга при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса. **Методика.** Использовано 120 нелинейных белых крыс; моделирование гемолитической анемии (ГА) осуществляли однократным внутривенным введением 2,5% раствора фенилгидразина — 20 мг/кг или 2-бутоксизэтанола — 20 мг/кг массы тела. У части животных применяли острый холодный стресс (температура +4°C, экспозиция — 1,5 ч) через 1 сут. после введения токсического агента. **Результаты.** Фенилгидразин (ФГ) и бутоксиэтанол (БЭ) вызывают развитие токсической гемолитической анемии с аутоиммунным компонентом. В случае действия ФГ анемия была макроцитарной, гиперрегенераторной, гипохромной, в случае действия БЭ — нормохромной. Оба агента стимулируют в конечном итоге эритропоэз в костном мозге, но их действие принципиально различно в отношении мегакариоцитарного ростка. ФГ статистически значимо подавляет мегакариоцитопоэз, БЭ, напротив, интенсивно его стимулирует. Вероятно, этот эффект БЭ связан с его способностью влиять на дифференцировку клеток мегакариоцитарного ростка посредством изменения структуры аминокислот или ферментов. В условиях воздействия на костный мозг токсических агентов с гемолитическим эффектом характерные изменения со стороны эритроцитарного и мегакариоцитарного ростков, возникающие при остром стрессе, могут усиливаться или ослабляться в зависимости от природы действующего токсического агента.

Ключевые слова: токсическая гемолитическая анемия; фенилгидразин; бутоксиэтанол; мегакариоцитопоэз; аутоиммунные реакции.

Для цитирования: Косарева П.В., Сивакова Л.В., Самodelкин Е.И., Шаклеина С.М., Федык О.В. Аутоиммунные реакции и реакция костного мозга крыс при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 58–64.

Для корреспонденции: Косарева Полина Владимировна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. отдела морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ, зав. курсом клинической лабораторной диагностики каф. микробиологи, вирусологии с курсом КЛД, e-mail: perm-bagira@narod.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.06.2016.

Kosareva P.V., Sivakova L.V., Samodelkin E.I., Shakleina S.M., Fedyk O.V.

Autoimmune reactions and reactions of rats bone marrow at acquired toxic hemolytic anemia with acute 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 study of immune responses and bone marrow toxic reaction at hemolytic anemia with acute stress in experiment. **Methods.** 120 nonlinear albino rats; GA simulation was performed by a single intraperitoneal injection of 2.5% solution of phenylhydrazine (FG) — 20 mg/kg, or 2-butoxyethanol (BE) — 20 mg/kg body weight. Some animals used acute cold stress (temperature of 4°C, the exposure — 1.5 hours), a day after the introduction of a toxic agent. **Results.** FG and BE cause toxic acquired GA with an autoimmune component, macrocytic, hyper regenerative, but in the case of actions FG — hypochromic, in the case of actions EB — normochromic. With respect to effects on bone marrow, both agents stimulate erythropoiesis eventually, but their action is fundamentally different in relation megakaryocytic germ. FG significantly suppresses megakaryocytopoiesis, BE, on the contrary, it actively promotes. Probably the effect of EB attributable to its ability to influence the differentiation of the germ cells of megakaryocytic by changing the structure of the amino acids or enzymes.

Keywords: acute stress, toxic hemolytic anemia; phenylhydrazine; butoxyethanol; megakaryocytopoiesis; autoimmune reaction.

For citation: Kosareva P.V., Sivakova L.V., Samodelkin E.I., Shakleina S.M., Fedyk O.V. Autoimmune reactions and reactions of rats bone marrow at acquired toxic hemolytic anemia with acute stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (1): 58—64. (in Russ.).

For correspondence: Pauline V. Kosareva, Doctor of Medical Sciences, Head of Department of Morphological and Pathophysiological Studies of 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, Professor of Department of Human Ecological and life safety of Perm State National Research University, e-mail: perm-bagira@narod.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 10.06.2016

Введение

Приобретенные гемолитические анемии (ГА) — как аутоиммунные, так и токсические — чрезвычайно актуальны в последнее время в связи с постоянно возрастающими антигенными, в том числе, лекарственными, нагрузками и антропогенными факторами [1, 2]. При развитии приобретенной токсической гемолитической анемии нередко присутствует иммунный компонент [3—7]. Как правило, у таких больных отмечается положительный прямой антиглобулиновый тест: появление IgG или IgG и комплемента, в ряде случаев, комплемента, IgG и IgA [8—12]. Стандарты диагностики и терапии приобретенных гемолитических анемий остаются неизменными уже много лет. Необходимость длительного приема кортикостероидных препаратов, вновь выявляемые закономерности патогенеза диктуют разработку новых подходов к терапии ГА [13, 14].

Чрезвычайно актуально дальнейшее изучение отдельных моментов в патогенезе приобретенной токсической гемолитической анемии, иммунных реакций, сопровождающих токсические ГА, реакции костного мозга на введение различных токсических агентов с гемолитическим действием. Ответы на эти вопросы могут дать только экспериментальные исследования.

Цель исследования — изучение в эксперименте иммунных реакций и реакции костного мозга при приобретенной токсической гемолитической анемии на фоне острого стресса.

Методика

В эксперименте использовано 120 нелинейных белых крыс (самцов и самок) массой 150—200 г в возрасте 4 мес. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12—14-часового светового дня. Эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения

работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.III.1986

Моделирование приобретенной гемолитической анемии осуществляли двумя следующими способами:

1 — однократным внутривенным введением 2,5% раствора фенилгидразина (ФГ) в дозе 20 мг/кг массы тела;

2 — введение бутоксиэтанола (БЭ) в дозе 20 мг/кг массы тела.

Часть животных подвергалась острому голодному стрессу (температура +4°C, экспозиция — 1,5 ч) через сутки после введения токсического агента.

Экспериментальные группы животных (в каждой группе по 20 крыс):

- интактные животные;
- введение фенилгидрозина — (ФГ);
- введение фенилгидрозина с последующим острым голодовым стрессом (ФГ + стресс);
- изолированный острый голодовой стресс — (стресс);
- введение бутоксиэтанола — (БЭ);
- введение бутоксиэтанола с последующим острым голодовым стрессом — (БЭ + стресс).

Ежедневное наблюдение за животными включало регистрацию поведения, внешнего вида, физиологических функций. До начала и по окончании исследования у животных регистрировали показатели периферической крови при помощи гематологического автоматического анализатора (Medonic M20, производство Boule Medical A.B., Швеция), для подсчета ретикулоцитов пользовались унифицированным методом подсчета ретикулоцитов после их окраски азуром II в пробирке. Кровь брали в количестве 100 мкл для получения эритромазсы, которую хранили при темпе-

ратуре +4°C с гемоконсервантом «Глюгидир» (Декстроза+Натрия цитрат&; ОАО «Синтез»; Россия, г.Курган) из расчета 1 объем глюгицира на 4 объема крови (согласно прилагаемой инструкции к препарату). По окончании исследований животных выводили из эксперимента путем перерезки спинного мозга под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии, брали материал для цитологического исследования — костный мозг из бедренной кости (для приготовления мазка). Осуществляли также взятие венозной крови для получения сыворотки и постановки реакции агглютинации с аутологичными эритроцитами, взятыми до эксперимента. Пробы инкубировали в течение 2 ч при температуре +4°C и затем — в течение 30 мин при температуре +37°C (для выявления действия тепловых и холодных антител). Результаты реакции оценивали общепринятым способом и выражали с учетом log-нормального распределения данных в виде log₂-обратных титров антител (Инструкция по применению диагностикума клещевого энцефалита сухого для РТГА, РСК, РРГ и РТНГА Минмедпрома СССР; 1990). Расчет log осуществляли при помощи таблицы log. Статистический анализ выполнен при помощи программного пакета Biostat и приложения Microsoft® Excel полнофункционального офисного пакета Microsoft Office 2007. При проведении исследований, характеризуя выборки, определяли выборочные средние величины, ошибку среднего и выборочное стандартное отклонение. Сравнение двух выборочных средних между собой осуществляли при помощи критерия Стьюдента. Для оценки различий между несколькими случайными выборками использовали метод однофакторного дисперсионного анализа. Результаты повторных измерений оценивали при помощи парного критерия Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным $p < 0,05$. Приводимые в статье числовые значения являются первичными, за исключением значений логарифмов, которые являются производными значениями.

Результаты и обсуждение

При проведении анализа показателей периферической крови животных установлено, что в группах ФГ и ФГ + стресс по окончании эксперимента наблюдалось статистически значимое снижение концентрации гемоглобина и количества эритроцитов по сравнению с исходными данными (табл. 1). В группе интактных животных и в группе стресс изменений в составе красной крови на протяжении эксперимента не отмечалось.

В группах ФГ и ФГ + стресс выявляли статистически значимое увеличение количества ретикулоцитов периферической крови; в группе стресс и контрольной группе этого явления не наблюдалось: интактные животные: $1,43 \pm 0,19\%$ до начала эксперимента, $1,79 \pm 0,24\%$ по окончании эксперимента ($p > 0,05$); ФГ: $1,557 \pm 0,129\%$ до начала эксперимента, $8,9 \pm 1,3\%$ по окончании эксперимента ($p < 0,05$); ФГ + стресс: $1,35 \pm 0,12\%$ до начала эксперимента, $7,68 \pm 0,41\%$ по окончании эксперимента ($p < 0,05$); стресс: $1,66 \pm 0,14\%$ до начала эксперимента, $1,99 \pm 0,15\%$ по окончании эксперимента ($p > 0,05$).

В опытных группах БЭ и БЭ + стресс к концу эксперимента также отмечалось статистически значимое снижение концентрации гемоглобина и уменьшение количества эритроцитов по сравнению с исходными данными (табл. 1). Статистически значимым было увеличение количества ретикулоцитов периферической крови: введение БЭ: $1,49 \pm 0,12\%$ до начала эксперимента, $4,02 \pm 0,46\%$ по окончании эксперимента ($p < 0,05$); введение БЭ в сочетании с острым стрессом: $1,66 \pm 0,12\%$ до начала эксперимента, $4,28 \pm 0,23\%$ по окончании эксперимента ($p < 0,05$).

Установлено, что введение ФГ сопровождается увеличением содержания гемоглобина в эритроцитах (МСН), среднего объема эритроцитов (MCV), распределения эритроцитов по объему (RDW) и снижением показателя МСНС. Изолированный стресс не меняет этих показателей (табл. 2), то есть, при моделировании ГА при помощи введения ФГ указанным способом была получена макроцитарная, гипохромная

Таблица 1

Концентрация гемоглобина (г/л) и количество эритроцитов ($\times 10^9$ в 1 мкл крови) в периферической крови экспериментальных животных, (M \pm m)

Экспериментальная группа	Количество эритроцитов в начале эксперимента	Количество эритроцитов в конце эксперимента	Уровень Hb в начале эксперимента	Уровень Hb в конце эксперимента
Интактные животные, n = 20	6,456 \pm 0,57	6,532 \pm 1,88	118,4 \pm 9,82	122,8 \pm 5,57
ФГ, n = 20	6,342 \pm 0,88	4,556 \pm 0,15*	127 \pm 6,708	70,2 \pm 5,426*
ФГ + стресс, n = 20	6,455 \pm 0,97	4,108 \pm 1,22*	130 \pm 5,899	77,4 \pm 3,945*
Стресс, n = 20	6,271 \pm 0,98	6,345 \pm 0,34	123,4 \pm 7,86	127,9 \pm 8,32
БЭ, n = 20	6,342 \pm 0,88	4,556 \pm 0,15*	122,4 \pm 3,544	84,0 \pm 5,177*
БЭ + стресс, n = 20	6,455 \pm 1,23	3,742 \pm 0,87*	126,8 \pm 2,437	72,8 \pm 3,72*

Примечание. Метод статистического анализа — критерий Стьюдента; * $p < 0,05$ по отношению к исходным данным

и, учитывая количество ретикулоцитов, — гиперрегенераторная анемия.

Определение эритроцитарных индексов показало, что в группах БЭ и БЭ + стресс, подобно группам ФГ и ФГ + стресс отмечается увеличение показателя МСН, показателя MCV и показателя RDW, а в группе стресс этот показатель не менялся (табл. 2). При этом в группах БЭ и БЭ + стресс не выявляется изменение показателя МНС, так же, как и в группе со стрессом. То есть, при моделировании ГА при помощи введения БЭ получили макроцитарную, нормохромную и, учитывая количество ретикулоцитов, — гиперрегенераторную анемию.

Учет результатов ГА у животных опытных групп с введением ФГ показал наличие гемолиза — в единичных случаях, отсутствие агглютинации — также в единичных случаях; у большинства животных, которым вводили ФГ (ФГ, ФГ + стресс) выявлена агглютинация: ФГ — средние значения \log — $3,6 \pm 0,79$; ФГ + стресс — средние значения \log — $4,3 \pm 1,13$ ($p = 0,617$; критерий Стьюдента). То есть в группе со стрессом агглютинация более выражена, чем при изолированном введении ФГ, но разница между группами не значима. В группе контроля и в группе с изолированным стрессом наблюдалось отсутствие агглютинации во всех лунках планшета.

При проведении реакции агглютинации присутствие антител к собственным эритроцитам выявлено как в группе БЭ (средние значения \log — $8,9 \pm 1,3$), так и в группе БЭ + стресс (средние значения \log — $9,7 \pm 0,76$; $p = 0,603$ критерий Стьюдента). То есть введение бутоксиэтанола провоцирует развитие аутоиммунной реакции, направленной в отношении собственных эритроцитов. При этом в группе БЭ + стресс агглютинация более выражена, но так же, как и в случае с введением ФГ, эта разница статистически

незначима. Однако при сравнении группы с введением ФГ и введением БЭ $p = 0,003$. То же можно сказать и по поводу сравнения групп ФГ + стресс и БЭ + стресс: $p = 0,000$ (критерий Стьюдента). То есть, БЭ в большей степени, нежели ФГ, способен провоцировать аутоиммунные реакции, направленные против собственных эритроцитов.

Показатели, характеризующие количественный состав клеток эритроидного ростка миелограммы, у животных с изолированным острым стрессом не отличались от показателей интактных животных. Что касается групп с введением ФГ, то в обеих экспериментальных группах (ФГ, ФГ + стресс) выявлено статистически значимое (по отношению к контролю) увеличение количества клеток эритроидного ростка в костном мозге за счет повышения количества эритробластов, пронормоцитов, базофильных и полихроматофильных нормоцитов, что согласуется с увеличением количества ретикулоцитов в периферической крови животных этих групп к концу эксперимента. В группах БЭ и БЭ + стресс выявлено статистически значимое (по отношению к контролю) увеличение количества клеток эритроидного ростка в костном мозге за счет повышения количества эритробластов, пронормоцитов, базофильных и полихроматофильных нормоцитов, что согласуется с увеличением количества ретикулоцитов в периферической крови животных этих групп к концу эксперимента (табл. 3).

Количество тромбоцитов крови во всех экспериментальных группах имело тенденцию к росту, но статистически незначимую (табл. 4). Каких-либо качественных изменений со стороны тромбоцитов в экспериментальных группах со стрессом и введением ФГ не выявлено (табл. 5). Введение БЭ сопровождается качественными изменениями тромбоцитов — в частности, уменьшением их объема (табл. 5), что позво-

Таблица 2

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН, пг/эр), эритроцитах (МНС, г/л), средний объем эритроцита (MCV, фЛ), показатель распределения эритроцитов по объему (RDW, %) у экспериментальных животных, ($M \pm m$)

Экспериментальная группа	МСН	p	МНС	p	MCV	p	RDW	p
Интактные животные	17,82 ± 0,28		343,0 ± 2,08		52,11 ± 1,07		17,93 ± 0,52	
ФГ	21,84 ± 0,59	p = 0,000*	327,36 ± 2,25*	p = 0,000*	66,79 ± 1,85*	p = 0,000*	30,05 ± 0,96*	p = 0,000*
ФГ + стресс	22,14 ± 0,82	p = 0,000*	322,15 ± 3,42	p = 0,000*	67,5 ± 2,54	p = 0,000*	29,58 ± 1,14	p = 0,000*
Стресс	18,12 ± 0,43	p = 0,562	339,0 ± 2,88	p = 0,267	54,3 ± 1,09	p = 0,160	16,93 ± 0,89	p = 0,338
p (ANOVA)	p = 0,000#		p = 0,000#		p = 0,000#		p = 0,000#	
БЭ	22,07 ± 0,69	p = 0,000*	337,75 ± 1,87	p = 0,068	66,79 ± 1,85	p = 0,000*	26,78 ± 2,05	p = 0,000*
БЭ + стресс	21,11 ± 0,52	p = 0,000*	344,7 ± 3,56	p = 0,682	68,22 ± 2,05	p = 0,000*	25,92 ± 1,88	p = 0,000*
p (ANOVA)	p = 0,000#		p = 0,224		p = 0,000#		p = 0,000#	

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе контроля (интактные животные); Метод статистического анализа — критерий Стьюдента; # $p < 0,05$; Метод статистического анализа — однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

ляет высказать гипотезу о том, что БЭ влияет на мегакариоцитарный росток, изменяя, возможно, структуру аминокислот или ферментов.

При этом количество мегакариоцитов (МКЦ) в костном мозге животных с изолированным стрессом

имело тенденцию к росту, с введением ФГ — статистически значимо уменьшалось по отношению к контролю (табл. 4). Что же касается групп с введением БЭ, то количество МКЦ статистически значимо возросло (табл. 4).

Таблица 3

Количественный состав клеток эритроидного ряда миелограмм экспериментальных животных, (M ± m)

Экспериментальная группа	Абсолютное число клеток, $\times 10^6$ /костный мозг бедренной кости						
	Эритробласты	Пронормоциты	Нормоциты			Митоз клеток	Весь эритроидный ряд
			Базофильные	Полихроматофильные	Оксифильные		
Интактные животные	0,35 ± 0,09	0,83 ± 0,19	4,57 ± 0,82	30,01 ± 4,28	5,4 ± 1,12	0,55 ± 0,12	38,37 ± 4,83
ФГ	1,28 ± 0,42*	1,96 ± 0,5*	14,28 ± 4,56*	45,22 ± 7,87*	4,17 ± 0,97	1,12 ± 0,52	68,03 ± 10,47*
ФГ + стресс	1,31 ± 0,28*	1,87 ± 0,21*	15,33 ± 5,51*	43,17 ± 5,29*	4,82 ± 0,88	1,17 ± 0,43	67,67 ± 9,24*
Стресс	0,28 ± 0,07	0,9 ± 0,08	5,12 ± 0,44	33,95 ± 5,17	5,2 ± 0,88	0,5 ± 0,07	45,95 ± 3,27
БЭ	1,42 ± 0,27*	1,88 ± 0,43*	15,22 ± 3,82*	44,39 ± 5,47*	5,28 ± 0,35	1,14 ± 0,28	69,33 ± 7,85*
БЭ + стресс	1,55 ± 0,14*	1,92 ± 0,18*	16,47 ± 2,91*	45,31 ± 4,88*	5,96 ± 0,57	1,16 ± 0,28	72,37 ± 8,35*

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к интактным животным (группа контроля); Метод статистического анализа — критерий Стьюдента.

Таблица 4

Количество мегакариоцитов (МКЦ) в костном мозге, тромбоцитов в венозной крови $\times 10^9$ /л, у экспериментальных животных, (M ± m)

Экспериментальная группа	Кол-во МКЦ	p (критерий Стьюдента)	Кол-во тромбоцитов	p (критерий Стьюдента)
Интактные животные	48,70 ± 4,12		786,2 ± 95,5	
ФГ	18,00 ± 3,67*	0,000	952,6 ± 102,3	p = 0,242
ФГ + стресс	32,54 ± 3,92*	0,007	988,4 ± 106,5	p = 0,166
Стресс	55,67 ± 4,83	0,279	933,3 ± 89,9	p = 0,269
p (ANOVA)	0,000#		p = 0,492	
БЭ	72,00 ± 4,91	0,000*	895,1 ± 48,38	p = 0,315
БЭ + стресс	88,43 ± 7,85	0,000*	928,3 ± 57,81	p = 0,211
p (ANOVA)	0,000#		p = 0,487	

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе контроля (интактные животные); Метод статистического анализа — критерий Стьюдента; # $p < 0,05$; Метод статистического анализа — однофакторный дисперсионный анализ

Таблица 5

Показатели тромбокрита (PCT, %), среднего объема тромбоцитов (MPV, fL), степени анизоцитоза тромбоцитов (PDW, %), у экспериментальных животных, (M ± m)

Экспериментальная группа	PCT	p (критерий Стьюдента)	MPV	p (критерий Стьюдента)	PDW	p (критерий Стьюдента)
Интактные животные	0,499 ± 0,058		6,44 ± 0,125		9,73 ± 0,173	
ФГ	0,611 ± 0,063	p = 0,199	6,48 ± 0,118	p = 0,817	9,69 ± 0,156	p = 0,865
ФГ + стресс	0,652 ± 0,071	p = 0,103	6,51 ± 0,127	p = 0,697	9,54 ± 0,122	p = 0,375
Стресс	0,624 ± 0,056	p = 0,129	6,49 ± 0,098	p = 0,755	9,67 ± 0,146	p = 0,792
p (ANOVA)	p = 0,329		p = 0,979		p = 0,826	
БЭ	0,546 ± 0,032	p = 0,482	6,078 ± 0,118	p = 0,042*	9,69 ± 0,156	p = 0,865
БЭ + стресс	0,573 ± 0,042	p = 0,308	6,045 ± 0,078	p = 0,011*	9,54 ± 0,122	p = 0,375
p (ANOVA)	p = 0,325		p = 0,004#		p = 0,826	

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе контроля (интактные животные). Метод статистического анализа — критерий Стьюдента; # $p < 0,05$; Метод статистического анализа — однофакторный дисперсионный анализ.

Таким образом, при внутрибрюшинном введении как ФГ, так и БЭ, развивалась гемолитическая анемия — в случае действия ФГ — гипохромная, а в случае действия БЭ — нормохромная. По данным литературы, ФГ-анемия характеризуется анизо- и пойкилоцитозом, увеличением содержания микро- и макроцитов на 35% по отношению к нормоцитам, выявлением микросфероцитов [15].

При ФГ-анемии отмечается увеличение среднечлечного диаметра эритроцитов — характерный признак макроцитарной анемии, уменьшается концентрация Hb и Эр, МСНС, увеличивается МСV по сравнению с интактными животными [16]. То есть полученные результаты соответствуют представлениям о гемолитической анемии, вызванной ФГ. В отношении БЭ основной повреждающий эффект со стороны системы кроветворения (по данным клинических наблюдений) характеризуется как макроцитарная, нормохромная и гиперрегенераторная анемия (National Toxicology Program. 2000), что соответствует представленным в работе экспериментальным данным.

Известно, что при стрессе количество тромбоцитов увеличивается вследствие их мобилизации в кровоток — в рамках стресс-реакции [17]. Этим объясняется увеличение количества и тромбоцитов, и мегакариоцитов в группе с изолированным стрессом. В группе с введением ФГ отмечается, напротив, уменьшение количества мегакариоцитов, что может быть связано с цитолитическим действием ФГ, включая аутоиммунные реакции. В группе с сочетанием введения ФГ и острого стресса их количество статистически значимо не изменилось, поскольку увеличение количества мегакариоцитов при стрессе нивелировалось их снижением, обусловленным введением ФГ.

Существует мнение, что ряд факторов, в том числе химические агенты, вызывает тромбоцитопению, индуцируя апоптоз мегакариоцитов и их предшественников [18]. Апоптоз является важным этапом отшнуровки тромбоцитов от мегакариоцитов — нормальной составной части процесса тромбоцитопоэза, посредством активации стресса цитоплазматического ретикула [19]. Мегакариоциты обладают большей чувствительностью к стрессу, чем миелоидные предшественники [20]. В условиях *in vitro* показано, что стресс ускоряет процесс тромбоцитопоэза — как за счет отшнуровки и мобилизации тромбоцитов, так и стимуляции дифференцировки стволовых клеток в этом направлении [21]. Активные формы кислорода, образующиеся при стрессе, являются активаторами клеточной деятельности, в том числе дифференцировки клеток, и, в частности, клеток мегакариоцитарной линии [22].

По данным литературы, при ФГ-индуцированной ГА происходит активация как эритроидного, так и тромбоцитарного ростков за счет эритропоэтина и тромбопоэ-

тина, что расценивается как компенсаторная реакция [23]. Но у эритроцитарного и мегакариоцитарного ростков существует единый предшественник — мегакариоцитарно-эритроидный предшественник (МК-erythroid progenitor) [24]. На сегодняшний день существуют данные о том, что при стрессе биопотентный мегакариоцитарно-эритроидный предшественник дифференцируется как в направлении эритроидной, так и в направлении мегакариоцитарной линий — по мере возникающей необходимости [25]. Кроме того, известно, что некоторые эндогенные факторы, сопровождающие различные патологические состояния, в том числе трансформирующий фактор роста- β_1 , ингибируют развитие МКЦ [24]. То есть уменьшение количества МКЦ в костном мозге экспериментальных животных при введении ФГ может быть объяснено этими причинами.

Увеличение количества МКЦ в группе с введением БЭ может быть объяснено с позиций учения о стрессе, либо может трактоваться как специфическое действие бутоксиэтанола [26]. Увеличение количества мегакариоцитов костного мозга (мегакариоцитарная гиперплазия) может наблюдаться при некоторых видах анемий: так, например, ежедневные инъекции полиэтиленгликоля Valb/c мышам в течение 2 нед., индуцировали гиперплазию мегакариоцитов, миелоидную гиперплазию и эритроидную гипоплазию в костном мозге; заметное увеличение числа мегакариоцитов отмечается также и при введении самцам и самкам крыс F344 через зонд 2-бутоксиэтанола [26], что подтверждают и наши данные.

Заключение

Таким образом, оба гемолитических агента — ФГ и БЭ — в конечном итоге приводят к формированию, с одной стороны, сходных, с другой — противоположных изменений в организме экспериментальных животных. Так, оба агента вызывают приобретенную токсическую ГА с аутоиммунным компонентом, макроцитарную, гиперрегенераторную, но в случае действия ФГ — гипохромную, в случае действия БЭ — нормохромную. В отношении действия на костный мозг оба агента стимулируют в конечном итоге эритропоэз, но их действие принципиально различно в отношении мегакариоцитарного ростка. ФГ значимо подавляет мегакариоцитопоэз, что связано с активацией апоптоза мегакариоцитов и их предшественников [18]; БЭ, напротив, интенсивно его стимулирует. Выявленный эффект БЭ подтверждает данные Travlos G.S. [26]. Вероятно, этот эффект БЭ связан с его способностью влиять на дифференцировку клеток мегакариоцитарного ростка посредством изменения структуры аминокислот или ферментов. В условиях воздействия на костный мозг токсических агентов с гемолитическим эффектом характерные изменения со сто-

роны эритроцитарного и мегакариоцитарного ростков, возникающие при остром стрессе, могут усиливаться или уменьшаться — в зависимости от природы действующего токсического агента.

References

- Schick P., Besa E.C. Hemolytic Anemia Treatment & Management. *Drug, Diseases & Procedures*. 2011; 8: 1234-7.
- Schwartz R.S. Autoimmune and intravascular hemolytic anemias. In: Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007: chap 164.
- Garratty G., Arndt P.A. An update on drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology*. 2007; 23(3): 105-19.
- Johnson S.T., Fueger J.T., Gottschall J.L. One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia — a new paradigm. *Transfusion*. 2007; 47(4): 697-702.
- Garratty G. Drug-induced immune hemolytic anemia. *ASH Education Book*. 2009; 1: 73-9.
- El-Ashmawy I.M., Gad S.B., Salama O.M. Grape seed extract prevents azathioprine toxicity in rats. *Phytother Res*. 2010; 24(11): 1710-5.
- Moreira-Rodrigues M., Henriques-Coelho T., Moura C., Vasques-Novoa F., Sampaio-Maia B., Pestana M. et al. Cardiac dysfunction in HgCl₂-induced nephrotic syndrome. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010; 235(3): 392-400.
- Bollotte A., Vial T., Bricca P., Bernard C., Broussolle C., Seve P. Drug-induced hemolytic anemia: A retrospective study of 10 cases. *Rev Med Interne*. 2014; 35(12): 779-89.
- Haley K.M., Russell Th.B., Boshkov L., Leger R.M., Garratty G., Recht M. et al. Fatal carboplatin-induced immune hemolytic anemia in a child with a brain tumor. *J Blood Med* 2014; 15(5): 55-8.
- Betensky M., Witmer C., Fisher M.J., Nance S., Weiss M.J., Sesok-Pizzini D.A. Immune hemolytic anemia with drug-induced antibodies to carboplatin and vincristine in a pediatric patient with an optic pathway glioma. *Transfusion*. 2014; 54 (11): 2901-5.
- Haddad H., Mohammad F., Dai Q. Bendamustine-induced immune hemolytic anemia in a chronic lymphocytic leukemia patient: A case report and review of the literature. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2014 Dec; 7(4): 162-4.
- Joybari A.Y., Sarbaz S., Azadeh P., Mirafsharieh S.A., Rahbari A., Farasatinasab M. et al. Oxaliplatin-induced renal tubular vacuolization. *Ann Pharmacother*. 2014; 48(6): 796-800.
- Nikulina OF, Tsvetaeva NV, Well SV Shurhina ES, MG Dmitriev, autoimmune hemolytic anemia (AIHA): activity monitoring and treatment of hemolysis. *Problemy gematologii*. 2005; 1: 46. (in Russian)
- Powers A, Silberstein LE. Autoimmune hemolytic anemia. In: Hoffman R, Benz Ej, Shattil SS, et al. eds. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2008: chap 47.
- Zhernov Y. The study of the antioxidant effect of humic acids peloids when acquired hemolytic anemia. *Kislород i antioksidanty*. 2009; 1: 73-4. (in Russian)
- Moyseenko N.A., Ivankov Zh.E., Repin E.N., Volodin V.V. Hematoprotective effect of ecysteroid seripisten substance. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova*. 2011; 7 (3): 24-9. (in Russian)
- Smirnova L.A., Semenihih A.V., Costco N.A. Thrombocytosis. *Medical News* 2005; 9: <http://www.mednovosti.by/journal.aspx?article=1019>. (in Russian)
- Josefsson E.C., James C., Henley K.J., Debrincat M.A., Rogers K.L., Dowling M.R. et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *JEM* 2011; 208(10): 2017-31.
- Lopez J.J., Palazzo A., Chaabane C., Albarran L., Polidano E., Lebozec K. et al. Crucial Role for Endoplasmic Reticulum Stress During Megakaryocyte Maturation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013; 33: 2750-8.
- Xu Y., Kashiwakura I. and Takahashi T.A. High sensitivity of megakaryocytic progenitor cells contained in placental/umbilical cord blood to the stresses during cryopreservation. *Bone Marrow Transplantation*. 2004; 34: 537-43.
- Jiang J., Woulfe D.S., Papoutsakis E.T. Regular Article Platelets and thrombopoiesis. Shear enhances thrombopoiesis and formation of microparticles that induce megakaryocytic differentiation of stem cells. *Blood*. 2014; 124(13): 2094-103.
- Nurhayati R.V., Ojima Y., Taya M. Promoted megakaryocytic differentiation of K562 cells through oxidative stress caused by near ultraviolet irradiation. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2014; 19(4). DOI:10.2478/s11658-014-0215-3.
- Vannucchi A.M., Paoletti F., Linari S., Cellai C., Caporale R., Ferrini P.R. et al. Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. *Blood*. 2000; 15: 2559-68. DOI: <http://dx.doi.org/>
- Deutsch V.R. and Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology*. 2006;) : 453-66.
- Sanchez M., Weissman I.L., Pallavicini M., Valeri M., Guglielmelli P., Vannucchi A.M. et al. Differential Amplification of Murine Bipotent Megakaryocytic/Erythroid Progenitor and Precursor Cells During Recovery from Acute and Chronic Erythroid Stress. *STEM CELLS* 2006; 24: 337-48 www.StemCells.com
- Travlos G.S. Histopathology of Bone Marrow. *Toxicol Pathol*. 2006; 34(5): 566-98.

Сведения об авторах:

Самоделькин Евгений Иванович, доктор мед. наук, проф., каф патологической физиологии

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

Федык Оксана Владимировна, аспирант заочной формы обучения каф. иммунологии

Шаكلةина Светлана Мячеславовна, ассистент каф. микробиологии, вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики

© Коллектив авторов, 2017
УДК 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Саидов М.З., Далгатова А.А., Курбанов К.З., Гамзаева А.У.

Патогенетическая оценка иммунологической реактивности при синдроме длительного сдавления

Дагестанский государственный медицинский университет, 367000, г. Махачкала, пл. Ленина, д.1

Цель исследования: изучение в эксперименте состояния адаптивного иммунитета и патоморфологии органов иммунной системы при синдроме длительного сдавления в эксперименте. **Методика:** синдром длительного сдавления I, II и III степени тяжести моделировали на крысах путём наложения тисков на задние лапки на 2, 4 и 6 ч. Уровень растворимых CD3G, CD19, TNF- α , ИЛ-6 и ИФ- γ определяли методом ИФА. Оценивали патоморфологические изменения в лимфоидных органах на гистологических препаратах. **Результаты:** Показано, что компрессионная травма сопровождается эндотоксемией, гиперпродукцией провоспалительных цитокинов — TNF- α , ИФ- γ и ИЛ-6 и кортизола, а также увеличением сывороточного уровня растворимых CD3G и CD19, выраженными изменениями структурно-функционального состояния органов иммунной системы. **Заключение:** Полученные результаты свидетельствуют о выраженных изменениях системы адаптивного иммунитета на фоне стресс-реакции и гиперкортизолемии.

Ключевые слова: синдром длительного сдавления, эндотоксикоз, лимфоциты, растворимые CD3G и CD19, TNF- α , ИЛ-6, ИФ- γ , патоморфология лимфоидных органов.

Для корреспонденции: Саидов Марат Зиявдинович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии Даггосмедуниверситета, e-mail: marat2002@pochta.ru

Для цитирования: Саидов М.З., Далгатова А.А., Курбанов К.З., Гамзаева А.У. Патогенетическая оценка иммунологической реактивности при синдроме длительного сдавления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 65—71.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.05.2016

Saidov M.Z., Dalgatova A.A., Kurbanov K.Z., Gamzaeva A.U.

Pathogenetic evaluation of immunologic reactivity in crush syndrome

Dagestan State Medical University, 367000, Machachtkala, Lenin sq., 1, Russia

The purpose. Pathogenesis evaluation of adaptive immune system and immunomorphology lymphoid organs in experimental crush syndrome. **Methods.** crush syndrome I, II and III stage of hard was modeling by injury-crushing on 2, 4 and 6 hours after limb compression in rats. The level of soluble CD3G, CD19, TNF- α , IL-6 and IF- γ was measuring by IEA methods. The pathomorphologic changes was evaluated on histologic slides. **Results.** It was shown that compression trauma induces multi-system changes including endotocsemia, hyperproduction of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, IF- γ and cortisol, high serum levels of soluble CD3G and CD19, intensive changes of structural and functional changes in lymphoid organs. **Conclusion.** The results obtained were shown the intensive changes of adaptive immune systems including stress reaction and hypercortisolemia.

Keywords: crush syndrome, endotocsemia, lymphocytes, soluble levels CD3G, CD19, TNF- α , IL-6, IF- γ , cortisol, pathomorphology lymphoid organs.

For citation: Saidov M.Z., Dalgatova A.A., Kurbanov K. Z., Gamzaeva A.U. Pathogenetic evaluation of immunologic reactivity in crush syndrome (experimental research) *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya.* (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61 (1): 65—71. (in Russ.).

For correspondence: Saidov Marat Ziavdinovich, Doctor of Medical Sciences, Chief of Department Pathophysiology of Dagestan State Medical University, 367000, Makhachkala, Lenin sq.,1. Russian Federation, E-mail: marat2002@pochta.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments. The study had no sponsorship

Information about authors:

Saidov M.Z. Doctor of Medical Sciences, Chief of Department Pathophysiology of Dagestan State Medical University
Dalgatova A.A. Post-graduate student of Department Pathophysiology of Dagestan State Medical University
Kurbanov K.Z., Docent of Department Pathophysiology of Dagestan State Medical University
Gamzaeva A.U., Docent of Department Pathophysiology of Dagestan State Medical University

Received 19.05.2016

Введение

Геосейсмические и техногенные катастрофы неизбежно влекут за собой рост травматизма, в структуре которого доминирует синдром длительного сдавления мягких тканей (СДС). Летальность при СДС тяжёлой степени особенно при больших землетрясениях может достигать 80% [1]. Ведущим патогенетическим звеном СДС является реперфузионная токсемия, обусловленная гипермиоглобулинемией, гиперкалиемией, метаболическим ацидозом, превращением миоглобина в солянокислый гематин. Последний является основной причиной развития острой почечной недостаточности при СДС [2, 3]. Тяжёлые формы СДС связаны с выраженной стресс-реакцией, сопровождающейся гиперпродукцией гормонов надпочечников — кортикостероидов и катехоламинов и, как следствие, формированием транзиторного вторичного иммунодефицита.

Очевидно, что в условиях протекания столь тяжёлых патологических процессов иммунная система претерпевает не менее сложную перестройку, которая вносит кардинальные изменения в состояние иммунологической реактивности организма и эти изменения формируют иммунопатогенетическое звено СДС. Показано, что СДС различной степени тяжести сопровождается активацией клеток макрофагально-моноцитарного ряда (CD14+, CD68+), а также клеток адаптивного иммунитета, в частности субпопуляций Т-лимфоцитов — CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток [4—6]. Пик инфильтрации макрофагами места повреждения приходится на 2-е — 5-е сут. посткомпрессионного периода, лимфоцитами — на 7-е сут. [7].

Компрессионная травма индуцирует повышенную экспрессию антигенов I и II классов гистосовместимости (МНС) на клетках макрофагально-моноцитарного ряда, что является стимулом для индукции антиген-специфического адаптивного иммунного ответа на продукты рабдомиолиза [8]. Этот ответ имеет некоторые признаки аутоиммунного, так как при травматическом повреждении, в частности, нервной ткани гиперпродукция провоспалительных цитокинов TNF- β , ИЛ-6 и ИЛ-22 индуцирует синтез ИЛ-17

Т-клетками, что обеспечивает участие в индукции аутоиммунных и воспалительных реакциях [9].

Гипермиоглобулинемия, на этапе ревазуляризации сдавленных тканей, сопровождается индукцией патогенетически значимого ответа системы адаптивного иммунитета на эти антигены. Через несколько часов после компрессионной травмы констатируется гиперпродукция провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , TNF- α , ИЛ-6, ИФ- γ). Эти цитокины, взаимодействуя с рецепторами эндотелия, стимулируют хемотаксис нейтрофилов, их миграцию в очаг повреждения. Именно эти клетки выполняют основную «нагрузку» в отношении фагоцитоза клеточного и тканевого детрита и, активируясь, продуцируют микробцидную миелопероксидазу (МПО), выступающую в качестве важного компонента экстрацеллюлярных механизмов противомикробной защиты фагоцитирующих клеток [10]

Крайне важны результаты исследований экспрессии TLR рецепторов на клетках врождённого иммунитета (дендритных клетках, макрофагах, естественных киллерах) при СДС. На экспериментальных моделях СДС показана патогенетическая роль экспрессии TLR рецепторов на клетках макрофагально-моноцитарного ряда и лимфоцитах. Эта экспрессия сопряжена с статистически значимым увеличением пролиферативной активности спленоцитов и продукцией провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, TNF- α), Th1+CD4+ субпопуляцией лимфоцитов [11, 12]. Эти и другие данные важны с той точки зрения, что индукция антиген-специфического иммунного ответа и продукция провоспалительных цитокинов при СДС возможна при условии активации клеток врождённого иммунитета через упомянутые TLR рецепторы. Очевидно, что система адаптивного и врождённого иммунитета являются важными компонентами патогенеза СДС.

Таким образом, актуальность изучения иммунопатогенеза СДС не вызывает сомнений. Более того, знание этих механизмов позволит обосновать рекомендации в отношении применения средств иммунотерапии на всех этапах лечения и ведения пострадавших, принятых в медицине катастроф.

Цель исследования — изучение состояния иммунологической реактивности и морфофункционального состояния органов иммунной системы при СДС различной степени тяжести в эксперименте.

Методика

Эксперименты проведены на крысах-самцах Вистар 8—12-месячного возраста, массой 150—180 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Модель СДС воспроизводилась у крыс путём наложения металлических тисков с площадью сдавливающей поверхности 5—6 см². Тиски накладывались на 2, 4 и 6 ч на задние лапки под тиопенталовым наркозом (0,2—0,3 мл 10% раствора тиопентала на одну особь). При этом сила сдавливания была максимальной, но не нарушающей целостность костей нижних конечностей. Такая модель является общепринятой и позволяет точно воспроизводить степень компрессионной травмы. Животные выводились из эксперимента декапитацией под наркозом с последующим забором крови в пробирку с антикоагулянтом и органов системы иммунитета — тимуса, селезёнки, пейеровых бляшек и региональных лимфатических узлов для гистологического исследования.

Экспериментальные животные были разделены на 3 группы:

1-я группа крыс (n = 15) с СДС лёгкой степени (I степень тяжести), время сдавливания — 2 ч;

2-я группа крыс (n = 15) — с СДС средней степени (II степень тяжести), время сдавливания — 4 ч;

3-я группа крыс (n = 15) — с СДС тяжёлой степени (III степень тяжести), время сдавливания — 6 ч.

Контрольную группу составили 10 интактных крыс.

Для морфологического исследования региональные лимфатические узлы, тимус, пейеровы бляшки и селезёнку фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24 ч, затем общепринятыми в гистологии методами обработки материала готовили парафиновые блоки. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Наиболее демонстративные препараты сканировались в световом микроскопе «Leica DMLB» со встроенной видеокамерой по программе «Leica QWin Colour (GB) for Image Analysis». Видеозображения переносились на флеш-карту.

Морфометрический анализ включал подсчет количества нейтрофилов, лимфоцитов и эозинофилов в нескольких полях зрения при ув.400. Для подсчета выбирали наиболее типичные для данного препарата поля зрения.

Подсчёт абсолютного количества лейкоцитов проводили с применением стандартной методики, согласно которой, после лизиса эритроцитов 3% раствором уксусной кислоты и разведения полученной клеточной взвеси 1:20, проводился подсчёт абсолютного числа клеток в камере Горяева. Относительный уровень нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов в периферической крови крыс подсчитывали в мазках крови после окрашивания по Романовскому-Гимза при ув.400. Далее процент клеток пересчитывался в абсолютные величины.

Для определения уровня CD3G и CD19 в сыворотке крови методом твёрдофазного ИФА использовали наборы «Rat T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain ELISA Kit» и «Rat cluster of differentiation 19 (CD19) ELISA Kit» компании «CUSABIO», кат. №CSB-EL004933RA, кат. №CSB-E14095г; для определения уровня кортизола — наборы «Rat cortisol ELISA Kit» компании «CUSABIO», кат. №CSB-E05112г. Сывороточный уровень ТНФ- α , ИФ- γ и ИЛ-6 определяли, используя наборы «Rat TNF- α ELISA Kit», «Rat Interferon γ (IFN- γ) ELISA Kit» и «Rat Interleukin 6 (IL-6) ELISA Kit» компании «CUSABIO», кат. №CSB-E11987 г., №CSB-E04579 г. и №CSB-E04640 г.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета Statistica (версия 6,0), а также «Biostat 4.03». База данных создавалась с использованием редактора электронных таблиц Microsoft Excel 2007. Непрерывные переменные в исследуемых выборках представлены в виде медианы (Me) с 25;75-перцентилями. Для определения статистической значимости различий между двумя сравниваемыми выборками использовался критерий Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Использованная экспериментальная модель СДС позволяет воспроизвести основные патофизиологические этапы компрессионной травмы в соответствии с критериями, принятыми в практике медицины катастроф [1]. При моделировании I и II степени тяжести СДС все животные после снятия тисков остались живы, а при III степени тяжести СДС (6 ч сдавливания без нарушения целостности костей нижних лапок) все крысы после снятия тисков погибли. Абсолютное количество лимфоцитов в крови и плотность лимфоцитов в органах иммунной системы при нарастающей степени эндотоксикоза представлены в табл. 1.

Прежде всего обращает на себя внимание статистически значимое снижение абсолютного количества

Таблица 1

Абсолютное количество лимфоцитов в крови, а также клеточная плотность лимфоцитов в органах иммунной системы крыс при СДС I, II и III степени тяжести, Ме (25;75 процентиля)

Группы	Абсолютное количество лимфоцитов в крови, тыс./мкл	Плотность лимфоцитов в региональных лимфатических узлах	Плотность лимфоцитов в пейеровых бляшках	Плотность лимфоцитов в тимусе	Плотность лимфоцитов в селезёнке
I степень СДС, n = 15	1,16 (0,9;1,32)*	400 (340;450)**	200 (160;275)*	400 (370;540)**	260 (200;365)**
II степень СДС, n = 15	0,87 (0,7;1,1)*	200 (160;225)	180 (155;200)*	190 (110;235)	180 (155;200)**
III степень СДС, n = 15	2,21 (1,9;2,45)	250 (215;300)	100 (85;100)*	150 (120;180)*	190 (150;145)*
Контроль, n = 10	2,16 (2;2,3)	230 (202;250)	125 (105;145)	197 (183;200)	110 (100;120)

Примечание. *p<0,05, **p<0,01 по сравнению с контрольной группой (Т-критерий Манна—Уитни).

циркулирующих лимфоцитов по сравнению с контрольной группой при I и II степенях тяжести СДС. При III степени тяжести СДС эти различия нивелируются. На этом фоне по иному выглядит картина клеточной плотности лимфоцитов в органах иммунной

системы. При I степени СДС плотность во всех исследованных органах иммунной системы статистически значимо превышает аналогичный показатель в контроле. При II степени тяжести СДС статистически значимое повышение клеточной плотности лимфоцитов определяется в пейеровых бляшках и в селезёнке. Но при III степени тяжести СДС изменения диаметрально противоположны: в пейеровых бляшках и в тимусе плотность лимфоцитов статистически значимо снижается, а в селезёнке значимо повышается по сравнению с контролем.

Очевидно, что лимфоцитопения при I и II степенях тяжести СДС свидетельствует о транзитном иммунодефиците, индуцированном попаданием продуктов рабдомиолиза в кровь, а также выбросом корой надпочечников в системную циркуляцию избытка кортизола (табл. 2) как стресс-реакции при СДС, а изменения клеточной плотности лимфоцитов в органах иммунной системы носят реактивный, перераспределительный характер.

Патоморфологически вариации количества лимфоцитов в циркуляции и in situ сопровождалась следующими основными изменениями. Со стороны региональных лимфатических узлов при I степени тяжести СДС отмечается уменьшение зоны коркового вещества, синусы расширены, заполнены преимущественно лимфоцитами с примесью макрофагов и плазматических клеток. В фолликулах отмечается снижение количества зрелых лимфоцитов. Центр фолликула представлен преимущественно ретикулярными клетками и лимфобластами. При II степени тяжести СДС отмечается увеличение клеточной плотности лимфоидных фолликулов за счет преимущественно средних лимфоцитов и лимфобластов. Синусы заполнены плазматическими клетками и макрофагами. При III степени тяжести СДС площадь фолликулов уменьшается, плотность клеток остаётся прежней, определяется застойное полнокровие сосудов лимфатических узлов. В синусах лимфоидные клетки в состоянии дегенерации с примесью макрофагов. На рис. 1 представлен препарат регионального лимфатического,

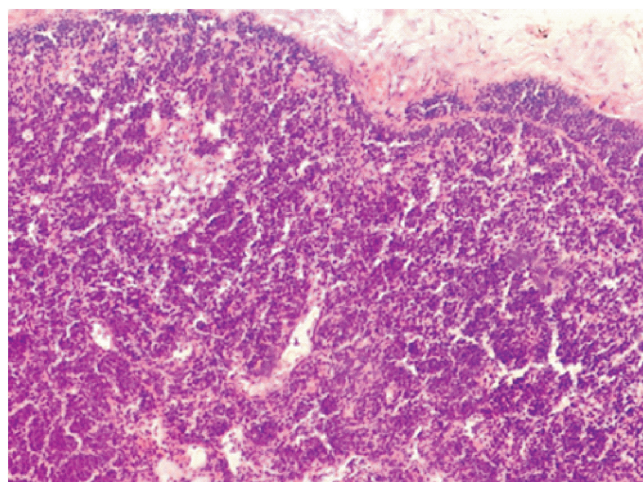


Рис. 1. Лимфатический узел при СДС III степени тяжести, ув.200.

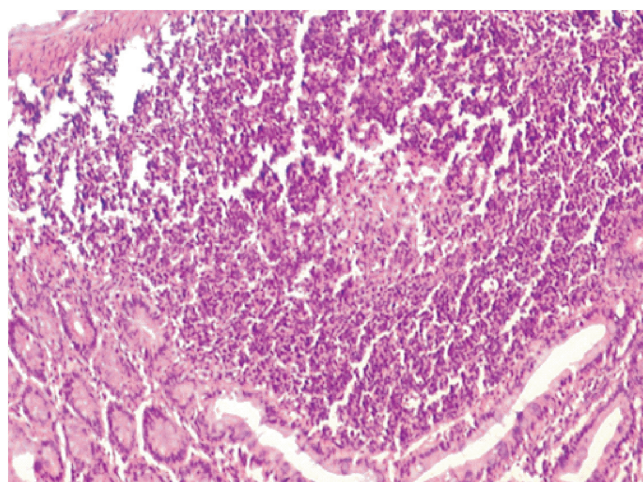


Рис. 2. Пейеровы бляшки при СДС III степени тяжести, ув.200.

узла иллюстрирующий изменения при III степени тяжести СДС.

Со стороны пейеровых бляшек при I степени тяжести СДС определялось застойное полнокровие сосудов, увеличение плотности зрелых лимфоцитов в лимфоидных фолликулах, а в зоне купола бляшек относительное увеличение плазматических клеток. При II степени тяжести СДС — выраженное увеличение количества лимфоцитов blastного ряда. В зоне купола бляшек отмечается увеличение плотности лимфоцитов, встречаются лимфоциты в состоянии дегенерации и макрофаги. При III степени тяжести СДС (рис. 2), отмечается расширение фолликулов за счет гиперплазии клеток центральной зоны, где представлены лимфобласты, макрофаги, периферия фолликулов оказывается занятой малыми лимфоцитами.

Патоморфологические изменения в тимусе при I степени тяжести СДС характеризуются снижением доли коркового вещества и повышением доли мозгового вещества на 10—12% по сравнению с контролем. Увеличивается плотность зрелых лимфоцитов. Сосуды полнокровны, структура клеток сохранена. Отмечаются признаки дегенерация ретикулоэпителия и мелкие фокусы некробиоза. При II степени тяжести СДС наблюдается относительное расширение корковых зон по сравнению с I степенью тяжести за счет средних лимфоцитов с примесью лимфобластов. Отмечается также полнокровие сосудов, структура клеток нарушена. Отмечается относительное усиление дегенеративных изменений ретикулоэпителия, расширение фокусов некроза. При III степени тяжести СДС граница между мозговым и корковым веществом слабо выражена. Клеточный состав представлен преимущественно плазматическими клетками и средними лимфоцитами с примесью макрофагов, структура клеток нарушена (рис. 3).

В селезенке при I степени тяжести СДС отмечается уменьшение размеров белой пульпы и увеличение доли красной пульпы. В фолликулах селезенки увеличено количество малых лимфоцитов. Сосуды полнокровны, в красной пульпе отмечается скопление плазмобластов и макрофагов. При II степени тяжести СДС отмечается появление в белой и в красной пульпе средних лимфоцитов с примесью плазматических клеток и относительное увеличение количества макрофагов преимущественно в фокусах некробиоза по сравнению с I степенью тяжести СДС. В капиллярах красной пульпы встречаются микротромбы. При III степени тяжести СДС наблюдается уменьшение размеров и количества лимфоидных фолликулов со снижением количества лимфоцитов разных стадий развития. Отмечается расширение красной пульпы, где наблюдается скопление гемолизированных эритроцитов с увеличением количества макрофагов в зоне некробиоза (рис. 4).

Очевидно, что компрессионная травма сопровождается выраженными изменениями структурно-функционального состояния органов иммунной системы и эти изменения зависят от степени тяжести СДС. Продукты рабдомиолиза, всасываясь в кровь, способствуют перераспределению циркулирующих лимфоцитов, увеличивая, в целом, их клеточную плотность в лимфоидных фолликулах (табл. 1).

Логично предположить, что состояние эндотоксикоза при СДС одновременно может вызывать активацию клеток иммунной системы. Одним из признаков подобного процесса является усиление «шеддинга» поверхностных мембранных структур Т- и В-лимфоцитов, соответственно, CD3G и CD19. Результаты изучения уровня растворимых CD3G и CD19, а также кортизола, в зависимости от степени тяжести СДС представлены в табл. 2.

Обращает на себя внимание статистически значимое увеличение уровня кортизола в сыворотке крови при

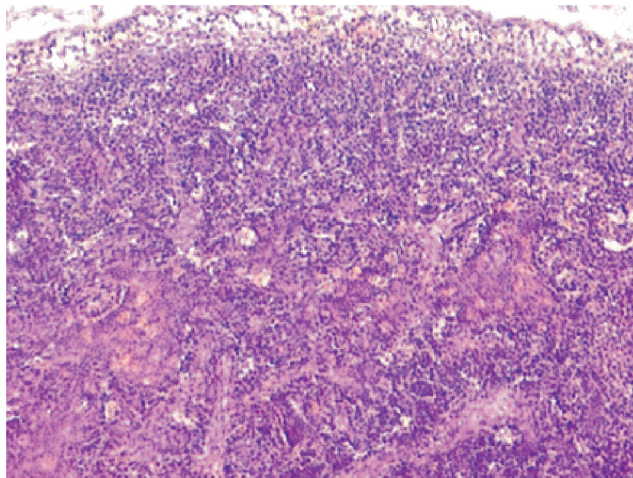


Рис. 3. Тимус при СДС III степени тяжести, ув.200.

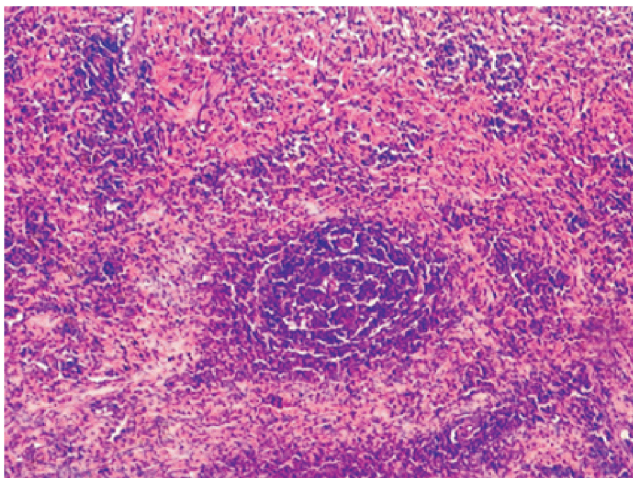


Рис. 4. Селезенка при СДС III степени тяжести, ув.200.

СДС любой степени тяжести по сравнению с контролем, что является отражением выраженной стресс-реакции на рабдомиолиз (табл. 2). Причём III степень тяжести СДС сопровождается ещё более выраженным, двукратным, увеличением уровня кортизола по сравнению с СДС I и II степени тяжести. Очевидно, что экстремальное повышение уровня кортизола в крови индуцирует стероид-опосредованный апоптоз лимфоцитов и уменьшение степени инфильтрации лимфоцитами лимфоидных органов — при II и III степенях тяжести СДС плотность лимфоцитов практически в два раза меньше по сравнению с I степенью тяжести СДС (табл. 1). Одновременно гиперкортизолемиа может способствовать формированию транзиторной лимфоцитопении. На этом фоне уровни растворимых CD3G и CD19 при всех степенях тяжести СДС статистически значимо превышают аналогичные показатели в контрольной группе. Факт крайне интересный. «Шеддинг» гликопротеинов CD3G и CD19 с поверхности T- и B-лимфоцитов свидетельствует о транзиторной активации этих клеток, вследствие эндотоксикоза с потенциалом аутоиммунного ответа на продукты рабдомиолиза. Обращает на себя внимание отсутствие вариаций уровня растворимых CD3G и CD19 в зависимости от степени тяжести СДС (табл. 2). Вероятно, T- и B-клетки «сбрасывают» растворимые CD3G и CD19 независимо от уровня сывороточных продуктов рабдомиолиза.

Известно, что воспаление является важным патогенетическим звеном СДС. Воспаление связано с реактивной активацией клеток иммунной системы. Помимо увеличения уровня растворимых CD3G и

CD19, признаком этой активации является и продукция провоспалительных цитокинов. Результаты изучения сывороточных уровней провоспалительных цитокинов при СДС различной степени тяжести представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, поведение TNF-α, ИЛ-6 и ИФ-γ, несмотря на то, что все они относятся к группе провоспалительных цитокинов, неоднозначно. Прежде всего, обращает внимание статистически значимое увеличение уровня TNF-α при любой степени тяжести СДС по сравнению с контрольной группой. Причём увеличение степени тяжести СДС сопровождается пропорциональным увеличением сывороточного уровня TNF-α. III степень тяжести СДС также ассоциирована с максимальным уровнем сывороточного кортизола (табл. 3) в нг/мл. Факт примечательный. Пропорциональное степени тяжести СДС увеличение сывороточного уровня TNF-α является следствием нарастания признаков системного воспаления при СДС. Одновременно, синергичное, максимальное увеличение уровня кортизола в сыровотке увеличивает эффективность апоптоза лимфоцитов, поскольку TNF-α-опосредованный апоптоз (так же, как и кортизол-опосредованный) — хорошо известные явления. Именно эти факты лежат в основе лимфоцитопении (табл. 1). Диаметрально противоположная ситуация определяется в отношении сывороточных уровней ИЛ-6 и ИФ-γ. Видно, что концентрация этих цитокинов превышает аналогичные показатели в контрольной группе, достигая уровня статистической значимости при I степени тяжести СДС. Примечательно, что увеличение степе-

Таблица 2

Уровень растворимых CD3G, CD19 и кортизола в сыровотке крови крыс при СДС I, II и III степени тяжести, Ме (25;75процентили)

Группы	CD3 G, нг/мл	CD19, нг/мл	Кортизол, нг/мл
I степень СДС, n = 15	0,4 (0,2;0,5)*	0,32 (0,2;0,38)*	25,5 (18,9;52)**
II степень СДС, n = 15	0,5 (0,45;0,8)*	0,3 (0,26;0,4)**	23 (21,46)**
III степень СДС, n = 15	0,5 (0,2;0,55)*	0,3 (0,28;0,34)**	44 (33,106)**
Контроль, n = 10	0,25 (0,2;0,3)	0,16 (0,1;0,2)	3 (2,5;3,0)

Примечание. *p<0,05, **p<0,01 по сравнению с контрольной группой (Т-критерий Манна-Уитни).

Таблица 3

Уровень провоспалительных цитокинов и кортизола в сыровотке крови крыс при СДС I, II и III степени тяжести, Ме (25;75 процентили)

Группы	TNF-α, пг/мл	ИФ-γ, пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	Кортизол, нг/мл
I степень СДС, n = 15	0,73 (0,3;1,5)*	0,97 (0,8;1,2)*	3,4 (2,4;4,2)*	25,5 (18,9;52)**
II степень СДС, n = 15	0,9 (0,5;1,7)**	0,8 (0,6;1,1)	3,2 (1,7;3,5)	23 (21,46)**
III степень СДС, n = 15	1,23 (0,5;1,6)*	0,75 (0,5;1,1)	2,6 (2,4;3,4)	44 (33,106)**
Контроль, n = 10	0,2 (0,14;0,3)	0,7 (0,5;0,9)	2,3 (1,8;2,8)	3 (2,5;3,0)

Примечание. *p<0,05, **p<0,01 по сравнению с контрольной группой (Т-критерий Манна-Уитни).

ни тяжести СДС связано с пропорциональным уменьшением уровня ИФ- γ и ИЛ-6 (табл. 3). Вероятно, усиление эндотоксикоза при увеличении степени тяжести СДС ингибирует продукцию этих цитокинов. Бесспорно, свой вклад в этот процесс вносит и нарастающая, соответственно степени тяжести СДС, абсолютная и относительная лимфоцитопения.

Заключение

Таким образом, на экспериментальной модели СДС показаны патогенетически важные изменения иммунологической реактивности, выражающиеся в абсолютной лимфоцитопении, реактивном перераспределении мононуклеаров периферической крови в органах иммунной системы, гиперпродукции провоспалительных цитокинов — ТНФ- α , ИФ- γ и ИЛ-6, гиперпродукции кортизола, увеличении сывороточных уровней растворимых CD3G и CD19. Последний факт свидетельствует об активации Т- и В-лимфоцитов. Компрессионная травма сопровождается выраженными изменениями структурно-функционального состояния органов иммунной системы, включая процессы инфильтрации, преимущественно фолликулов, лимфоцитами, полнокровия сосудов, некроза, некробиоза, дистрофических и дегенеративных изменений клеток лимфоидных органов. Эти изменения претерпевают этапность в соответствии со степенью тяжести СДС и происходят на фоне признаков системного воспаления как ответа на эндотоксикоз продуктами рабдомиолиза, достигающего своего максимума на этапе ревазуляризации мышечной ткани. Полученные результаты подтверждают перспективность дальнейших исследований проблемы СДС и, прежде всего, возможности применения средств иммунокоррекции с целью увеличения клинической эффективности лечебных мероприятий, принятых в медицине катастроф.

Сведения об авторах:

Далгатова Асера Арабхановна, аспирантка кафедры патофизиологии Даггосмедуниверситета
Курбанов Казбек Зайналабидович, доцент кафедры патофизиологии Даггосмедуниверситета
Гамзаева Айшат Увайсовна, доцент кафедры патофизиологии Даггосмедуниверситета

References

1. Gumanenko E.K. *Military surgery. [Vojenno polevaja hirurgia]*. Moscow: Meditsina; 2004. p.177-87. (in Russian)
2. Zimmerman J.L., Shen M.C. Rhabdomyolysis. *Chest*. 2013; 144(3): 1058-65.
3. Miziev I.A., Makhov M. Kh., Zhigunov A.K. et al. Personal prognosis of acute kidney injury in patients with concomitant trauma. *Meditsina katastrof*. 2014; 4(88): 18-20. (in Russian)
4. Flohe S.B, Flohe S, Schade F.U. Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. *Innate Immun*. 2008; 14(6): 333-44.
5. Stoecklein V.M, Osuka A, Lederer J.A. Trauma equals danger — damage control by the immune system. *J. Leukoc. Biol*. 2012; 92(3): 539-51.
6. Menzel C.L., Pfeifer R., Darwiche S.S. et al. Models of lower extremity damage in mice: time course of organ damage (Crush-syndrom) and immune response. *J. Surg. Res*. 2011; 166(2): 149-56.
7. Popovich P.G. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp. Neurol*. 1997; 377: 443-64.
8. Victorio S.C., Cartarozzi L.P., Hell R.C. et al. Decreased MHC I expression in IFN gamma mutant mice alters synaptic elimination in the spinal cord after peripheral injury. *J. Neuroinflammation*. 2012; 9: 88.
9. Walsh J.T. and Kipnis J. Regulatory T cells in CNS injury: the simple, the complex, and the confused. *Trends Mol Med*. 2011; 17(10): 541-47.
10. Sqarby M.W., Silva B.A., Peres C.M. et al. Leukocyte infiltration in lung, muscle and liver after limb compression in rats. *Pahtophysiology*. 2013; 20(2): 111-6.
11. Darwiche S, Ruan X., Hoffman M.K. Selective Roles for Toll-Like Receptors 2, 4 and 9 in the Systemic Inflammation and Immune Dysfunction Following Peripheral Tissue Injury. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013; 74(6): 1454-61.
12. Yang H., Hreggvidsdottir H.S, Palmblad K. et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(26):11942-7.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.002+612.017

Лазанович В.А.¹, Маркелова Е.В.¹, Просекова Е.В.¹, Кудрявцев И.В.², Смолина Т.П.³, Павлов В.А.¹

Анализ экспрессии C3aR, C5aR1(CD88) на миелоидных клетках у пациентов с сепсисом

¹ — ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 690002, г. Владивосток, Россия, просп. Острякова, д. 2

² — ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», 690091, г. Владивосток, Россия, ул. Суханова, д. 8

³ — ФБГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Сибирского отделения РАН, 690087, г. Владивосток, Россия, ул. Сельская, д. 1

Цель исследования — анализ уровня экспрессии C3aR, C5aR (CD88) на моноцитах и нейтрофилах миелоидного ряда у пациентов с сепсисом, в зависимости от тяжести течения заболевания. При септических состояниях C3a и C5a анафилотоксины выступают в роли одних из основных медиаторов воспаления, взаимодействуя с эффекторными клетками через C3aR и C5aR (CD88). Экспрессия C3aR, C5aR(CD88) на клетках миелоидного ряда, является важным патогенетическим звеном при генерализованном воспалении. **Методика.** В исследование было включено 32 пациента. Методом проточной цитометрии изучали уровень экспрессии C3aR, C5aR1(CD88) на моноцитах и нейтрофилах у пациентов с сепсисом и зависимость уровня экспрессии от тяжести течения заболевания. **Результаты.** Отмечено снижение экспрессии рецептора C5aR (CD88) на моноцитах и нейтрофилах у пациентов с сепсисом. В ходе наблюдения выявлены различия экспрессии рецептора C3aR со снижением на нейтрофилах и более высокими показателями на моноцитах относительно контрольной группы. Уровень экспрессии C3aR на моноцитах прямо коррелировал со степенью тяжести состояния у пациентов с хирургическим сепсисом. **Заключение.** Исследование данного маркера может быть использовано в качестве предиктора органной дисфункции и степени тяжести у септических пациентов.

Ключевые слова: система комплемента; C3aR; C5aR(CD88); нейтрофилы; моноциты; сепсис.

Для цитирования: Лазанович В.А., Маркелова Е.В., Просекова Е.В., Кудрявцев И.В., Смолина Т.П., Павлов В.А. Анализ экспрессии C3aR, C5aR1(CD88) на миелоидных клетках у пациентов с сепсисом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 72–77.

Для корреспонденции: Лазанович Владимир Анатольевич, канд. мед. наук, ассистент каф. клинической лаб. диагностики, общей и клинической иммунологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», e-mail: immuno2003@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.12.2015

Lazanovich V.A.¹, Markelova E.V.¹, Prosekova E.V.¹, Kudryavtsev I.V.², Smolina T.P.³, Pavlov V.A.¹

Analysis of expression C3aR, C5aR1 (SD88) on myeloid cells in patients with sepsis

¹ — State budget educational institute of higher professional education Pacific State Medical University of Ministry of health of Russia, 690002, Vladivostok, ul. Ostryakova 2

² — Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia 690091 Vladivostok, ul. Sukhanova 8

³ — G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Russia, 690087, Vladivostok, ul. Selskaya 1

The purpose. Analyze the importance of the level of expression S3aR, S5aR (SD88) on monocytes and neutrophils, myeloid series in patients with sepsis. Anaphylatoxins C3a and C5a act as one of the major mediators of inflammation by interacting with effector cells through C3aR and C5aR (CD88) when septic conditions occur. Expression C3aR, C5aR (CD88) on the cells of the myeloid series is an important pathogenetic link in generalized inflammation. **Methods.** The study included 32 patients and the level of expression C3aR, C5aR1(CD88) by flow cytometry on monocytes and neutrophils was examined in patients with sepsis, depending on the severity of the disease. **Results.** Decreased expression of the receptor C5aR1(CD88) on monocytes and neutrophils was seen in patients with sepsis. Differences in expression of the receptor C3aR with decline of neutrophils and higher rates on monocytes compared to the control group were revealed during the observation. The degree of expression on monocytes C3aR directly correlated with the degree of severity in patients with surgical sepsis. **Conclusion.** The study of this marker can be used as a predictor of organ dysfunction the degree of severity in patients with sepsis.

Keywords: complement system; C3aR; C5aR1(CD88); neutrophils; monocytes; sepsis.

For citation: Lazanovich V.A., Markelova E.V., Prosekova E. V., Kudryavtsev I.V., Smolina T.P., Pavlov V.A. Analysis of expression C3aR, C5aR1 (SD88) on myeloid cells in patients with sepsis. (*Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal*). 2017; 61(1): 72–77. (in Russ.).

For correspondence: Lazanovich Vladimir A., Ph.D., assistant of the Department of Clinical laboratory diagnostics, general and clinical immunology State budget educational institute of higher professional education Pacific State Medical University of Ministry of health of Russia, 690062, Russian Federation, Vladivostok, The stoletiya pr., 14-49. E-mail: immuno2003@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Lazanovich V.A. <http://orcid.org/0000-0003-0354-4890>

Markelova E.V. <http://orcid.org/0000-0001-5846-851X>

Prosekova E.V. <http://orcid.org/0000-0001-6632-9800>

Kudryavtsev I.V. <http://orcid.org/0000-0002-4324-8001>

Smolina T.P. <http://orcid.org/0000-0003-4505-3627>

Pavlov V.A. <http://orcid.org/0000-0002-1601-7996>

Received 25.12.2015

Введение

В настоящее время сепсис рассматривают как системный (генерализованный) воспалительный ответ на повреждение инфекционной природы, который приводит к дисфункции и полиорганной недостаточности всех систем организма. Несмотря на многочисленные фундаментальные и клинические исследования, патофизиология сепсиса остается не до конца понятной, а летальность при данной патологии достигает 20—50% [1]. Все это диктует необходимость дальнейших исследований и является актуальным вопросом современной медицины.

Значение активационных механизмов воспалительной реакции при септических состояниях велико [2]. Иммунный ответ на внедрение бактериальных агентов реализуется через механизмы врожденного иммунитета. Принято считать, что чрезмерная активация иммунитета приводит не только к запуску воспалительного каскада, но и потере механизмов контроля над воспалением [3]. Система комплемента является важным компонентом врожденного иммунитета, обеспечивает усиление фагоцитоза, прямой лизис бактерий, клиренс иммунных комплексов, индукцию и контроль воспаления. Ее запуск происходит немедленно после травмы или инфекции тремя основными путями классическим, альтернативным и лектиновым через взаимодействие C1q с маннозо-связывающим лектином (MBL-mannose-binding lectin) или пропердином, что приводит к развитию местной или системной активации комплемента с последующим выбросом и накоплением анафилатоксинов C3a и C5a. По-

следние являются медиаторами воспаления с широким спектром воздействия на различные типы клеток. Они стимулируют синтез активных форм кислорода макрофагами и нейтрофилами, высвобождение гистамина из тучных клеток и базофилов, повышают сосудистую проницаемость, сокращение гладких мышц, модулируют синтез IL-6 и TNF-альфа, В-лимфоцитами и моноцитами, стимулируют синтез эозинофильного катионного белка эозинофилами, являются мощным хемоаттрактантами для макрофагов, нейтрофилов, В- и Т-лимфоцитов, базофилов и тучных клеток. Во многих клинических исследованиях повышенный уровень содержания в плазме C3a и C5a связывают тяжелое течение и неблагоприятные исходы при септических состояниях, в связи с чем было выдвинуто предположение о важной роли анафилатоксинов в патогенезе сепсиса [4, 5]. C3a и C5a представляют собой катионные полипептиды, состоящие из 77 и 74 аминокислотных остатков соответственно. Они имеют пространственную спиралевидную структуру, стабилизированную 3 дисульфидными мостиками, что обеспечивает способность противостоять высоким температурам и предельным уровням pH, не теряя своей активности [6]. Механизмы регуляции данных биологически активных молекул в тканях жестко контролируются карбоксипептидазами, которые расщепляют C-концевой остаток аргинина и уже через несколько минут после образования, анафилатоксины, теряют свою активность. Эффекты для C3a и C5a опосредуются через их взаимодействие с клеточными рецепторами C3aR и C5aR1(CD88). C3aR данный рецептор экспрессируется на клетках миелоидного ря-

да нейтрофилах, базофилах, эозинофилах, тучных клетках, моноцитах/макрофагах, дендритных клетках, а также на эпителиальных, эндотелиальных, гладкомышечных клетках. С3aR специфично связывается с С3a, при этом никогда не распознает молекулу desArgC3a или С5a [7].

С5aR экспрессируется в основном на клетках миелоидного ряда, нейтрофилах, эозинофилах, базофилах, моноцитах/макрофагах, дендритных и тучных клетках, но может быть обнаружен на поверхности клеток эндотелия сосудов, астроцитов и клеток микроглии, в ткани и клетках почек, сердца, легких, печени, селезенки, эпителия кишечника и кожи [8]. С5aR1(CD88) связывается специфично с С5a и desArgC5a, с меньшей аффинностью. Изначально считалось, что в развитие сепсиса опосредовано через взаимодействие С5a с С5aR, но оказалось, что кроме этого в дополнение к С5aR участвует еще и С5L2, через который проводится сигнал от С5a. В случае тяжелого течения сепсиса ингибирование обоих рецепторов улучшало показатели выживаемости, что говорит о синергическом действии С5aR и С5L2 в развитии септического воспаления [9].

При септических состояниях С3a и С5a анафилоксины являются ключевыми провоспалительными медиаторами с плейотропным действием, которые запускают каскад клеточных событий и вносят существенный вклад в развитие полиорганной недостаточности при сепсисе. Это делает изучение межклеточного сигналинга С3a/С3aR и С5a/С5aR одним из перспективных направлений с точки зрения поиска стратегий в терапии тяжелого сепсиса и септического шока. Однако многие исследования носят экспериментальный характер, число клинических исследований, в которых изучалась зависимость тяжести течения сепсиса и степень выраженности С3aR и С5aR на миелоидных клетках весьма ограничено.

Цель исследования — анализ значения уровня экспрессии С3aR, С5aR (CD88) на моноцитах и нейтрофилах миелоидного ряда при сепсисе в зависимости от тяжести течения заболевания.

Методика

Представлены результаты проспективного исследования, проведенного на базе краевого Центра анестезиологии и реаниматологии, ГБУЗ Приморской краевой клинической больницы № 1 г.Владивостока. В исследование были включены 32 пациента от 18 до 72 лет, в первые 48 ч после установления диагноза сепсиса, в том числе тяжелого сепсиса (дисфункция органов) или септического шока (стойкая гипотензия) в соответствии с клиническими критериями (ACCP/SCCM Consensus Conference committee,

1992). Степень тяжести оценивали, используя интегральную шкалу APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation). Источниками септического процесса были воспалительные процессы в органах брюшной полости 68% (n = 22), легких 13% (n = 4) мочевыводящих путях 13% (n = 4), инфекции кожи 6% (n = 2). В контрольную группу вошли 19 клинически здоровых людей, сопоставимых по полу, возрасту и расовой принадлежности. Все исследования выполнены с информированного согласия пациентов в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г., и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденным приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г., № 266.

Критериями исключения являлись терминальное состояние (прогнозируемая гибель в течение 48 часов), риск летального исхода не связанного с сепсисом (тромбоэмболия, инфаркт миокарда, нарушения мозгового кровообращения), онкологические пациенты, получавшие иммуносупрессивную терапию или пациенты с ВИЧ-инфекцией.

Цитофлюориметрический анализ экспрессии активационных маркеров на популяции моноцитов и нейтрофилов выполняли в течение 2 ч после забора крови из периферической вены в пробирки с добавлением К3ЭДТА, на проточном цитометре «FACS Calibur BD» по стандартному протоколу в программе CellQuestPro. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток. Для анализа уровня экспрессии моноцитами и нейтрофилами рецепторов для анафилоксинов использовали антитела против С3aR (клон hC3aRZ8, кат № 345804) и С5a1(CD88) (клон S5/1, кат. № 344304), конъюгированные с фикоэритрином (производства BioLegend, Inc., США). Количественную оценку уровня экспрессии исследуемых поверхностных рецепторов проводили по средней интенсивности флуоресценции (MFI - mean fluorescence intensity). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы «StatPlus 2010». Для сравнения параметров использовали U-критерий Манна—Уитни. Для оценки взаимосвязей между показателями использовали метод ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

На рис. 1,А и 1,Б представлены гистограммы распределения моноцитов и нейтрофилов соответственно в зависимости от экспрессии молекул С3aR у пациентов и здоровых доноров. В ходе наблюдения были выявлены различия экспрессии рецептора С3aR на миелоидных клетках у пациентов с сепсисом по срав-

нению с группой контроля. Их уровень на моноцитах был существенно выше у септических пациентов по сравнению с группой здоровых лиц (рис. 1,Б), различия между группами носили статистически значимый характер. На нейтрофилах выявлены противоположные результаты. Уровень экспрессии (MFI) C3aR у пациентов (рис. 1,Г), по сравнению с контрольной группой был статистически значимо более низким.

Анализируя полученные результаты по экспрессии C5aR(CD88) на клетках миелоидного ряда, отмечено статистически значимое снижение экспрессии данного маркера на моноцитах периферической крови у пациентов с сепсисом по сравнению с контрольной группой (рис. 2,В). Тот же тренд был выявлен в отношении нейтрофилов (рис. 2,Г), существенно более низкие значения экспрессии данного рецептора комплекса зафиксированы у пациентов в сравнении с группой контроля ($p < 0,001$). Полученные данные согласуются с ранее проведенными клиническими исследованиями, где также были зафиксированы более низкие значения MFI C5aR (CD88) на миелоидных клетках у септических пациентов [10]. На рис. 2,А и 2,Б представлены гистограммы распределения моноцитов и нейтрофилов, в зависимости от экспрессии молекул C5aR у пациентов и здоровых доноров.

При анализе зависимости экспрессии рецепторов комплекса на клетках миелоидного ряда от тяжести сепсиса, было установлено несколько важных фактов. При оценке корреляционных взаимосвязей экспрессии (MFI) C3aR и степени тяжести состояния по шкале АРАСНЕ II в баллах было выявлено: чем выше уровень экспрессии данного рецептора на моноцитах, тем более тяжелое течение септического процесса (рис. 3,А), связь прямая, средней силы, статистически значимая ($R = 0,615$, $\rho = 0,002$). Никакой взаимосвязи между уровнем экспрессии данного рецептора на нейтрофилах и течением заболевания не обнаружено (рис. 3,Б). Выявлена обратная, средней силы корреляционная зависимость экспрессии на нейтрофилах C5aR1(CD88) и тяжести септического процесса (рис. 3,Г), ($R = -0,317$, $\rho = 0,161$).

В последние годы одним из направлений исследований при сепсисе является разработка терапевтических стратегий с целью воздействия на систему комплекса. Помимо введения C-1 ингибитора и моноклональных антител с целью нейтрализации анафилоксинов C3a, C5a, было использовано антагонистов клеточных рецепторов C3aR и C5aR. Целесообразность такого подхода подтверждали результаты экспериментальных исследований [11]. Например, использование анти-C5a антител снижало биологические эффекты и смертность на моделях крыс при введении эндотоксина [12]. Кроме того, в эксперименте была показана повышенная экспрессия C5aR на гра-

нулоцитах, что укладывалось в концепцию значимости компонент опосредованных реакций в патофизиологии сепсиса. Но немногочисленные клинические работы, в том числе и результаты этого исследования, показали прямо противоположное. Установлено более низкое содержание C5aR на нейтрофилах и моноци-

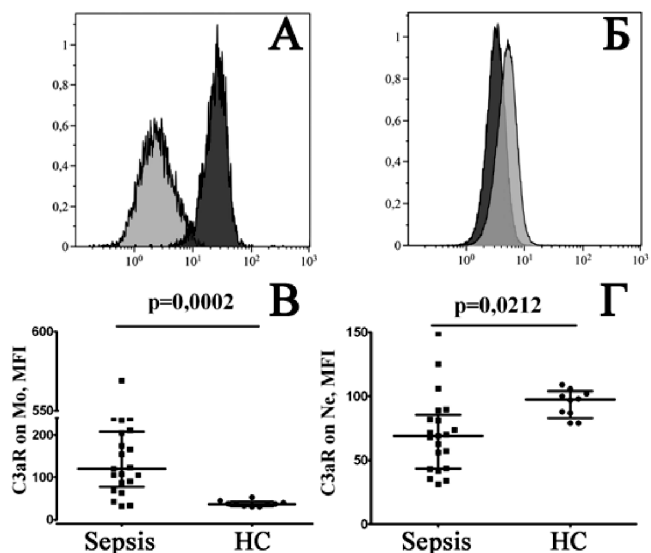


Рис. 1. Гистограммы. Распределение моноцитов (А) и нейтрофилов (Б) в зависимости от экспрессии молекул C3aR у условно здорового донора (светло-серый – образец) и пациента с сепсисом (темно-серый – образец). Уровень экспрессии (MFI) C3aR на моноцитах (В) и нейтрофилах (Г) здоровых лиц (Healthy controls) и пациентов с сепсисом (sepsis).

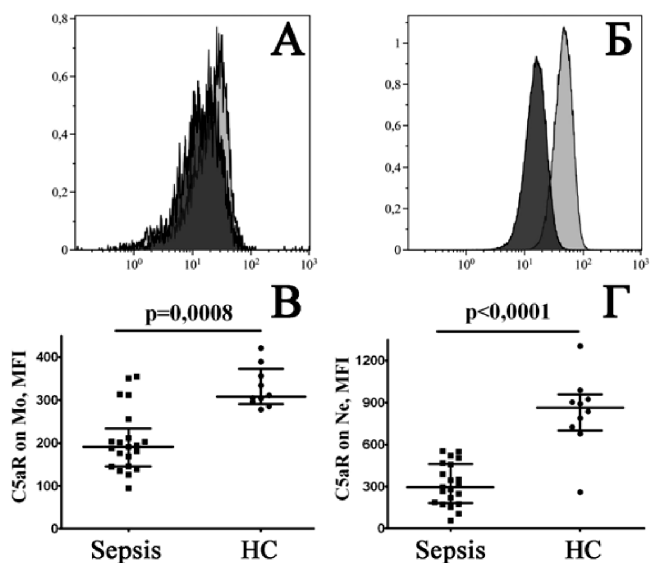


Рис. 2. Гистограммы. Распределение моноцитов (А) и нейтрофилов (Б) в зависимости от экспрессии молекул C5aR1(CD88) у условно здорового донора (светло-серый – образец) и пациента с сепсисом (темно-серый – образец). Уровень экспрессии (MFI) C5aR1(CD88) на моноцитах (В) и нейтрофилах (Г) здоровых лиц (Healthy controls) и пациентов с сепсисом (sepsis).

тах у пациентов с сепсисом в сравнении со здоровыми людьми. Возможно, это связано с интернализацией комплекса лиганд — C5aR, что делает клетки устойчивыми к последующей стимуляции C5a [13] или является регулирующим механизмом клеточного сигналинга C5a/C5aR на эффекторных клетках в условиях дисбаланса воспалительных стимулов.

Помимо C5a анафилотоксина в иммунопатогенезе сепсиса большую роль играет C3a. Известно, что его высокое содержание в плазме характерно для септических пациентов и коррелирует с частотой летальных исходов [14]. В то же время, в некоторых исследованиях отмечено, что уровень содержания C3a в плазме снижается после госпитализации, несмотря на течение септического процесса, и высказано предположение, что это больше согласуется с его защитными функциями [15]. В связи с этим необходимо отметить, хотя C3a на 36% по своей структуре гомологичен с C5a, эффекты, вызываемые этими двумя анафилотоксинами не тождественны. Есть данные, что C3a может иметь как провоспалительные, так и протективные свойства. Так, например, было продемонстрировано, что мыши с дефицитом C3aR более чувствительны к эндотоксиновому шоку, который сопровождался значительным увеличением провоспалительных цитокинов в плазме. Важная протективная роль C3aR показана и в естественных условиях, когда он выступает как противовоспалительный рецептор [16]. Кроме того, взаимодействие C3a и C3aR стимулирует выработку противовоспалительных гормонов гипофиза, пролактина, гормона роста, адренокортикотропина, тем самым контролируя воспалительный процесс через центральную нервную систему, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось [17].

Проводя анализ полученных результатов по C3aR на миелоидных клетках, обращает внимание разный тренд их экспрессии на моноцитах и нейтрофилах относительно контрольной группы. Кроме того, степень выраженности MFI C3aR на моноцитах прямо коррелировала со степенью органной дисфункции у септических пациентов. В доступной литературе мы не нашли клинических исследований такого рода, поэтому полученные результаты представляют особый интерес, и работа в данной области будет продолжена. Возможно, степень экспрессии C3aR на моноцитах и нейтрофилах объясняет их разную функцию и роль при системном воспалении. Недавно было показано, что сигнализация C3a/ C3aR подавляет экспрессию Fas-рецептора и каспазы-3, увеличивая антиапоптотический фактор Bcl-2, чем обеспечивает защиту миелоидных и лимфоидных клеток от листерий-индуцированного апоптоза [18]. Не исключено, что снижение экспрессии C3aR отменяет этот протективный эффект и способствует повышенному апоптозу нейтрофилов в условиях сепсиса. С другой стороны, известно, что C3a способен оказывать регулирующее влияние на секрецию моноцитами и В-лимфоцитами TNF- α (фактор некроза опухоли) и IL-6 (интерлейкин 6) [19]. Повышенная экспрессия C3aR на моноцитах при сепсисе, выявленная в нашем исследовании, возможно, отражает вклад данных клеток в комплемент индуцированный цитокиновый шторм при сепсисе. Прямая сильная корреляционная связь, между уровнем экспрессии C3aR на моноцитах и тяжестью состояния у пациентов с хирургическим сепсисом, косвенно подтверждает это предположение.

Заключение

Система комплемента имеет ключевое значение в активации механизмов врожденного иммунитета при бактериальном повреждении. Экспрессия C3aR, C5aR1(CD88) на эффекторных клетках миелоидного ряда, является важным патогенетическим звеном при генерализованном воспалении. Отмечено снижение экспрессии рецептора C5aR1(CD88) моноцитах и нейтрофилах у пациентов с сепсисом. В ходе наблюдения выявлены различия экспрессии рецептора C3aR со снижением на нейтрофилах и более высокими показателями на моноцитах относительно контрольной группы. Экспрессия C3aR на моноцитах и нейтрофилах при сепсисе, возможно, отражает разные механизмы и роль при системном воспалении. Это предположение нуждается в дальнейших экспериментальных и клинических исследованиях. Степень выраженности (MFI) C3aR на моноцитах прямо коррелирует со степенью тяжести состояния. Исследование данного маркера имеет не только теоретическую, но и

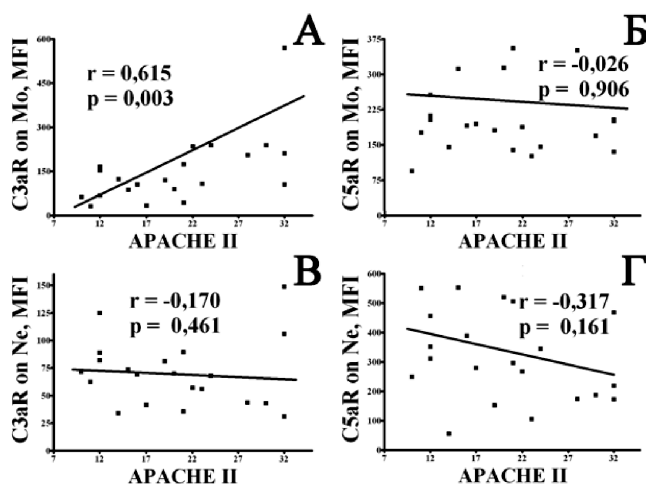


Рис. 3. Корреляция между уровнем экспрессии (MFI) C3aR на моноцитах (А), нейтрофилов (В), уровнем экспрессии(MFI) C5aR1(CD88) на моноцитах (Б), нейтрофилов (Г) и тяжестью состояния в баллах по шкале APACHE II у пациентов с сепсисом.

практическую значимость и может быть использовано в качестве предиктора органной дисфункции у септических пациентов.

References

1. Gaieski D.F., Edwards J.M., Kallan M.J. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit. Care Med.* 2013; 41(5): 1167-74.
2. Lazanovich V.A., Markelova E.V., Smirnov G.A., Pavlov V.A. Toll-Receptors on monocytes and clinical relevance in patients with sepsis. *Russkiy immunologicheskiy Zhurnal.* 2014; 8: 825-8. (in Russian)
3. Lazanovich V.A., Smirnov G.A., Ishchenko V.N. Cytokines dynamics as a factor in the pathogenesis of a surgical sepsis. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2005; 4: 50-52. (in Russian)
4. Burk A.M., Martin M., Flierl M.A. Early complementopathy after multiple injuries in humans. *Shock.* 2012; 37(4): 348-54.
5. Ward P.A. Role of the complement in experimental sepsis. *J. Leukoc Biol.* 2008; 83(3): 467-70.
6. Georgia Sfyroera., Madan Katragadda., Dimitrios Morikis. Electrostatic Modeling Predicts the Activities of Orthopoxvirus Complement Control Proteins. *J. Immunol.* 2005; 174(4): 2143-51.
7. Bajic Goran., Yatime Laure., Klos Andreas. Human C3a and C3a desArg anaphylatoxins have conserved structures, in contrast to C5a and C5a desArg. *Protein Sci.* 2013; 22(2): 204-12.
8. Fayyazi A., Scheel O., Werfel T. The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells. *Immunology.* 2000; 99(1): 38-45.
9. Rittirsch D., Flierl M.A., Nadeau B.A. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med.* 2008; 14(5): 551-57.
10. Mia Furebring., Lena Douhan Hakansson., Per Venge. Expression of the C5a receptor (CD88) on granulocytes and monocytes in patients with severe sepsis. *Crit. Care.* 2002; 6(4): 363-70.
11. Huber-Lang M.S., Younkin E.M., Sarma J.V. Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. *J. Immunol.* 2002; 169(6): 3223-31.
12. Strachan A.J., Woodruff T.M., Haaime G. A new small molecule C5a receptor antagonist inhibits the reverse-passive Arthus reaction and endotoxin shock in rats. *J. Immunol.* 2000; 164(12): 6560-65.
13. Van Epps D.E., Simpson S., Bender J.G. Regulation of C5a and formyl peptide receptor expression on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 1990 144(3): 1062-68.
14. Hartemink K.J., Groeneveld A.B. The hemodynamics of human septic shock relate to circulating innate immunity factors. *Immunol. Invest.* 2010; 39(8): 849-62.
15. Charchafli J., Wei J., Labaze G., Yunfang Joan Hou. The Role of Complement System in Septic Shock. *Clin. Dev. Immunology.* 2012, Article ID 407324, 8 pages.
16. Kildsgaard J., Hollmann T.J., Matthews K.W. Cutting edge: targeted disruption of the C3a receptor gene demonstrates a novel protective anti-inflammatory role for C3a in endotoxin-shock. *J. Immunol.* 2000; 165(10): 5406-09.
17. Francis K., Lewis B.M., Akatsu H., Monk P.N. Complement C3a receptors in the pituitary gland: a novel pathway by which an innate immune molecule releases hormones involved in the control of inflammation. *FASEB J.* 2003; 17(15): 2266-68.
18. Stacey L., Mueller-Ortiz., John E. Morales. The Receptor for the Complement C3a Anaphylatoxin (C3aR) Provides Host Protection against *Listeria monocytogenes* Induced Apoptosis. *J. Immunol.* 2014; 193(3): 1278-89.
19. Fischer W.H., Hugli T.E. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J. Immunol.* 1997; 159(9): 4279-86.

Сведения об авторах:

Маркелова Елена Владимировна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. физиологии человека, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»

Просекова Елена Владимировна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»

Кудрявцев Игорь Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., ВПО «Дальневосточный федеральный университет»

Смолина Татьяна Павловна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАН

Павлов Василий Алексеевич, канд. мед. наук, доцент каф. реанимации, анестезиологии, интенсивной терапии и скорой медицинской помощи, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»

© Коллектив авторов, 2017

УДК 616.381-002-06.236-092.9: 611.018.74

Терещенко О.А.¹, Боташев А.А.¹, Помещик Ю.В.³, Сергиенко В.И.², Петросян Э.А.¹

Состояние эндотелия сосудов при экспериментальном желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом

¹ — ФГБОУ ВО МЗ РФ «Кубанский государственный медицинский университет», 350063, г. Краснодар, ул. Седина, д.4² — ФГБУ «Научно-клинический центр физико-химической медицины», ФМБА России, 119435, г. Москва, Малая Пироговская, д.1а³ — Институт молекулярных наук им. А.И. Виртанена, Университет Восточной Финляндии (P.O. Box 1627, 70211, г. Куопио, Финляндия)

Цель исследования — изучение механизма развития эндотелиальной дисфункции (ЭД) при экспериментальном желчном перитоните (ЖП), осложненном абдоминальным сепсисом. **Методика.** Эксперименты выполнены на 24 собаках массой $13,7 \pm 1,2$ кг. Животные разделены на 2 группы. В контрольную группу для определения лабораторных показателей нормы включено 24 собаки, из которых 4 были выведены из опыта после забора желчи из желчного пузыря. В основную группу вошло 20 оставшихся животных с моделью 24-часового ЖП, осложненного абдоминальным сепсисом. Суть модели заключалась в предварительном создании очага деструкции мягких тканей на наружной поверхности тазовой конечности, путем внутримышечного введения 10% раствора CaCl_2 из расчета 0,25 мл/кг. Через 48 ч после создания очага деструкции в брюшную полость трижды, через каждые 8 ч вводили полученную от животных желчь из расчета 1,5 мл/кг. В крови определяли количество десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ) [8], содержание метаболитов оксида азота (NO) [8], уровень фактора Виллебранда (vWF) и эндотелина-1 (Et-1) методом ИФА с использованием наборов («Cusabio Biotech» Canine Elisa Assay Kit). **Результаты.** В ходе исследования установлено повышение количества ДЭ в крови в 3,25 раза, Et-1 в 1,55 раза, vWF в 1,3 раза и продукции NO в 1,37 раза относительно контроля. **Заключение.** Получены убедительные данные, что в ранние сроки развития экспериментального желчного перитонита, осложненного абдоминальным сепсисом, происходит нарушение структурно-функциональной организации эндотелия сосудов, являющееся отражением системной воспалительной реакции с появлением в крови высокоспецифичных маркеров эндотелиальной дисфункции, которые можно рассматривать в качестве нового направления диагностики в абдоминальной хирургии.

Ключевые слова: желчный перитонит, абдоминальный сепсис, эндотелиальная дисфункция.

Для цитирования. Терещенко О.А., Боташев А.А., Помещик Ю.В., Сергиенко В.И., Петросян Э.А. Состояние эндотелия сосудов при экспериментальном желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 78—81.

Для корреспонденции: Петросян Эдуард Арутюнович, доктор мед. наук, проф. каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ, e-mail: superego_ksmu@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 23.06.2016

Tereschenko O.A.¹, Botashev A.A.¹, Pomeschik U.V.³, Sergienko V.I.², Petrosyan E.A.¹

State vascular endothelium in experimental biliary peritonitis, a complication of abdominal sepsis

¹ — Federal State Educational Establishment Higher Education Ministry of Health of the Russian Federation «Kuban State Medical University», 350063, Krasnodar, Sedin, 4² — Federal State Institution «Scientific-Clinical Center of Physical-Chemical Medicine» FMBA Russia, 119435, Moscow, Malaya Pirogov, 1a³ — Institute for Molecular Sciences them. Al Virtanen, University of Eastern Finland (P.O. Box 1627, 70211 Kuopio, Finland)

The purpose of research — to study the mechanism of the development of endothelial dysfunction (ED) in experimental bile peritonitis (DGP), complicated abdominal sepsis. **Methods.** The experiments were performed on 24 dogs, weighing $1,2 \pm 13,7$ kg. The animals were divided into 2 groups. In a control group to determine the rate of laboratory parameters included 24 animals, of which 4 were derived from the experience of collection of bile from the gallbladder. The study group included 20 remaining animals with a model 24-hour gallbladder complicated with abdominal sepsis. The essence of the model was to create pre-chamber soft tissue destruction in the outer surface of the pelvic limbs, by intramuscular injection of 10% CaCl_2 solution at the rate of 0.25 ml/kg. At 48 hours after creation chamber in the abdominal cavity degradation thrice after every 8 hours the animals received it introduced bile rate of 1.5 ml/kg. The blood was determined by the number of desquamated endothelial cells (DE) [8], the content of nitric oxide metabolites (of NO) [8], the level of von Willebrand

factor (of vWF) and endothelin-1 (of Et-1) ELISA using kits («Cusabio Biotech» Canine Elisa Assay Kit). **Results.** During the study animals with a 24-hour JP, abdominal sepsis complicated by increasing the number set in the blood of 3.25 times DE, Et-1 1.55 times, vWF and 1.3 times the NO production in 1.37 times the animal group intact. **Conclusion.** There is good evidence that in the early stages of development of experimental bile peritonitis, complicated abdominal sepsis, there is damage to the structural and functional organization of the vascular endothelium, which are a reflection of the systemic inflammatory response with the appearance in the blood of highly specific markers of endothelial dysfunction, which can be regarded as a new diagnostic areas in the abdominal surgery.

Keywords: bile peritonitis, abdominal sepsis, endothelial dysfunction.

For citation. Tereshchenko O.A., Botashev A.A., Pomeschik Y.V., Sergienko V.I., Petrosyan E.A. Status of vascular endothelium in experimental bile peritonitis, complicated abdominal sepsis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61 (1): 78—81. (in Russ.).*

For correspondence: Edward A. Petrosyan, Dr. med., professor of topographic anatomy and operative surgery Federal State Educational Establishment Higher Education Ministry of Health of the Russian Federation «Kuban State Medical University» Health Ministry; e-mail: superego_ksmu@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Received 23.06.2016

Введение

Проблема желчного перитонита актуальна на фоне мировой тенденции роста количества больных с желчнокаменной болезнью, которой страдают 10—15% населения земного шара [1—3]. В мире ежегодно выполняется до 2,5 млн операций при желчнокаменной болезни. Большинство операций проводится лапароскопически, осложнения, при которых встречаются в 1,5 раза чаще, чем при открытых операциях. Одним из серьезных осложнений при лапароскопических операциях является желчный перитонит, который встречается в 0,5% случаев, но летальность при этом осложнении достигает 10—34% [4—6].

В основе неудачных результатов лечения перитонита лежит эндотелиальная дисфункция, которая является одним из универсальных механизмов в патогенезе многих заболеваний. Одновременно стали появляться статьи, в которых ставится вопрос: «Почему в течение первых 5 лет после перенесенного перитонита в молодом возрасте у 35% пациентов внезапно возникают различные сердечно-сосудистые заболевания, из которых 65% пациентов умирают от их осложнений в течение 10 лет?» [7]. Изучение механизмов развития эндотелиальной дисфункции при экспериментальном желчном перитоните представляет особый интерес в диагностике и профилактике развития сердечно-сосудистых осложнений в абдоминальной хирургии.

Цель исследования — изучение механизма развития эндотелиальной дисфункции при экспериментальном желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом.

Методика

Эксперименты выполнены на 24 собаках, массой $13,7 \pm 1,2$ кг. Животные были разделены на 2 группы. В контрольную группу для определения лабораторных показателей нормы включены 24 собаки, из которых 4 были выведены из опыта после забора желчи из желчного пузыря. В основную группу вошли 20 оставшихся животных с моделью 24-часового желчного перитонита. Суть модели заключалась в предварительном создании очага деструкции мягких тканей на наружной поверхности тазовой конечности, путем внутримышечного введения 10% раствора хлорида кальция из расчета 0,25 мл/кг. Через 48 ч после создания очага деструкции в брюшную полость трижды вводили полученную у животных желчь из расчета 1,5 мл/кг. Введение желчи осуществляли через каждые 8 ч.

В крови определяли количество десквамированных эндотелиоцитов (ДЭ) [8], содержание метаболитов оксида азота (NO) [8], уровень фактора Виллебранда (vWF) и эндотелина-1 (Et-1) методом ИФА с использованием наборов («Cusabio Biotech» Canine Elisa Assay Kit) для лабораторной диагностики у собак в соответствии с протоколами фирмы разработчика на аппарате Stat Fax 4200 (США). Исследования проводили до и после воспроизведения у животных желчного перитонита. Исследования проводились в соответствии с основными правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Министерства соцразвития России №708н от 23.08.2010 г. и принципами Хельсинской Декларации Всемирной медицинской ассоциации 1989 г.

Статистический анализ выполнен в программе «Statistica 6.0 for Windows». Оценку статистической значимости различий для нормально распределенных признаков проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для выяснения взаимосвязей между показателями применялся метод корреляционного анализа по Спирмену.

Результаты и обсуждение

Состояние животных с 24-часовым желчным перитонитом было охарактеризовано как тяжелое. При лапаротомии в брюшной полости определялось до 200—250 мл мутного серозно-фибринозного выпота с примесью желчи с запахом кишечной палочки, что может быть результатом транслокации микроорганизмов из просвета кишечника в брюшную полость с развитием портальной бактериемии (абдоминального сепсиса) [10]. При макроскопическом осмотре брюшина тусклого цвета, отечна с множественными очагами геморагии, покрытыми фибрином.

Общеизвестно, что мишенями флогогенных цитокинов в крови при острых хирургических заболеваниях в первую очередь являются эндотелиоциты сосудистой стенки [11].

В ходе исследования у животных с 24-часовым желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом, установлено статистически значимое повышение количества десквамированных эндотелиоцитов в плазме крови (в 3,25 раза относительно животных интактной группы) и уровня эндотелина-1 в 1,55 раза (см. таблицу).

Увеличение количества десквамированных эндотелиоцитов может быть результатом повреждения эндотелия сосудов, в то время, как повышение концентрации эндотелина-1, направленно на регулирование процессов неоангиогенеза сосудов в ответ на повреждение эндотелия. Подобное объяснение находит подтверждение в работе [12], в которой указывается, что эндотелин-1 образуется под действием многих факторов (активные формы кислорода, адреналин, тромбин, ангиотензин, вазопрессин) и секретируется

в толщу сосудистой стенки, где расположены специфические высокоаффинные рецепторы.

Все вещества, секретируемые эндотелием и участвующие в гемостазе и тромбозе, можно, в известной степени условно, разделить на 2 группы — тромбогенные и атромбогенные. К тромбогенным веществам, инициирующим адгезию и агрегацию тромбоцитов, относится фактор Виллебранда [13], который связывает субэндотелиальный коллагеновый матрикс и тромбоцитарный рецептор и, таким образом, обеспечивает прикрепление тромбоцитов к поврежденному участку эндотелия сосудистой стенки [14].

Так, у животных с экспериментальным желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом, отмечается статистически значимое повышение содержания фактора Виллебранда в плазме крови (в 1,3 раза) относительно животных интактной группы (таблица), что может служить маркером эндотелиальной дисфункции и повышенного риска тромбообразования. При проведении корреляционного анализа у животных с желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом, установлена сильная прямая корреляционная связь между количеством десквамированных эндотелиоцитов и уровнем эндотелина-1 с одной стороны, и концентрацией фактора Виллебранда ($r = 0,88, p < 0,001$ и $r = 0,76, p < 0,01$), с другой, что свидетельствует о патогенетической зависимости факторов повреждения эндотелия сосудистой стенки от концентрации фактора Виллебранда, который способствует уменьшению проницаемости сосудов, путем адгезии тромбоцитов к эндотелию.

Таким образом, указанные факторы могут служить маркерами подтверждения эндотелиальной дисфункции при желчном перитоните, осложненном абдоминальным сепсисом и отражать степень прогрессирования заболевания и его прогноз.

Общеизвестно, что эндотелиальные клетки чувствительны к различным повреждающим факторам (свободные радикалы, воспалительные цитокины и др.). Наиболее вероятным механизмом, повреждающим в эндотелии при перечисленных негативных факторах, является активация синтеза индуцибельной NO-синтазы нейтрофилами/макрофагами в ответ на инфекцию [15].

Таблица

Исследуемые показатели контрольных животных и животных основной группы с экспериментальным желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом

Исследуемые показатели	Исследуемые группы животных	
	Контрольная группа	Основная группа
ДЭ, $\times 10^4$ /л	$3,2 \pm 0,2$	$10,4 \pm 0,7^*$
Et-1, пг/мл	$31,1 \pm 1,6$	$48,2 \pm 2,3^*$
vWF, хМЕ/мл	$1,39 \pm 0,2$	$1,84 \pm 0,1^*$
NO, мкмоль/л	$3,88 \pm 0,10$	$5,30 \pm 0,18^*$

Примечание. * — статистически значимые отличия от показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

В ходе исследования у животных с экспериментальным желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом установлено статистически значимое увеличение продукции оксида азота в крови (в 1,37 раза) относительно животных контрольной группы (таблица). Полученный результат можно объяснить, как активацией индуцибельной NO-синтазы макрофагами/нейтрофилами при транслокации микрофлоры из просвета тонкой кишки в брюшную полость и далее в кровяное русло, так и реакцией париетальной брюшины на рефлекторную боль вызванную введением желчи в брюшную полость. Не исключено, что гиперпродукция оксида азота с одной стороны, направлена на уничтожение микрофлоры и окисление токсинов, а с другой стороны — на ингибирование экспрессии тканевого фактора, молекул клеточной адгезии, агрегации тромбоцитов и каскадных расстройств в системе гемостаза. При проведении корреляционного анализа у животных с желчным перитонитом, осложненным абдоминальным сепсисом установлена сильная прямая корреляционная связь между содержанием оксида азота и уровнем эндотелина-1 в крови ($r = 0,82$, $p < 0,001$), что может свидетельствовать о запуске механизма нейтрализации болевого вазоконстрикторного эффекта эндотелина-1, вазодилаторным эффектом оксида азота. Все это указывает, что гиперпродукция оксида азота, не только отражает процессы, происходящие в очаге повреждения эндотелия сосудов, но и влияет на выраженность воспалительного процесса и исход заболевания.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в ранние сроки развития экспериментального желчного перитонита, осложненного абдоминальным сепсисом, происходит повреждение структурно-функциональной организации эндотелия сосудов, являющееся отражением системной воспалительной реакции с появлением в крови высокоспецифичных маркеров эндотелиальной дисфункции, которые можно рассматривать в качестве нового направления диагностики в абдоминальной хирургии.

Сведения об авторах:

Терещенко Олег Анатольевич, доктор мед. наук, доцент каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ

Боташев Алибек Амырбиевич, доктор мед. наук, каф. топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ

Помещик Юрий Владимирович, канд. мед. наук, науч. сотр. Института молекулярных наук им. А.И. Виртанена, Университет Восточной Финляндии (Куопио, Финляндия)

Сергиенко Валерий Иванович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, научный руководитель ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва

References

- Galperin E.I., Vetshev P.S. *Guidelines for biliary tract surgery*. Moscow: Vidar; 2006. (in Russian)
- Vetshev P.S. *Guidelines for biliary tract surgery*. Moscow: Vidar; 2006. (in Russian)
- Grigorieva I.N., Malyutina S.K., Voevoda M.I. Role of hyperlipidemia in cholelithiasis. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2010; 4: 64-8. (in Russian)
- Bagnenko S.F., Mosyagin V.B., Karpova E.A. Bile peritonitis as a complication of laparoscopic cholecystectomy. *Endoscopic surgery*. 2000; 2: 6-7. (in Russian)
- Kurbonov K.M., Daminova N.M., Abdulloev D.A., Isoev A.O. Surgical treatment of patients with complicated forms of cholelithiasis. *Surgery*. 2007; 8: 38-2. (in Russian)
- Amorotti C., Mosca D., Di Blasio P. Spontaneous and postoperative bile peritonitis. Surgical technique. *Minerva Chir*. 2002; 57(1): 41-9.
- Savelyev V.S., Petukhov V.A. Endothelial dysfunction: state of the art. *Surgery*. 2008; 1: 3-11. (in Russian)
- Petrishchev N.N. *Endothelial dysfunction. Causes, mechanisms pharmacological correction* / under. Ed. N.N. Petrishcheva. St. Petersburg. 2003; 184. (in Russian)
- Golikov P.P., Nikolaeva N.Yu., Gavrilenko I.A. et al., Nitric oxide and lipid peroxidation as factors of endogenous intoxication in case of emergency. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2000; 2: 6-9. (in Russian)
- Botashev A.A., Tereshchenko O.A., Petrosyan E.A. Status of the bacterial ecosystem of the small intestine in animals with experimental bile peritonitis. *Journal of intensive care*. 2012; 5: 5-7. (in Russian)
- Abakumov M.M., Bulova G.V., Borovkova M.V., Grabbing V.B. Clinical evaluation of immune parameters in surgical patients with systemic inflammatory response syndrome. *Surgery*. 2007; 8: 24-8. (in Russian)
- Petrishchev N.N., Vlasov T.D. Physiology and pathophysiology of endothelium. *Endothelial dysfunction. Causes, mechanisms pharmacological correction* / under. Ed. N.N. Petrishcheva. St. Petersburg. 2003; 32-7. (in Russian).
- Andreotti F., Roncaglioni C., Hackett D.R. et al. Early coronary reperfusion blunts the procoagulant response of plasminogen activator inhibitor-1 and von Willebrand factor in acute myocardial infarction. *J. Amer. Coll. Cardiology*. 1990; 16: 1553-60.
- Haines A.P., Howarth D., North W.R.S. et al. Haemostatic variables and the outcome of myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 1983; 50: 800-3.
- Nathan C, Xie Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 13725-8.

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092.9+612.226+615.23

Куликов О.А., Пятаев Н.А., Инчина В.И., Минаева О.В.

Влияние внутривенного введения липосомальной формы ацетилцистеина на функциональное состояние дыхательной системы крыс при остром повреждении лёгких

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», 430005, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68

Цель исследования — изучение влияния однократного внутривенного введения липосомальной формы ацетилцистеина (АЦЦ) на функцию внешнего дыхания у крыс с острым повреждением лёгких. **Методика.** Липосомальная форма ацетилцистеина была получена из лецитина и холестерина; ацетилцистеин вносили в липосомы путём пассивной загрузки. Суммарная доза АЦЦ для подопытных животных составила 25 мг/кг. Исследование проводилось в сравнительном аспекте. В группе сравнения применялось в качестве лечебного средства однократное внутривенное введение дексаметазона в дозе 6 мг/кг. Моделирование острого повреждения лёгких осуществляли путем однократного интратрахеального введения крысам ацетона в дозе 0,1 мл/кг. **Результаты.** Показано, что липосомальный ацетилцистеин и препарат сравнения — дексаметазон, эффективно снижают летальность при остром повреждении лёгких. Наиболее высокой выживаемость подопытных животных в 1-е сут. после острого повреждения лёгких была при использовании липосомальной формы АЦЦ. Внутривенное введение липосом с АЦЦ приводило к повышению насыщения крови кислородом на протяжении 6 сут. после инъекции. Дексаметазон эффективнее, чем липосомальный АЦЦ повышал насыщение гемоглобина кислородом через 24 ч после внутривенного введения. Внутривенное введение дексаметазона эффективно снижало степень лёгочного отёка через 24 ч после моделирования патологии. Введение липосом с АЦЦ уменьшало выраженность лёгочного отёка у крыс на 1-е и 6-е сут. после моделирования острого повреждения лёгких. Липосомальный АЦЦ эффективнее, чем дексаметазон препятствовал развитию лёгочного отёка на 6-е сут. при остром повреждении лёгких. Показатели спирограммы после введения липосом с АЦЦ в большей степени, чем после введения дексаметазона приближались к исходным значениям интактных животных. **Заключение.** По сравнению с однократным введением дексаметазона, липосомальный ацетилцистеин не менее эффективен при остром экзогенном повреждении лёгких, как средство улучшающее функцию дыхательной системы и средство снижающее летальность.

Ключевые слова: ацетилцистеин; липосомы; дексаметазон; лёгкие.

Для цитирования: Куликов О.А., Пятаев Н.А., Инчина В.И., Минаева О.В. Влияние внутривенного введения липосомальной формы ацетилцистеина на функциональное состояние дыхательной системы крыс при остром повреждении лёгких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 82–87.

Для корреспонденции: Куликов Олег Александрович, канд. мед. наук, доцент каф. фармакологии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», e-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.01.2016

Kulikov O.A., Pyataev N.A., Inchina V.I., Minaeva O.V.

Effects of intravenous administration liposomal form of acetylcysteine on the functional state respiratory system in rats with acute lung injury

Ogarev Mordovia State University; 68, ul. Bol'shepivistskaya, Saransk, 430005, Russia

The purpose. We studied the influence of a single intravenous injection of liposomal form of acetylcysteine (NAC) on respiratory function in rats with acute lung injury. **Methods.** Liposomal form acetylcysteine was obtained from lecithin and cholesterol; acetylcysteine was implemented into liposomes by passive loading. The total dose of NAC in experimental animals was 25 mg/kg. The study was conducted in a comparative aspect. Therapy comparison is a single intravenous injection of dexamethasone at a dose of 6 mg/kg. Model of acute lung injury was a single intratracheal administration of acetone at a dose of 0,1 ml/kg. **Results.** The study showed that liposomal acetylcysteine and drug comparison — dexamethasone are effective in reducing mortality in acute lung injury. The survival of experimental animals in the 1st day after acute lung injury was highest when using liposomal NAC. Intravenous injection of liposomal NAC leads to an increase of oxygenation of blood the rats over a 6-day post-injection. Dexamethasone effective than liposome form of NAC increases the hemoglobin

oxygen saturation at 24 hours after intravenous administration. Intravenous dexamethasone is effective in reducing the degree of pulmonary edema 24 hours after modeling pathology. Introduction liposomes NAC reduces the severity of pulmonary edema in rats on the 1st and 6th day after modeling acute lung injury. Liposomal NAC effective than dexamethasone prevents the development of pulmonary edema after 6 days in acute lung injury. After administration of liposomes NAC spiogram indices in rats to a greater extent close to the original values than after administration of dexamethasone. **Conclusion.** Compared with the single administration of dexamethasone, liposomal acetylcysteine no less effective for exogenous acute lung injury, as a means of improving the function of the respiratory system and means of reducing mortality.

Keywords: acetylcysteine; liposomes; dexamethasone; lungs.

For citation: Kulikov O.A., Pyataev N.A., Inchina V.I., Minaeva O.V. Effects of intravenous administration liposomal form of acetylcysteine on the functional state respiratory system in rats with acute lung injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61(1): 82–87. (in Russ.).

For correspondence: Oleg A. Kulikov, PhD, Associate Professor, Department of Pharmacology Ogarev Mordovia State University; 68, ul. Bol'shevistskaya, Saransk, 430005, Russian Federation, e-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors: Kulikov O.A., <http://orcid.org/0000-0001-5661-2178>

Received 13.01.2016

Введение

Стремительное развитие клинической картины патоморфологических изменений и высокая летальность при остром повреждении легких (ОПЛ) постоянно в центре внимания ученых [1]. ОПЛ является первой стадией острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), основной причины острой дыхательной недостаточности критических состояний [2].

Делая акцент на существенную роль цитокинов и прооксидантных ферментов в патогенезе ОПЛ, ряд исследователей отмечает высокую эффективность антиоксидантов, таких, как N-ацетилцистеин и α -токоферол, при лечении рассматриваемой патологии [3]. В настоящий момент липосомальные лекарственные формы предлагаются как для интратрахеального, так и внутривенного введения с целью коррекции различных патологических состояний, в том числе и при ОРДС [4].

Липосомальные антиоксиданты (N-ацетилцистеин, процистеин, α -токоферол) по мнению некоторых авторов способны эффективно снижать летальность при ОРДС развившемся на фоне тяжелой вирусной инфекции (вирус гриппа, атипичный коронавирус) [5]. В экспериментах на животных показано, что степень тяжести ОРДС индуцированного интратрахеальным введением 2-хлорэтил-этил сульфида снижается в результате интратрахеального введения липосом содержащих N-ацетилцистеин, глутатион или ресвератрол [6]. Внутривенное введение липосом с ацетилцистеином (АЦЦ) перед моделированием ОПЛ, индуцируемого внутривенным введением липополисахарида (ЛПС) *E. coli*, оказывает более выраженное пульмопротекторное действие, чем раствор АЦЦ при использовании в равных дозах

25 мг/кг [7]. Однако в данном случае мы имеем возможность проследить лишь защитный, но не корригирующий эффект липосом с АЦЦ.

В настоящее время стандартом лечения ОРДС/ОПЛ остаются глюкокортикостероиды (ГКС). Теоретическая роль ГКС при ОРДС обусловлена действием на воспалительные цитокины. Однако при назначении ГКС нередко повышается риск развития инфекционных осложнений и летальности больных с ОРДС [8]. Именно с эффективностью ГКС при ОПЛ интересно было бы сравнить эффективность липосомальных лекарственных форм. Так, на модели экзогенно индуцированного у мышей ОПЛ с использованием интратрахеального введения 50 мкл мелфалана (4-[бис(2-хлорэтил)амино]-L-фенилаланина) показана незначительная эффективность липосомального антиоксиданта α -токоферола (50 мг/кг) по сравнению с дексаметазоном (10 мг/кг). Липосомы с α -токоферолом в меньшей степени, чем дексаметазон снижали степень лёгочного отёка, и активность нейтрофилов, а снижение уровня провоспалительных цитокинов в лёгких не было статистически значимым [9].

На настоящий момент в литературе недостаточно данных об изменении функции внешнего дыхания при ОПЛ на фоне терапии липосомальными лекарственными формами, содержащими АЦЦ и другие антиоксиданты. По немногочисленным данным известно, что внутривенное введение пациентам с ОРДС раствора АЦЦ в дозе 40 мг/кг в течении 3 сут. приводит к улучшению показателей оксигенации и уменьшению необходимости респираторной поддержки, однако данная терапия не приводит к статистически значимому снижению летальности [10].

Цель работы — исследование влияния липосом с АЦЦ на дыхательную функцию при экзогенном остром повреждении лёгких.

Методика

Липосомальную форму АЦЦ готовили по следующей методике. Компоненты липидной оболочки (фосфатидилхолин — 90%, холестерол — 10%) растворяли в хлороформе. Растворитель упаривали на роторном испарителе. Липидную плёнку гидратировали раствором АЦЦ (препарат «флуимуцил» раствор для инъекций 100 мг/мл, Замбон, С.п.А. Италия). Полученную дисперсию мультимеллярных везикул измельчали с помощью экструдера LIPEX™ с использованием поликарбонатного фильтра с диаметром пор 400 нм. Очистка липосомальной дисперсии от свободного ацетилцистеина проводилась с помощью гель-фильтрации. Размерные характеристики полученных липосом оценивали методом динамического светорассеяния (спектроскопии биения света) на анализаторе NANO-flex, Microtrac Inc. Средний размер полученных липосом составил 430 ± 43 нм. Количество АЦЦ в липосомах определяли спектрофотометрически по реакции с $FeCl_3$ и 1,10-фенантролином. Для этого к водной суспензии липосом для их разрушения добавляли хлороформ, шейкировали и отстаивали для разделения смеси на водную и хлороформную фракции. Концентрацию АЦЦ определяли в водной фракции методом спектрофотометрии при 510 нм по калибровочному графику. Степень включения АЦЦ в липосомы составила $12,5 \pm 2,5\%$, массовое отношение липиды/АЦЦ — 3,039.

Для эксперимента использовались белые беспородные крысы обоего пола массой 220—300 г (питомник «Столбовая», ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН). Все исследования выполнялись с соблюдением норм и правил проведения экспериментов с участием животных (решение ЛЭК ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П.Огарева» от 12.07.2015 г., протокол № 72). В эксперимент было включено 64 крысы (40 самцов и 24 самки). Животных разделили на 4 группы по 16 особей (10 самцов и 6 самок) в каждой. Всем крысам под уретановым внутрибрюшинным наркозом (400 мг/кг) производили моделирование острого повреждения легких путем интратрахеального введения 0,1 мл/кг ацетона [11]. Всем животным после моделирования ОПЛ/ОРДС с целью профилактики инфекционных осложнений вводили цефтриаксон (порошок во флаконах, 1 г для приготовления раствора для внутримышечного и внутривенного введения, ОАО «Биосинтез», Россия) в дозе 100 мг/кг внут-

римышечно 1 раз в сут. в течение 6 дней. Животные 1-й группы (контроль 1) другого лечения не получали. Крысам 2-й группы (контроль 2) вводили дексаметазон (раствор для инъекций 0,4%, КРКА, д.д., Ново место, Словения) в дозе 6 мг/кг, в 3-й группе животным через 20 мин после моделирования ОПЛ однократно внутривенно вводили 0,5 мл взвеси липосом с ацетилцистеином (средняя доза АЦЦ 25 мг/кг). Отдельную группу составили интактные крысы.

Животным контрольной группы не вводили физиологический раствор в объёме сопоставимом с другими, исследованными средствами (дексаметазон, липосомальный АЦЦ), так как в условиях ОПЛ (повышенная капиллярная проницаемость), физраствор не будет индифферентным агентом и может усилить выход жидкости в лёгочный интерстиций, усугубляя интерстициальный отёк.

Животных забивали на 7-е сут. после начала эксперимента под уретановым наркозом. Для оценки эффективности терапии на протяжении 6 сут. от момента моделирования ОПЛ/ОРДС, оценивали выживаемость животных (в %). Также при помощи аппарата BiopacSystems MP 150 (США) у животных оценивали ряд функциональных показателей дыхательной системы: сатурацию гемоглобина (SpO_2), частоту дыхания (ЧД), объём выдоха, пиковую скорость воздушных потоков при вдохе и выдохе. Показатели регистрировали до интратрахеального введения ацетона, через 1 ч, 24 ч и 6 сут. после моделирования ОПЛ/ОРДС. Оценку влияния исследуемых схем терапии на развитие лёгочного отёка при ОПЛ производили на 20 отдельно взятых крысах и разбитых на вышеуказанные группы. Данные животные забивались через 24 ч и на 6-е сут. после моделирования ОПЛ под уретановым наркозом. У животных извлекали и взвешивали легкие с последующим определением степени легочного отёка — легочного коэффициента (СЛО, ЛК). СЛО/ЛК рассчитывали по формуле: $m. \text{лёгких} / m. \text{животного} \times 1000 = \text{ед.}$ [12].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента и критерия χ^2 . Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Спустя 24 ч 61,53% животных после аспирации ацетона и не получившие лечение погибли. Летальность в группе животных, которым вводили дексаметазон в сочетании с цефтриаксоном, в 1-е сут. составила 30% (рис. 1), что статистически значимо не отличалось от летальности в контрольной группе. На 1-е сут. в экспериментальной группе, где крысам вводили однократно липосомальный АЦЦ, летальность составила 14,3%, что статистически значимо меньше, чем в контроле 1. На 2-е сут. наблюдения число лета-

льных исходов во всех изучаемых группах возросло. Так, в группе контроля 1 летальность составила 76,9%, в группе с терапией дексаметазоном в сочетании с цефтриаксоном — 40%. Уровень летальности в группе с применением липосомального АЦЦ составила 21,4%.

На 3-и сут. все животные группы контроль 1 погибли (рис. 1). На 3-и сут. возросла летальность и в группе с применением липосомального АЦЦ до 28,6%. Летальность после введения дексаметазона не изменилась. При этом во 2-й и 3-й исследуемых группах уровень летальности был ниже, чем в группе контроль 1. На протяжении всего остального периода наблюдения (4-е — 6-е сут.) летальность в исследуемых группах не изменилась.

В результате острого повреждения лёгких ЛК в 1-е сут. в группе без лечения (контроль 1) существенно повышается. В данной группе животных СЛО возрастала по отношению к интактным животным на 91,1%. После введения дексаметазона и липосом с АЦЦ, ЛК был статистически значимо ниже, чем в группе контроль 1, на 36,2%, и 36,6% соответственно (таблица).

На 6-е сут. эксперимента СЛО/ЛК во всех группах животных, где использовались различные терапевтические схемы был статистически значимо выше, чем у интактных животных. Так, в группе с применением дексаметазона ЛК вырос на 58,6%. В группе после введения липосомального АЦЦ на 6-е сут. эксперимента ЛК был выше, чем у интактных крыс на 26,7% (таблица). Однако при сравнении ЛК в группе с дексаметазоном и ЛК в группе с липосомальным АЦЦ, последний был статистически значимо ниже, чем первый, на 20,1%.

Сатурация гемоглобина крови (SpO_2) животных в группе контроль 1 через 1 ч после аспирации ацетона статистически значимо снижалась с $95,76 \pm 0,63\%$ (у интактных крыс) до $78,4 \pm 1,67\%$ (рис. 2). После введения дексаметазона сатурация была значимо ниже,

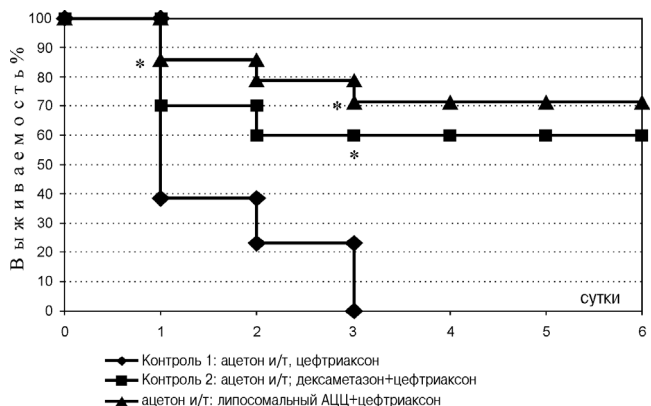


Рис. 1. Влияние липосомального АЦЦ на выживаемость экспериментальных животных при остром повреждении легких. * — значимость различий по отношению к группе животных контроль 1 при $p < 0,05$.

чем у крыс в исходном состоянии ($96,4 \pm 1,0\%$), но выше, чем в группе контроль 1 и составила $86,8 \pm 2,16\%$ (рис. 2). Введение липосомального АЦЦ приводило к повышению уровня SpO_2 (до $85,7 \pm 1,32\%$) по отношению к контрольной группе без лечения, через 1 ч после аспирационного повреждения лёгких, однако это значение было значимо ниже, чем у крыс до введения в трахею ацетона ($95,8 \pm 0,5\%$), (рис. 2).

Через 24 ч у выживших крыс после аспирации ацетона уровень сатурации оставался существенно ниже исходного показателя и составил $86 \pm 5,3\%$ (рис. 2). Через 1 сут. в группе после введения дексаметазона и цефтриаксона сатурация составила $94 \pm 1,34\%$, что статистически значимо не отличалось от исходно зарегистрированного значения у животных данной группы и от значения группы контроль 1. Через 24 ч в результате введения липосом с АЦЦ сатурация была статистически значимо ниже, чем у интактных животных этой группы ($88,3 \pm 1,91\%$) (рис. 2) и животных группы с применением дексаметазона.

Таблица

Влияние липосомального АЦЦ на степень легочного отека (легочный коэффициент)

Экспериментальные группы	Легочный коэффициент (ЛК) ($M \pm m$) ед.	
	Через 24 ч	Через 6 сут.
Интактные	$7,01 \pm 0,19$	$7,01 \pm 0,19$
Контроль 1, ацетон и/т, цефтриаксон	$13,25 \pm 1,2$ $p_1 < 0,05$	—
Ацетон и/т, дексаметазон + цефтриаксон	$8,55 \pm 1,06$ $p_2 < 0,05$	$11,12 \pm 0,5$ $p_1 < 0,05$
Ацетон и/т, липосомальный АЦЦ + цефтриаксон	$8,5 \pm 0,61$ $p_2 < 0,05$	$8,88 \pm 0,37$ $p_{1,3} < 0,05$

Примечание. p_1 — статистическая значимость различий рассчитана по отношению к интактной группе; p_2 — по отношению к группе контроль 1 (ацетон и/т.); p_3 — по отношению к группе контроль 2 (ацетон и/т, дексаметазон + цефтриаксон).

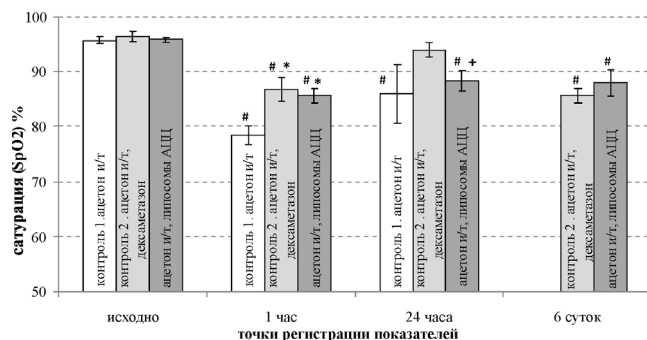


Рис. 2. Изменения сатурации гемоглобина при применении различных схем терапии на фоне ОПЛ. # – значимость различий (p<0,05) рассчитана по отношению к исходному значению; * – по отношению к группе контроль 1; + – по отношению к группе контроль 2.

На 6-е сут. наблюдения величина SpO₂ крови у крыс, которым вводили дексаметазон в сочетании с цефтриаксоном, составила 85,8 ± 1,32%, что статистически значимо ниже, чем у интактных животных. На 6-е сут. уровень SpO₂ в группе с применением липосомального АЦЦ составил 88,0 ± 2,5%, что статистически значимо ниже, чем у животных исходно, но существенно не отличается от соответствующего показателя в группе с применением дексаметазона (рис. 2).

Частота дыхания (ЧД) через 1 ч после аспирации ацетона в группе контроль 1, значимо снижалась относительно исходного значения с 83,08 ± 6,07 дыхательных движений в минуту (дд/мин) до 56,45 ± 7,55 дд/мин. После введения дексаметазона ЧД составила 106,1 ± 6,8 в мин, что статистически значимо выше исходного значения (80,08 ± 5,5 дд/мин) и значения в контрольной группе без лечения. Использование липосомального АЦЦ приводило к статистически значимому повышению ЧД с 83,1 ± 6,2 до 98,0 ± 7,9 дд/мин относительно группы контроль 1. Спустя 1 ч после введения в трахею ацетона скорость вдоха у животных без лечения составила 6,65 ± 0,8 мл/с в мин, что существенно меньше исходного значения (10,11 ± 0,49 мл/с) до аспирационного повреждения. После введения дексаметазона скорость вдоха оставалась значимо ниже исходного показателя (10,5 ± 0,5 мл/с). При этом она составила 8,25 ± 0,66 мл/с. После введения липосомального АЦЦ скорость вдоха была ниже, чем до аспирационного повреждения (10,11 ± 0,9 мл/с) и составила 5,33 ± 0,62 мл/с, через 1 ч после моделирования ОПЛ. При этом в группе с липосомальным АЦЦ скорость вдоха была существенно ниже, чем в группе с применением дексаметазона. Скорость выдоха во всех сравниваемых группах по отношению к показателям до аспирации и введения препаратов статистически значимо не изменялась. Через 1 ч после ОПЛ при введении декса-

метазона скорость выдоха составила 9,32 ± 0,73 мл/с, в контрольной группе без лечения — 7,23 ± 0,85 мл/с. При этом исходные значения скорости выдоха в данных группах составляли 8,9 ± 1,0 мл/с и 8,86 ± 0,4 мл/с соответственно. Скорость выдоха после введения липосомального АЦЦ была 7,69 ± 0,6 мл/с против 8,9 ± 0,3 мл/с до аспирации. Через 1 ч после аспирации объём выдоха составил 2,1 ± 0,1 мл, при этом до аспирации данное значение было 2,3 ± 0,12 мл. В группе животных с применением дексаметазона до аспирации объём выдоха был 2,2 ± 0,1 мл, а через 1 ч после аспирации и введения дексаметазона — 1,82 ± 0,2 мл. После введения липосомального АЦЦ, объём выдоха был 1,89 ± 0,3 мл, что значимо ниже исходного значения (2,3 ± 0,15 мл).

Спустя 24 ч, частота дыхания в группе контроль 1 составила 86,25 ± 6,04 дд/мин, в группе с применением дексаметазона ЧД повышалась до 106,1 ± 9,5 дд/мин относительно исходного показателя. У крыс после введения липосомального АЦЦ через 24 ч ЧД составила 82,0 ± 12,75 дд/мин. Скорость вдоха через 24 ч у крыс без лечения была 8,34 ± 1,01 мл/с. Скорость вдоха спустя сутки после введения дексаметазона была значимо ниже, чем до аспирационного повреждения и составила 7,77 ± 0,52 мл/с. Животные в группе с применением липосомального АЦЦ через 24 ч имели скорость вдоха равную 7,96 ± 1,51 мл/с. Скорость выдоха в группе без лечения и в группе контроль 2 в 1-е сут. составила 8,63 ± 1,04 и 10,89 ± 0,71 мл/с соответственно. После применения липосом с АЦЦ скорость выдоха статистически значимо снижалась относительно таковой у животных, которым вводили дексаметазон (7,32 ± 1,38 мл/с). При ОПЛ без лечения через 24 ч объём выдоха составил 1,99 ± 0,1 мл. Объём выдоха через сутки после введения дексаметазона снижался относительно исходного значения (1,93 ± 0,12 мл). На фоне внутривенного введения липосом с АЦЦ объём выдоха через 24 ч был равен 2,44 ± 0,24 мл.

На 6-е сут. эксперимента в группе после введения липосомального АЦЦ ЧД (77,3 ± 7,1 дд/мин) была статистически значимо ниже, чем в группе животных, которым вводили дексаметазон (101,0 ± 6,5 дд/мин). Скорость вдоха в экспериментальных группах животных, которым вводили дексаметазон и липосомальный АЦЦ значимо снизилась относительно исходного значения и составила 7,25 ± 0,73 и 6,22 ± 1,3 мл/с соответственно. Скорость выдоха у выживших животных составила 9,93 ± 1,03 мл/с для группы, где применялся дексаметазон и 7,49 ± 1,07 мл/с для группы с применением липосомального АЦЦ. Объём выдоха у крыс, получивших терапию липосомальным АЦЦ (2,28 ± 0,15 мл) на 6-е сут. существенно не менялся, а в группе после введения дексаметазона был значимо ниже исходного объёма (1,89 ± 0,13 мл).

Заключение

Внутривенное введение липосомальной формы АЦЦ способствовало снижению летальности при воспроизведении острого повреждения лёгких. Причем в 1-е сут. развития патологии липосомальный АЦЦ более эффективно в сравнении с дексаметазоном препятствовал увеличению числа летальных исходов. Однократное введение липосом с АЦЦ снижало вероятность развития лёгочного отёка как через 24 ч после развития патологии, так и через 6 сут., в то время как дексаметазон, введённый однократно не препятствовал нарастанию лёгочного отёка к 6-м сут. эксперимента. На ранних этапах развития ОПЛ (1, 24 ч) применение липосомального АЦЦ улучшало оксигенацию крови, а через 24 ч наиболее эффективным в этом отношении явилось использование глюкокортикостероида. При ОПЛ липосомальный АЦЦ положительно влиял на функцию внешнего дыхания. Это проявлялось восстановлением объёма выдоха уже в 1-е сут. после моделирования ОПЛ. Использование в схеме лечения дексаметазона напротив не приводило к восстановлению объёма выдоха на протяжении всего периода наблюдения за животными. Оба лекарственных вещества препятствовали развитию брадипноэ через 1 ч после моделирования патологии, которое вероятно связано с угнетением дыхательного центра в результате нарастания гипоксии при отсутствии лечения. Применение дексаметазона статистически значимо увеличивало ЧД, что можно трактовать как тахипноэ. Данный эффект может быть связан, как с гипоксией, так и со стимулирующим действием ГКС на ЦНС через 1 ч и 24 ч после развития ОПЛ. Происходившее при ОПЛ замедление скорости вдоха не корригировалось при помощи предложенных схем терапии, а скорость выдоха существенно не изменялась на фоне ОПЛ. Однако пиковая скорость потока выдоха через 24 ч после развития ОПЛ была более высокой у животных, которым вводили дексаметазон.

Сведения об авторах:

Пятаев Николай Анатольевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. анестезиологии и реаниматологии
 Инчина Вера Ивановна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. фармакологии и клинической фармакологии
 Минаева Ольга Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. анестезиологии и реаниматологии

References

1. Moroz V.V., Golubev A.M., Marchenkov Yu.V., Gorodovikova Yu.A. The morphological features of acute lung injury of various etiology (experimental study). *Obshchaya reanimatologiya*. 2010; 3(6): 29-34. (in Russian)
2. Novikov N.Yu., Tyshkevich L.V., Dzhanysz K.N. Pathological changes in blood barrier in acute respiratory distress syndrome in the experiment. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskij vestnik*. 2012; 15(1): 169 — 75. (in Russian)
3. Chow Chung-Wai, Herrera Abreu M.T., Suzuki T., Downey G.P. Oxidative Stress and Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003; 29: 427-31.
4. Bautina T.V., Kogutnitskaya M.I., Kunakhova A.S., Ivchenko S.I. Application of non-invasive method of drug delivery in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Ukrainskiy meditsinskiy al'manakh*. 2011; 14(4): 23-6. (in Russian)
5. Stone W.L., Smith M. Therapeutic Uses of Antioxidant Liposomes. *Molecular Biotechnology*. 2004; 27: 217-30.
6. McClintock S.D., Hoese L.M., Das S.K., Till G.O., Neff T., Kunkel R.G. et al. Attenuation of half sulfur mustard gas-induced acute lung injury in rats. *J. Appl. Toxicol.* 2006; 26: 126-31.
7. Mitsopoulou P., Omric A., Alipour M., Vermeulena N., Smith M.G., Suresh Z.E. Effectiveness of liposomal-N-acetylcysteine against LPS-induced lung injuries in rodents. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008; 363: 106-11.
8. Avdeev S.N. Aspiration pneumonia. *Klinicheskaya Mikrobiologiya antimikrobnaya khimioterapiya*. 2008; 10(3): 216-34. (in Russian)
9. Wigenstam E., Rocks D., Hammarström B.E., Bucht A. Treatment with dexamethasone or liposome encapsulated vitamin E provides beneficial effects after chemical-induced lung injury. *Inhalation Toxicology*. 2009; 21(11): 958-64.
10. Jain R., Dalnogare A., Pharmacological Therapy for Acute Respiratory Distress Syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2006; 81(2): 205-12.
11. Kulikov O.A., Pyataev N.A., Inchina V.I., Gurevich K.G., Zaborovskiy A.V., Minaeva O.V. et al. Comparative analysis of the effectiveness of dexamethasone, hydroxyethyl starch, and hypertonic sodium chloride solution in experimental acute respiratory distress syndrome. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015; 78(10): 7-11. (in Russian)
12. Torkunov P.A., Shabanov P.D. Toxic pulmonary edema: pathogenesis, modeling, methodology of the study. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2008; 6(2): 3-54. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.314.-006-053.2:615.28-084

Попруженко Т.В., Борис С.П.

Клинические результаты применения ацетилцистеина для патогенетической профилактики химиотерапевтического орального мукозита у детей

УО «Белорусский государственный медицинский университет», 220116, пр. Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь

В современной гипотезе патогенеза орального мукозита, осложняющего противоопухолевое лечение, основная роль в повреждении тканей и провокации воспаления отводится свободным радикалам, что позволяет предположить возможность контроля не только лучевого, но и химиотерапевтического мукозита при помощи антиоксидантов. **Цель исследования:** оценка клинической эффективности применения антиоксиданта как потенциального средства для патогенетической профилактики химиотерапевтического мукозита, сопровождающего применение метотрексата в высоких дозах. **Методика.** В рандомизированном контролируемом продольном исследовании приняли участие 29 детей и подростков с онкогематологической патологией в течение 87 эпизодов химиотерапии с применением высокодозного метотрексата. Помимо стандартного ухода 14 пациентам в 41 эпизоде химиотерапии с 1-го по 10-й день назначали внутрь ацетилцистеин в стандартных возрастных дозировках, остальные случаи составили группу сравнения. Стоматолог ежедневно обследовал полость рта каждого пациента в каждом эпизоде химиотерапии в течение 2 нед после введения метотрексата для выявления признаков мукозита. Состояние слизистой оболочки полости рта оценивали в соответствии с критериями индекса оральной токсичности ВОЗ (iWHO), при помощи которых регистрировали наличие, тяжесть и длительность мукозита. Усредненную частоту развития мукозита для каждого пациента рассчитывали как долю эпизодов высокодозной химиотерапии, осложнившихся мукозитом, в общем количестве пройденных пациентом эпизодов (от одного до четырех). Статистическая обработка результатов проведена методами непараметрической статистики с использованием критериев Пирсона, Фишера и Манна—Уитни; критическим уровнем значимости принят $p < 0,05$. **Результаты.** В период исследования отмечено 53 случая орального мукозита (в том числе 15 случаев с тяжелым течением) у 24 пациентов с длительностью эпизодов от 2 до 25 дней. Статистически значимых различий между двумя группами по усредненной частоте, тяжести и продолжительности эпизодов орального мукозита не обнаружено. **Заключение.** Результаты исследования не дают оснований для подтверждения эффективности применения антиоксиданта (ацетилцистеина) для патогенетической профилактики химиотерапевтического орального мукозита.

Ключевые слова: онкогематология, химиотерапевтический мукозит, патогенез, профилактика, антиоксидант, ацетилцистеин, дети.

Для цитирования: Попруженко Т.В., Борис С.П. Клинические результаты применения ацетилцистеина для патогенетической профилактики химиотерапевтического орального мукозита у детей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61 (1): 88—91.

Для корреспонденции: Борис Светлана Петровна, аспирант каф. стоматологии детского возраста БГМУ, e-mail: iris-24@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2015.

Popruzenko T.V., Borys S.P.

Clinical results of acetylcysteine use for pathogenetic prevention of oral mucositis induced by chemotherapy in children

Belarusian State Medical University; 83, pr. Dzerzhinskogo, Minsk, 220116, Belarus

Nowadays hypothesis of the pathogenesis of oral mucositis, that complicates anti-cancer treatment, gives a major role in tissue injury and inflammation to free radicals. This suggests the possibility of control with antioxidants for not only a radiomucositis, but also chemotherapy-induced mucositis. **The purpose.** To evaluate the clinical efficacy of antioxidant as a potential agent for pathogenetic prevention of chemotherapy mucositis accompanying use of high-dose methotrexate. **Methods.** Twenty-nine children and adolescents with oncohematological pathology in 87 episodes of chemotherapy with high-dose methotrexate participated in a randomized controlled longitudinal study. Fourteen patients had been receiving

acetylcysteine in standard dosages in addition to standard treatment from 1st to 10th days of 41 chemotherapy episodes; other cases formed the control group. Dentist examined oral cavity of each patient daily in each episode of chemotherapy during two weeks after the administration of methotrexate for mucositis detection. Status of the oral mucosa was evaluated according with the criteria of the WHO oral toxicity index (iWHO), that were used to record the presence, severity and duration of mucositis. The average rate of mucositis for each patient was calculated as the proportion of high-dose chemotherapy episodes, which are complicated with mucositis, in the total number of episodes of the patient passed (one to four). Statistic data were analyzed by methods of nonparametric statistics using Pearson criterion, Fisher and Mann—Whitney; critical significance level adopted $p < 0,05$. **Results.** During the research period, we have observed 53 cases of oral mucositis (including 15 severe cases) in 24 patients with duration of episodes from 2 to 25 days. There were not found any statistically significant differences between two groups in the average frequency, severity and in duration of oral mucositis episodes. **Conclusion.** The results of the research do not provide grounds to confirm the efficacy of antioxidant (acetylcysteine) for the pathogenic prevention of oral mucositis induced by chemotherapy.

Keywords: oncohematology; chemotherapy mucositis; pathogenesis; prevention; antioxidant; acetylcysteine; children.

For citation: Popruhenko T.V., Borys S.P. Clinical results of acetylcysteine use for pathogenetic prevention of oral mucositis induced by chemotherapy in children. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 61 (1): 88–91. (in Russ.).

For correspondence: Svetlana Borys, Graduate student of department of pediatric dentistry Belarusian State Medical University; 83, Dzerzhinsky Avenue, Minsk, 220116, Republic of Belarus, e-mail: iris-24@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship

Information about authors:

Popruhenko T.V., <http://orcid.org/0000-0003-3902-4934>

Boris S.P., <http://orcid.org/0000-0002-8369-8306>

Received 15.11.2015

Введение

Химиотерапевтический мукозит — воспаление слизистых оболочек, развивающееся у 10—100% пациентов, получающих противоопухолевые препараты [1]. Мукозит является тяжелой проблемой сопроводительной терапии в онкогематологии, современные успехи которой во многом определены пролонгированным введением высоких доз цитостатического лекарственного средства, вводимого в фолатный цикл — метотрексата [2]. Ятрогенное воспаление слизистой оболочки полости рта (оральный мукозит) варьирует от легкой гиперемии до тотального изъязвления; тяжелое течение мукозита обуславливает потребность пациента в наркотических системных анальгетиках и парентеральном питании, вынуждает к нарушению протоколов химиотерапии основного заболевания, увеличивает длительность лечения и ухудшает прогноз [3, 4].

До настоящего времени менеджмент химиотерапевтического мукозита сводится к симптоматическим, малоэффективным процедурам, так как механизмы развития этой ятрогенной патологии остаются не вполне определенными [5]. В течение последнего десятилетия в качестве рабочей концепции патогенеза мукозита — как лучевого, так и химиотерапевтического — принята пятифазная схема T. Sonis [6], основанная на предположении о том, что гибель клеток является не только и не столько прямым эффек-

том облучения и (или) применения цитостатиков, сколько косвенным: ткани погибают при воздействии на них свободных радикалов кислорода, образующихся в процессе терапии. Если концепция T. Sonis верно описывает природу мукозита, то для его патогенетической профилактики могли бы быть полезны лекарственные средства с антиоксидантными эффектами. Это предположение получило подтверждения для лучевого мукозита [7, 8], тогда как в отношении химиотерапевтического мукозита вопрос остается открытым [9].

Цель исследования — изучение клинической эффективности применения антиоксиданта как потенциального средства для патогенетической профилактики химиотерапевтического мукозита, сопровождающего применение высокодозного метотрексата.

Методика

Для достижения цели в исследовании использовали широко применяемый в педиатрии как муколитическое лекарственное средство ацетилцистеин: известно, что N-ацетил-L-цистеин является субстратом для синтеза глутатиона, что, как полагают многие современные исследователи, позволяет успешно применять ацетилцистеин для усиления антиоксидантной защиты при различных заболеваниях [10—13].

В проспективном продольном контролируемом рандомизированном исследовании приняли участие 29 детей и подростков, находившихся на лечении острого лимфобластного лейкоза или лимфомы в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии (г. Минск) в течение 87 эпизодов химиотерапии высокодозным метотрексатом по протоколам ALL-MB-2008, ALL-BFM-2002-Rez, B-NHL-M 2010, NHL-BFM-95.

По согласованию с этическим комитетом РНПЦ после получения информированного согласия родителей пациентов было организовано их рандомизированное разделение на две группы: 14 детям и подросткам в 41 эпизоде химиотерапии с 1-го по 15-й день от ее начала назначали ацетилцистеин (АЦЦ®200, Белмедпрепараты, Беларусь) внутрь, в возрастных дозах (детям в возрасте до двух лет — 50 мг/сут., в возрасте двух-пяти лет — 200 мг, с шести до четырнадцати лет — 300 мг, в два приема, старше 14 лет — 400 мг, в два приема); остальным 15 пациентам, составившим группу сравнения, в 43 эпизодах химиотерапии ацетилцистеин не назначали; сопроводительное лечение (в том числе профилактика рецидивов герпетического и кандидозного стоматитов) в группе исследования и группе сравнения выполняли по одному и тому же протоколу.

Стоматолог ежедневно обследовал полость рта каждого пациента в каждом эпизоде химиотерапии в течение 2 нед после введения метотрексата для выявления признаков мукозита. Состояние слизистой оболочки полости рта оценивали в соответствии с критериями индекса оральной токсичности ВОЗ, где код 0 означает нормальное состояние, коды 1 и 2 — мукозит легкой и средней тяжести (1 — отек, эритема; 2 — на слизистой оболочке есть язвы, но пациент принимает твердую пищу), коды 3 и 4 — тяжелый мукозит (3 — слизистая оболочка изъязвлена, пациент принимает только жидкую пищу; 4 — прием пищи через рот невозможен) [14]. Усредненную частоту мукозита для каждого пациента рассчитывали как долю эпизодов высокодозной химиотерапии, осложнившихся мукозитом, в общем количестве пройденных пациентом эпизодов (от 1 до 4). В качестве нулевой гипотезы принято предположение об отсутствии влияния применения антиоксиданта на частоту, тяжесть и длительность мукозита.

Статистическая обработка результатов проведена методами непараметрической статистики с определением минимума (min), медианы (Me) и максимума (max), с использованием критериев Пирсона (χ^2), Фишера (F) и Манна—Уитни (U); критическим уровнем значимости принят $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В период исследования отмечено 53 случая орального мукозита (в том числе 15 случаев с тяжелым течением) у 24 пациентов.

Как минимум один эпизод химиотерапии был осложнен мукозитом у 11 (79%) пациентов, получавших ацетилцистеин, и у 13 (87%) пациентов группы сравнения ($F = 0,651340$; $\chi^2 = 0,33$; $p = 0,564$). Усредненная частота мукозита в группе пациентов, получавших ацетилцистеин, составила $Me [min...max] = 0,5 [0...1]$, в группе контроля — $0,7 [0...1]$ ($U = 96$; $p = 0,654$).

Среди эпизодов химиотерапии, сопровождавшихся приемом ацетилцистеина, мукозитом были осложнены 24 (59%) эпизода, в группе контроля зарегистрировано 29 (67%) таких эпизодов ($F = 0,498505$; $\chi^2 = 0,71$; $p = 0,400$).

Продолжительность мукозита на фоне приема ацетилцистеина колебалась от 2 до 25 дней, в группе сравнения — от 2 до 24 дней; медианное значение составило $Me = 10$ дней в обеих группах ($U = 337$; $p = 0,361$). Тяжело протекали 7 (29%) случаев мукозита, отмеченных на фоне приема ацетилцистеина, и восемь (28%) случаев мукозита, развившихся в группе сравнения ($F = 1,000000$; $\chi^2 = 0,02$; $p = 0,899$).

Таким образом, результаты проведенного исследования подтверждают справедливость сформулированной выше нулевой гипотезы. Анализ современной научной базы по обсуждаемой проблеме позволяет предположить две причины для неэффективности ацетилцистеина в контроле химиотерапевтического мукозита: либо ацетилцистеин не может обеспечить антиоксидантный эффект в связи с некими обстоятельствами, характерными для формирования патологии химиотерапевтического, «метотрексатного» мукозита (есть мнение, в соответствии с которым эффект N-ацетил-L-цистеина не реализуется при избытке глутатиона в тканях и/или блокаде его синтеза [15]) — либо оксидативный стресс не имеет такого принципиального значения для формирования клинической картины химиотерапевтического мукозита, как для патогенеза лучевого мукозита.

Заключение

Применение ацетилцистеина в качестве антиоксиданта с целью контроля орального химиотерапевтического мукозита у детей и подростков, страдающих онкогематологическими заболеваниями и получающих агрессивную терапию с пролонгированным введением метотрексата в высоких дозах, не дало эффекта, ожидаемого в соответствии с принятыми представлениями о патогенезе мукозита и свойствах ацетилцистеина.

на; проблема стратегии и тактики патогенетического контроля химиотерапевтического мукозита требует дальнейшего изучения.

References

- Hartnett E., Integrating oral health throughout cancer care. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 2015; 19(5): 615-9.
- Valera M., Noirrit-Esclassan E., Pasquet M., Vaysse F. Oral complications and dental care in children with acute lymphoblastic leukaemia. *J. Oral Pathol. Med.* 2015; 44(7): 483-9.
- Wy I., Epstein J.B., Lee V., Yuen H.L., Li R., Thompson D.R. et al. Oral mucositis in paediatric patients after chemotherapy for cancer. *Hong Kong Med. J.* 2014; 20 (Suppl. 7): 4-8.
- Araujo S.N., Luz M.H., da Silva G.R., Andrade E.M., Nunes L.C., Moura R.O. Cancer patients with oral mucositis: challenges for nursing care. *Rev. Lat. Am. Enfermagem.* 2015; 23(2): 267-74.
- Van Seville Y.Z., Stansborough R., Wardill H.R., Bateman E., Gibson R.J., Keefe D.M. Management of mucositis during chemotherapy: from pathophysiology to pragmatic therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* 2015; 7(11): 50.
- Sonis S.T. The pathobiology of mucositis. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4(4): 277-84.
- Nakajima N., Watanabe S., Kiyoi T., Tanaka A., Suemaru K., Araki H. Evaluation of edaravone against radiation-induced oral mucositis in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2015; 127(3): 339-43.
- de Freitas Cuba L., Salum F.G., Cherubini K., de Figueiredo M.A. Antioxidant agents: a future alternative approach in the prevention and treatment of radiation-induced oral mucositis? *Altern. Ther. Health Med.* 2015; 21(2): 36-41.
- Wardill H.R., Bowen J.M., Gibson R.J. New pharmacotherapy options for chemotherapy-induced alimentary mucositis. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2014; 4(3): 347-54.
- Park J.H., Kang S.S., Kim J.Y., Tchah H. The antioxidant n-acetylcysteine inhibits inflammatory and apoptotic processes in human conjunctival epithelial cells in a high-glucose environment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015; 56(9): 5614-21.
- Dodd S., Dean O., Copolov D.L., Malhi G.S., Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008; 8(12): 1955-62.
- Santus P., Corsico A., Solidoro P., Braido F., Di Marco F., Scichilone N. Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. *COPD.* 2014; 11(6): 705-17.
- Finamor I., Pavanato M.A., Pes T., Ourique G., Saccol E., Schiefelbein S., Llesuy S., Partata W. N-acetylcysteine protects the rat kidney against aspartame-induced oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2014; 75 (Suppl 1): S 30.
- World Health Organization. *Handbook for reporting results of cancer treatment.* Geneva: World Health Organization. 1979: 45 p.
- Rushworth G.F., Megson I.L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol. Ther.* 2014; 141(2): 150-9.

Сведения об авторах:

Попруженко Татьяна Вадимовна, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. стоматологии детского возраста БГМУ

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.36-092: 616.36-002.2-022

Соловьева Н.В., Давидович Н.В., Бажукова Т.А., Агафонов В.М.

Роль нарушений микрофлоры толстой кишки в механизмах повреждения печени при хронических гепатитах В и С

ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России, 163000, г. Архангельск, Россия, пр. Троицкий, д.51

Цель исследования — установить роль нарушений микробиоценоза толстой кишки в механизмах повреждения печени при хронических гепатитах В и С. **Методика.** Изучен состав микрофлоры кишечника, содержание некоторых провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 и ФНО- α) у больных хроническими гепатитами В и С. **Результаты.** На фоне увеличения активности АСТ, АЛТ и повышения содержания общего и прямого билирубина в сыворотке крови выявлены дисбиотические нарушения толстой кишки со снижением количества облигатных представителей микрофлоры: бифидо- и лактобактерий. Отмечено повышение численности условно-патогенных (грибов рода Кандида, протея и клостридий) микроорганизмов. Появление представителей микрофлоры с признаками экзо- и эндотоксичности приводило к повреждению мембран клеток эпителия кишечника, цитолизу, что проявилось снижением сорбционной способности. Нарушалась неспецифическая иммунная защита, что проявлялось в уменьшении количества активных фагоцитов. Нарушение участия микроорганизмов в белковом обмене заключалось в уменьшении содержания апо-А и апо-В липопротеинов. Угнетение функций нейтрофилов (снижение процента активных нейтрофилов) и резкое снижение сорбционной активности энтероцитов у больных хроническим гепатитом В и С свидетельствуют о развитии транслокации условно-патогенных микроорганизмов в кровоток и повышении проницаемости кишечной стенки для эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Эндотоксины (липолисахариды бактерий), взаимодействуя с макрофагами печени, вызывали высвобождение провоспалительных цитокинов (ФНО- α и ИЛ-1), которые, в свою очередь, усиливали повреждение печени. **Заключение.** Поражение печени при вирусных хронических гепатитах В и С сопровождается дисбиозом кишечника с транслокацией эндотоксинов грамотрицательных бактерий в кровоток, что приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов (ФНО- α и ИЛ-1), усиливающих повреждение печени. В свою очередь, нарушение процессов синтеза и экскреции компонентов желчи при патологии печени приводят к развитию дисбиоза.

Ключевые слова: микрофлора кишечника, дисбиоз, печень, хронические вирусные гепатиты В и С, цитокины.

Для цитирования: Соловьева Н.В., Давидович Н.В., Бажукова Т.А., Агафонов В.М. Роль нарушений микрофлоры толстой кишки в механизмах повреждения печени при хронических гепатитах В и С. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 92–98.

Для корреспонденции: Соловьева Наталья Владиславовна, доктор мед. наук, доц., зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО СГМУ, patophiz@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.2016

Solov`eva N.V., Davidovich N.V., Bazhukova T.A., Agafonov V.M.

The role of gut microflora in the mechanisms of liver damage in chronic hepatitis B and C

GBOU VPO «Northern State Medical University», 163000, Arkhangelsk, pr. Troitskiy, 51

The purpose — to establish the role of violations microbiocenosis colon in the mechanisms of liver damage in chronic hepatitis B and C. **Methods.** The study of the composition of the intestinal microflora, the content of some pro-inflammatory cytokines (IL-1 and TNF- α) in patients with chronic hepatitis B and C. **Results.** In the present study, the authors show the composition of the intestinal microflora, the content of certain pro-inflammatory cytokines (IL-1 and TNF-alpha) in patients with chronic hepatitis B and C. It has been shown that with increased enzymatic activity of blood serum and bilirubin metabolic changes (high levels of total and direct) were revealed disbiotic disorders of the colon with reduction in the number of representatives of obligate microflora: bifidobacteria and lactobacilli. It is also noted the increase number of opportunistic (Candida fungi, Proteus and Clostridium) microorganisms. The appearance of the microflora representatives with signs of exo- and endotoxicity resulted in cell membranes of the intestinal epithelial cells damage, cytolysis, which manifested itself in violation of the sorption capacity, disruption of nonspecific protection factors and reduced number of active phagocytes. Vio-

lation of the microorganisms participating in protein metabolism led to the reduction of apo A and apo B lipoproteins content. Inhibition of neutrophil function (reduced percentage of active neutrophils) and a sharp decline in sorption activity of enterocytes in patients with chronic hepatitis B and C show the development of conditionally pathogenic microorganisms translocation into the bloodstream and increase the permeability of the intestinal wall for endotoxins of gram-negative bacteria. Endotoxins interact with the macrophages of the liver, causing the release of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1), which, in turn, increased the liver damage.

Keywords: intestinal microflora; dysbiosis; liver; chronic viral hepatitis B and C; cytokines.

For citation: Solov'eva N.V., Davidovich N.V., Bazhukova T.A., Agafonov V.M. The role of gut microflora in the mechanisms of liver damage in chronic hepatitis B and C. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(1): 92–98. (in Russ.).

For correspondence: Natalia V. Solov'eva, Doctor of Medical Sciences, Head of Pathological Physiology Department in Northern State Medical University, 51, Troitskiy prospect, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation, e-mail: patophiz@yandex.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 11.10.2016

Введение

Микрофлора кишечника и печень играют ведущую роль в осуществлении процессов детоксикации организма, метаболизма белков и липидов, рециркуляции желчных кислот, формировании иммунного ответа и поддержании гомеостаза [1, 2]. Их взаимодействие определяется тем, что содержимое кишечника, всасывающееся в порталный кровоток, активирует функции печени, которая, в свою очередь, влияет на кишечник за счёт секреции желчи в его просвет [2]. Снижение детоксикационной функции микрофлоры способствует увеличению нагрузки на ферментативные системы печени и возникновению в ней структурных и функциональных нарушений, что в целом приводит ко взаимоотноающему поражению как кишечника, так и печени [3]. В структуре заболеваний, ведущих к развитию хронического поражения печени, важное место занимают вирусные инфекции: гепатит В (HBV-инфекция) и С (HCV-инфекция) [4]. По данным литературы и данным результатов собственных исследований, дисбиотические нарушения толстой кишки встречается у абсолютного большинства (80–95%) больных хроническими вирусными гепатитами [5, 6]. Однако до сих пор остаются малоизученными механизмы участия микрофлоры кишечника в этиопатогенезе хронических поражений печени и особенности влияния дисбиоза на тяжесть течения вирусных гепатитов.

Цель работы — установить роль нарушений микробиоценоза толстой кишки в механизмах повреждения печени при хронических гепатитах В и С.

Методика

Под наблюдением находилось 78 больных хроническими вирусными гепатитами, проходивших стационарное лечение в гепатологическом отделении центра инфекционных болезней ГБУЗ АО «Архангельская областная клиническая больница» г.Архангельска за период с 2010 по 2015 гг. (53,8% мужчин и 46,2% женщин). Больные были разделены на группы: Первую группу составили 43 пациента с хронической HBV-инфекцией, 2-ю — 35 больных с хронической HCV-инфекцией. Верификация диагноза проводилась с помощью обнаружения специфических серологических маркеров вирусов гепатита В и С методом иммуноферментного анализа на базе вирусологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Архангельской области» с использованием системы «АмплиСенс». Диагноз хронического вирусного гепатита С устанавливался в соответствии с современными требованиями, с учётом классификации хронических гепатитов; степень активности в выборке — умеренная и слабовыраженная В.18.1 и В.18.2 (Лос-Анджелес, 1994 г., МКБ 10 пересмотр, 1997 г.) [7, 8]. От всех обследованных получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Проведено биохимическое исследование сыворотки крови с определением активности аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), гаммаглутамилтрансферазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержания общего и прямого билирубина, показателей белкового и липидного обмена — общего белка, альбуминов.

Иммунологическое исследование включало определение: в сыворотке крови содержания интерлейкина-1 (ИЛ-1), фактора некроза опухолей (ФНО- α), компонентов системы комплемента С3 и С4; содержания циркулирующих активных комплексов (ЦИК) и секреторного иммуноглобулина А (sIgA). Иммунологические исследования проводились на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Северного государственного медицинского университета с использованием наборов реагентов для иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор Бест», Россия) с чувствительностью от 0 до 5 пг/мл и динамическим диапазоном 0—1000 пг/мл в соответствии с инструкциями по применению тест-систем и оборудования — Иммуноферментный планшетный анализатор «Reader 2020» (пр-во Швеция).

Цитограмму отделяемого слизистой прямой кишки, сорбционную способность эпителиоцитов и фагоцитарную активность нейтрофилов подсчитывали в мазках кала, окрашенных по методу Романовского-Гимза из расчета на 100 клеток. В фекалиях определяли фагоцитарную активность нейтрофилов с помощью тест-набора компании «Реакомплекс» (Россия), активность нейтрофилов определяли в процентах, интенсивность фагоцитоза — по фагоцитарному числу. Методика изучения состава микрофлоры кишечника описана ранее [6].

Статистическая обработка полученных результатов, оценка распределения показателей, сравнительный анализ выборок проведен с помощью пакета программ для статистической обработки данных SPSS 15.0. Поскольку в большинстве выборок было выявлено неправильное распределение, то использовались непараметрические критерии. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался за 0,05.

Для оценки состояния функций печени и микробиоценоза толстой кишки выполнено исследование случай—контроль. Проведено сравнение биохимических, микробиологических и иммунологических показателей между группами больных хронической HBV- и HCV-инфекцией и группой практически здоровых лиц — контрольная группа (независимые выборки). Для сравнительного анализа абсолютных различий этих выборок использован критерий Манна—Уитни, а для сравнительного анализа относительных различий использован критерий Фишера.

Корреляционный анализ проведен с вычислением коэффициента тау-Кендал (τ). Связь между показателями оценивали, как сильную при абсолютном значении коэффициента корреляции $\tau > 0,70$, имеющую среднюю силу при τ от 0.69 до 0.30 и как слабую при $\tau < 0,29$.

Результаты и обсуждение

Состояние дисбиоза толстой кишки с преобладанием тяжелых степеней имело место у 86,1% больных с хронической HBV-инфекцией и у 91,8% — хронической HCV-инфекцией. При исследовании микрофлоры толстой кишки установлено угнетение роста облигатных микроорганизмов. Так, выявлено снижение численности бифидобактерий на 11,2% ($p = 0,03$) у больных с хронической HBV-инфекцией и лактобактерий — на 17,9% ($p = 0,04$) при хронической HBV-инфекции и на 18,3% ($p = 0,04$) при хронической HCV-инфекции по сравнению с контрольной группой. Статистически значимо ниже была частота встречаемости энтерококков у больных с хронической HBV- и HCV-инфекцией (в 2 и 3,6 раза соответственно), но выше оказалась встречаемость грибов рода Кандида — в 1,4 раза в обоих случаях. У всех больных высевались клостридии, протей, которые отсутствовали у здоровых лиц. Частота встречаемости золотистого стафилококка была выше в 1,7 раза при хронической HBV-инфекции и в 1,5 раза при хронической HCV-инфекции по сравнению с контрольной группой.

Количественный учет биомассы микрофлоры показал увеличение доли условно-патогенных энтеробактерий при хронической HCV-инфекции до $8,4 \cdot 10^2$ КОЕ/г и до $6,9 \cdot 10^3$ КОЕ/г у больных хронической HBV-инфекцией; численность золотистых стафилококков при хронической HBV-инфекции составила $3,8 \cdot 10^5$ КОЕ/г, при хронической HCV-инфекции — $3,1 \cdot 10^5$ КОЕ/г против $4,2 \cdot 10^3$ КОЕ/г у практически здоровых лиц. Содержание грибов рода Кандида у больных хронической HBV-инфекцией составляло $7,5 \cdot 10^5$ КОЕ/г, при хронической HCV-инфекции $3,4 \cdot 10^5$ КОЕ/г при $3,7 \cdot 10^4$ КОЕ/г в контроле.

Известно, что количественные и качественные нарушения нормофлоры приводят к изменению колонизационной резистентности, сопровождаются уменьшением выработки интерферона и лизоцима, что вызывает снижение резистентности слизистой оболочки ЖКТ, нарушение процесса пищеварения и усиление действия токсических экзо- и эндогенных веществ. Это создает условия для активации аппарата вирулентности УПМ, делая возможным их прорыв через физиологические барьеры организма с развитием эндогенной инфекции [2, 3]. В данном исследовании нарушение баланса между облигатными и условно-патогенными микроорганизмами привело к увеличению численности представителей микрофлоры с признаками токсичности и угнетению факторов неспецифической защиты толстой кишки, что проявлялось статистически значимым уменьшением содержания активных фагоцитов у больных с хронической HBV- и HCV-инфекцией (на 14,1% и 20,9% соответственно) (табл. 1).

Отмечалось значительное снижение сорбционной способности эпителия — менее 50 ед./кл. у пациентов обеих групп, в то время как у практически здоровых лиц данный показатель был равен 101 ед./кл. Низкая сорбционная способность энтероцитов может быть связана с дефицитом sIgA, низкий уровень которого зарегистрирован у 29,1% больных с хронической HBV-инфекцией и у 37,1% — хронической HCV-инфекцией, что, в свою очередь, обусловлено резким уменьшением содержания лактобактерий и энтерококков у данных больных. Изменение сорбционной способности играет роль в задержке освобождения ЖКТ от патогенов и токсических продуктов их метаболизма, в то время как повышение содержания гемолитических и лактозонегативных кишечных палочек провоцирует поступление данных веществ в кровотоки.

Установлено, что при состояниях, способствующих увеличению поступления эндотоксина в кровотоки, отмечается угнетение клеточного и гуморального антиэндотоксического иммунитета [9]. У пациентов обеих групп наблюдалось увеличение численности ЦИК в 2,1 раза, что статистически значимо по сравнению с контролем. Дефицит фагоцитарной защиты инициирует сдвиги патологических иммунокомплексных реакций, что подтверждается обнаружением сильных статистически значимых положительных корреляционных взаимосвязей фагоцитарного числа с ЦИК ($\tau = 0,72$) у больных хронической HBV-инфекцией. Подобные корреляции проявлялись в отношении ЦИК с числом активных фагоцитов ($\tau = 0,82$; $\rho = 0,03$) у больных хронической HBV-инфекцией, отрицательные — с содержанием бифидобак-

терий ($\tau = -0,91$; $\rho = 0,03$) у больных хронической HCV-инфекцией. Выраженные количественные сдвиги облигатной микрофлоры способствовали транслокации УПМ и всасыванию их эндотоксинов, что подтверждалось увеличением титра антител к грибам рода Кандида в 25% случаев у больных хронической HBV-инфекцией, и 35% — у больных с хронической HCV-инфекцией, а также обнаружением антител к золотистому стафилококку у 20% больных хронической HCV-инфекцией. Отмечены статистически значимые отрицательные корреляции содержания грибов рода Кандида с sIgA при хронической HBV-инфекции ($\tau = -0,72$; $\rho = 0,05$) и при хронической HCV-инфекции ($\tau = -0,82$; $\rho = 0,03$), что свидетельствует о снижении уровня местного иммунитета при наличии выраженного дисбиоза у больных с хронической HBV- и HCV-инфекцией.

Таким образом, уменьшение процента активных нейтрофилов и резкое снижение сорбционной активности энтероцитов у больных хронической HBV- и HCV-инфекцией свидетельствует о наличии транслокации УПМ в кровотоки и повышении проницаемости кишечной стенки для эндотоксинов (ЛПС) грамотрицательных бактерий.

Взаимодействие ЛПС с рецепторами клеток-мишеней стимулирует выработку цитокинов с полимодальными эффектами локального и системного действия. ЛПС грамотрицательных бактерий поглощаются фагоцитами (лейкоцитами, макрофагами, Купферовскими клетками печени). Указанные клетки активируются, синтезируют и секретируют в окружающую среду провоспалительные цитокины (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6) [10, 11], о чем

Таблица 1

Характер факторов резистентности толстой кишки у больных хроническим гепатитом В и хроническим гепатитом С в 1 сут. (M \pm σ)

Показатели	Контрольная группа, n = 31	I группа, n = 43	p к-I гр.	II группа, n = 35	p к-II гр.
Фагоцитарный показатель (ед./кл.)	16,40 \pm 2,35	17,20 \pm 2,05	p = 0,03	16,01 \pm 1,83	p = 0,14
% активных фагоцитов	56,25 \pm 3,89	48,40 \pm 3,85	p < 0,001	44,50 \pm 1,57	p < 0,001
ЦИК (г/л)	1,50 \pm 0,09	3,10 \pm 0,55	p < 0,001	3,10 \pm 0,1	p < 0,001
Сорбционная активность (ед./кл.)	101,01 \pm 0,08	49,0 \pm 2,16	p < 0,001	48,0 \pm 2,45	p < 0,001
sIgA (г/л)	1,24 \pm 0,18	0,88 \pm 0,19	p < 0,001	0,78 \pm 0,11	p < 0,001

Таблица 2

Содержание ФНО- α , ИЛ-1, С3 и С4 сыворотки крови у больных хроническим гепатитом В и хроническим гепатитом С в 1 сут. (M \pm σ)

Показатели	Контрольная группа, n = 31	I группа, n = 43	p к-I гр.	II группа, n = 35	p к-II гр.
ФНО- α (пг/мл)	0,16 \pm 0,01	0,58 \pm 0,03	p < 0,001	0,71 \pm 0,04	p < 0,001
ИЛ-1 (пг/мл)	18,30 \pm 1,91	42,80 \pm 8,20	p < 0,001	43,7 \pm 7,90	p < 0,001
С3 (г/л)	1,12 \pm 0,27	1,65 \pm 0,34	p < 0,001	1,87 \pm 0,16	p < 0,001
С4 (г/л)	0,32 \pm 0,02	0,72 \pm 0,04	p < 0,001	0,77 \pm 0,05	p < 0,001

свидетельствуют статистически значимые данные об увеличении содержания ФНО- α у больных хронической HBV- и HCV-инфекцией (в 3,6 и 4,4 раза). У пациентов с хронической HBV-инфекцией зарегистрировано более высокое содержание ИЛ-1 (в 2,4 раза) по сравнению с контролем (табл. 2).

Появление указанных цитокинов привело к развитию реакции воспаления за счет статистически значимой активации синтеза комплемента и увеличения уровня С3 у больных хронической HBV- и HCV-инфекцией (на 32,2% и на 40,2% соответственно). Показатель С4 при хронической HBV- и HCV-инфекции значимо возрастал (на 55,5% и на 57% соответственно).

Изменения кишечного микробиоценоза наблюдались на фоне статистически значимого повышения активности ферментов: АСТ — в 2 раза при хронической HBV-инфекции и в 1,5 раза — при хронической HCV-инфекции; активность АЛТ возрастала в 3 раза у больных с хронической HBV-инфекцией, в 2,5 раза — при хронической HCV-инфекции; активность ГГТ также была существенно выше у больных хронической HBV- и HCV-инфекцией (в 2,2 раза и в 2,4 раза соответственно) по сравнению с контролем. У пациентов обеих обследуемых групп наблюдались явления холестаза. Так, содержание общего билирубина в сравнении с контрольной группой было значимо выше у больных хронической HBV-инфекцией в 2 раза, у пациентов хронической HCV-инфекцией — в 1,67 раза; прямого билирубина — в 2,5 раза и в 2 раза соответственно. Все изменения статистически значимы. Содержание альбуминов по сравнению с контрольной группой было ниже на 8,7% у пациентов хронической HCV-инфекцией.

У пациентов обеих групп изменился характер взаимосвязей микроорганизмов с активностью ферментов по сравнению с контрольной группой. Так, при хронической HCV-инфекции отмечались взаимосвязи числа кишечной палочки с активностью АЛТ ($\tau = -0,47$; $\rho = 0,009$), тогда как у здоровых лиц имели место корреляции кишечной палочки с АСТ ($\tau = -0,37$; $\rho = 0,03$), энтерококков также с АСТ ($\tau = -0,42$; $\rho = 0,01$).

При начальных дисбиотических нарушениях в толстом отделе кишечника без нарушения функций печени на фоне снижения содержания факультативных анаэробных представителей (кишечная палочка и энтерококки) может происходить повышение выработки АСТ, поскольку этот фермент содержится в тканях различных органов. Однако при наличии иммунного повреждения гепатоцитов при хронических гепатитах происходит повышение активности АЛТ, являющегося «истинно печеночным» ферментом. Проявления синдрома цитолиза в виде повышения

активности АЛТ и, следовательно, снижение детоксикационной функции печени, усугубляется снижением численности и функций кишечной палочки.

Наблюдались взаимосвязи микроорганизмов с показателями пигментного обмена. У больных хронической HBV-инфекцией обнаружены положительные корреляции энтерококков с содержанием общего билирубина ($\tau = 0,34$; $\rho = 0,04$). Мы полагаем, что в связи с уменьшением поступления билирубина в кишечник при синдроме холестаза, который имел место у больных с хронической HBV-инфекцией, наблюдался избыточный рост УПМ, нарушение колонизационной резистентности, детоксикационной, метаболической и иммунной функции кишечника. Наличие взаимосвязей между биохимическими и микробиологическими показателями указывает на включение микроорганизмов толстой кишки в метаболические процессы.

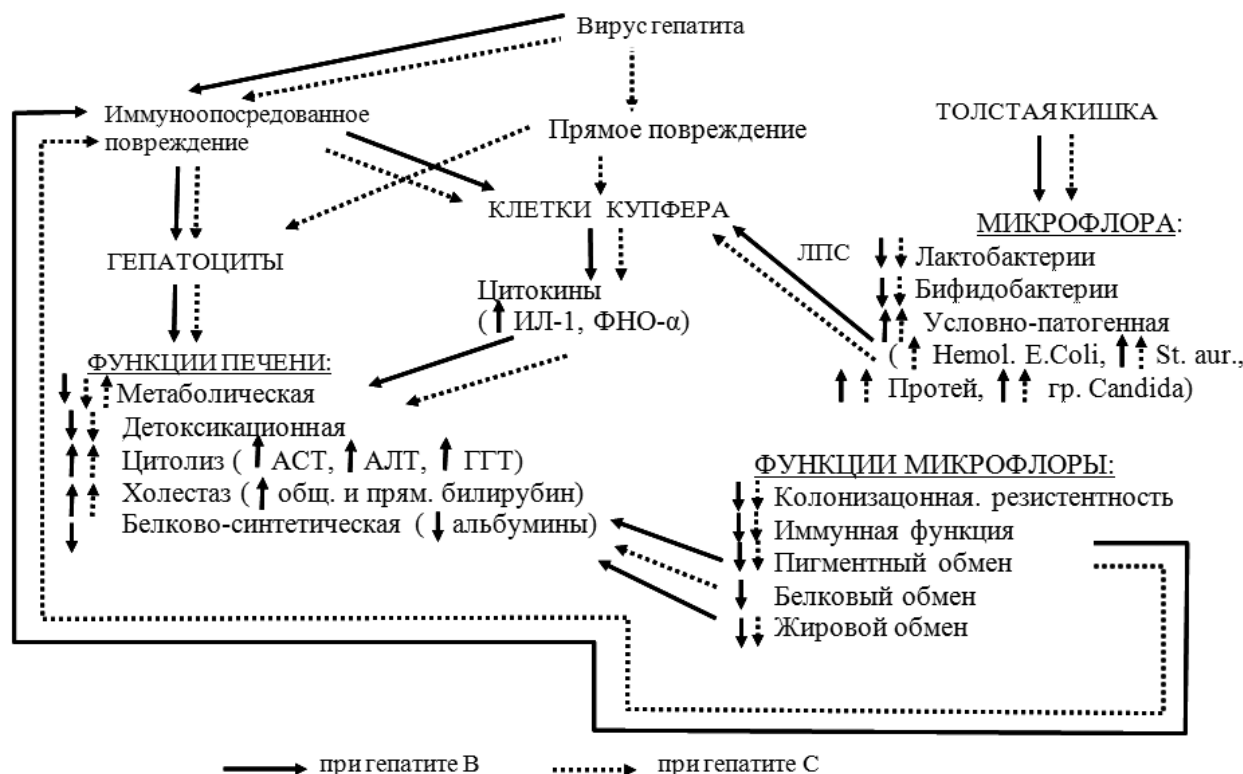
При хронической HCV-инфекции имели место взаимосвязи клостридий с содержанием прямого билирубина ($\tau = 0,70$; $\rho < 0,001$). У практически здоровых лиц подобных корреляций выявлено не было.

Патология печени сопровождается развитием холестаза, что усугубляет дисбиотические нарушения в кишечнике. Вследствие отсутствия желчи усиливается рост представителей факультативной микрофлоры (энтерококков), что также приводит к нарушениям функций кишечника, усилению детоксикационной нагрузки на печени.

Известно, что энтероциты принимают участие в синтезе некоторых белков, в частности, В-48 (апо-В) [12, 13]. В условиях выявленного дисбиоза нарушался синтез белка энтероцитами. У пациентов с хронической HBV-инфекцией выявлены положительные корреляции численности лактобактерий с апо-В ($\tau = 0,74$, $\rho = 0,008$).

У больных с хронической HBV-инфекцией численность лактобактерий находилась в обратной зависимости от содержания альбуминов ($\tau = -0,39$; при $\rho = 0,03$) и аполипопротеинов апо-А, синтезируемых в печени ($\tau = -0,53$, $\rho = 0,021$). У пациентов хронической HCV-инфекцией были также обнаружены отрицательные корреляции численности кишечной палочки с альбуминами ($\tau = -0,47$; $\rho < 0,001$).

Полученные данные позволили сделать заключение, что имело место избыточное поступление эндотоксинов грамотрицательных бактерий, доказанное повышением их биомассы на 2—3 порядка, а также повышение числа условно-патогенных грамположительных представителей микрофлоры. Указанные повреждения приводили к повышению проницаемости мембран, опосредованных снижением процента активных фагоцитов и повышением продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 и ФНО- α) (рисунк).



Нарушения функции печени и микрофлоры толстой кишки при хронических гепатитах В и С

На фоне снижения клеточно-опосредованной защиты происходила транслокация продуцирующих эндотоксин условно-патогенных микроорганизмов, отмечалось образование антител к грибам рода Кандида и стафилококкам, снижение детоксикационной функции облигатной микрофлоры толстой кишки (содержания бифидо- и лактобактерий и энтерококков), что приводило к уменьшению сорбционной способности и нарушению регуляции уровня sIgA.

Повышенное содержание гемолитических и метаболически неактивных E. coli провоцировало избыточное поступление продуктов гниения. Указанные изменения приводили к снижению метаболической функции микрофлоры, связанной с нарушением транспорта веществ, что проявлялось снижением содержания белка и альбуминов, резким снижением продукции аполипротеинов А и В в кишечнике, что могло привести к нарушениям белкового обмена.

Заключение

Таким образом, поражения печени при вирусных хронических гепатитах В и С сопровождаются нарушением качественного и количественного состава кишечной микрофлоры с уменьшением количества облигатных представителей (бифидо- и лактобактерий) и появлением микроорганизмов с признаками экзо- и эндотоксич-

ности. Последнее приводит к повреждению клеточных мембран клеток эпителия кишечника, нарушению сорбционной способности, факторов неспецифической защиты в виде снижения количества активных фагоцитов, нарушению синтеза белка (апоВ). В этих условиях происходит транслокация условно-патогенных микроорганизмов в кровоток и повышение проницаемости кишечной стенки для эндотоксинов грамотрицательных бактерий, которые взаимодействуя с макрофагами печени, способствуют высвобождению провоспалительных цитокинов (ФНО-α и ИЛ-1), усиливающих повреждение печени. В то же время нарушение процессов синтеза и экскреции компонентов желчи при поражениях печени провоцируют развитие дисбиоза.

References

1. Ekihiro Seki, Bernd Schnabl Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *The Journal of Physiology*. 2012; 590(3): 447-58.
2. Cesaro C., Tiso A., Del Prete A., Cariello R., Tuccillo C., Cotticelli G. et al. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2011; 43(6):431-8.
3. Gyongyi Szabo, Shashi Bala, Jan Petrasek, Arijet Gattu Gut-Liver Axis and Sensing Microbes. *Digestive diseases*. 2011; 28(6): 737-44.

4. World Health Organization. *Hepatitis C factsheet*. №164. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> (accessed 5 March 2016).
5. Zakirov I.G. Colon microecology of patients with chronic viral hepatitis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2002; 83(2):38-40. (in Russian)
6. Solov'eva N.V., Lebedeva O.V., Bazhukova T.A., Agafonov V.M., Zykova N.N. Abnormal liver function and colon microbiocenosis in chronic viral hepatitis. *Infektsionnye bolezni*. 2009; 2: 13- 6. (in Russian)
7. Yang A.L., Kshyap P.C. A clinical primer of the role of gut microbiome in health and disease. *Tropical gastroenterology: official journal of the Digestive Diseases Foundation*. 2015; 36(1):1-13.
8. Serov V.V., Severgina L.O. Morphological criteria for assessing the etiology, degree of activity and process steps in viral chronic hepatitis B and C. *Arkhiv Patologii*. 1996; 4: 61-4. (in Russian)
9. EASL Clinical Practice Guidelines. Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. 2011; 55: 245-264.
10. Likhoded V.G. *Endotoxin immunity in the esherikhia population regulation of intestinal microflora. [Antiendotoksinovyy immunitet v regulyatsii chislennosti esherikhioznoy mikroflory kishechnika]*. Moscow: Meditsina; 2007. (in Russian)
11. Resta-Lener S., Barret K. Live probiotics protect intestinal cells from the effects of infection with invasive *Escherichia coli*. *Gut*. 2003; 52: 988-97.
12. Yan F., Polk D. Probiotic bacterium prevent cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. 27; 277(52):50959-65.
13. Kol'man Ya., Rem K.G. *Transparent biochemistry. [Naglyadnaya biokhimiya]*. Moscow: Binom Laboratoriya Znaniy; 2011. (in Russian)

Сведения об авторах:

Давидович Наталья Валерьевна, аспирант каф. патологической физиологии СГМУ, e-mail: nvdavidovich@gmail.com

Бажукова Татьяна Александровна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ, e-mail: bta@atnet.ru

Агафонов Владимир Михайлович, канд. мед. наук, доцент каф. инфекционных болезней СГМУ, e-mail: va-gaf1@rambler.ru

© Пальцын А.А., 2017
УДК 616-092

Пальцын А.А.

Микрочастицы тромбоцитов

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8
Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования
Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

Идея везикулярного способа межклеточных коммуникаций появилась в начале XXI века и сегодня быстро развивается. Определено, что таким способом передаются сигналы во многих биологических и патологических процессах: циркуляция, регенерация, атеросклероз, опухолевый рост. Стало очевидно, что проблема везикулярных межклеточных коммуникаций представляет интерес для медицины. Знания в этой области могут быть использованы и уже начинают использоваться для диагностики, прогнозирования и лечения ряда тяжелых заболеваний, таких как, атеросклероз, диабет, рак. Важный момент в развитии указанных заболеваний представляют собой передающие межклеточные сигналы микрочастицы тромбоцитов. Они, кроме того, участники некоторых важнейших физиологических процессов.

Ключевые слова: тромбоцит; микрочастицы; экстрацеллюлярные везикулы; межклеточные взаимодействия.

Для цитирования: Пальцын А.А. Микрочастицы тромбоцитов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 99—105

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 16.09.2016

Paltsyn A.A.

Platelet microparticles

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia
Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

The idea of a vesicular way of intercellular communications has appeared at the beginning of the XXI century and today quickly develops. It is determined that in such a way the signals are transmitted in many biological and pathological processes: circulation, regeneration, atherosclerosis, tumor growth. It became obvious that the problem of vesicular intercellular communications is of great medical interest. Knowledge in this area can be used and already begins to use for diagnostics, prognosis and treatment of several serious diseases, including, such spread as an atherosclerosis, diabetes, cancer. An important moment in the development of these diseases — transmitting intercellular signals by platelet microparticles. They, in addition, are participants some of important physiological processes.

Keywords: platelet; microparticles; extracellular vesicles; cell-cell communications.

For citation: Paltsyn A.A. Platelet microparticles. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61(1): 99—105 (in Russ.).

Corresponding author: Paltsyn A.A., lrrp@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 16.09.2016

На протяжении многих десятилетий считалось, что межклеточные взаимодействия осуществляются либо путем прямого физического контакта клеток, либо путем выделения в среду сигнальных молекул. Сложилось представление, что такие молекулы дей-

ствуют, связываясь с соответствующими рецепторами на поверхности клетки-мишени, или внутри клетки будучи поглощенными ею. В последние годы в биологию пришло осознание замечательного факта — широкого распространения в физиологических и патоло-

гических процессах жизнедеятельности везикулярного способа передачи сигнала. Выяснилось, что очень многие, а может быть, и все клетки отделяют от поверхностной мембраны везикулы со сложным набором биологически активных веществ, содержащихся, как в полости везикул, так и на их мембране. Общее название этих образований «экстрацеллюлярные везикулы». Самый общий список содержимого: РНК, белки, липиды. Многие стороны биологии экстрацеллюлярных везикул остаются неизвестными, однако объем уже приобретенных знаний (больше из области патологии, чем физиологии) оказался достаточным для осознания их важной биологической роли и обусловил наблюдаемую сегодня популярность этой проблемы.

В большинстве работ экстрацеллюлярные везикулы по механизму образования и по размеру делят на 2 типа: экзосомы, образующиеся из мультивезикулярных телец и имеющие размер (30—100 нм) и микрочастицы (МЧ), окруженные клеточной мембраной экстрацеллюлярные везикулы размером от 100 до 1000 нм. Указывается, что в плазме здорового человека после осаждения тромбоцитов содержится 18% экзосом и 82% МЧ [1]. Представленные процентные соотношения этих типов экстрацеллюлярных везикул, конечно, стоит воспринимать не более как приблизительные. Уже размерный критерий не позволяет их строго разграничить. Кроме того соотношение их «выходов» различается при разных методах получения биологических жидкостей, выделения и хранения везикул [2].

Образуются МЧ путем экзоцитоза многими клетками: моноцитами, макрофагами, В и Т лимфоцитами, нейтрофилами, эритроцитами, эндотелиоцитами, эпителиоцитами, нейрональными прогениторными клетками (NPC), нейронами, астроцитами, микроглиоцитами. Отделение клетками МЧ — постоянный, конститутивный процесс, усиливающийся при активации или апоптозе. Образованием МЧ природа решает 3 задачи. Защищает биологически активные факторы от ферментализации в жидких средах организма, обеспечивает одновременную доставку комплекса факторов к отдаленным реципиентам, освобождается от «ненужных» или избыточных компонентов клетки.

По результатам нашего поиска, микрочастицы тромбоцитов открыл, не поняв этого факта, O'Brien [3]. Частиц он не наблюдал, но обнаружил их биологическое действие, а именно — коагулирующую активность сыворотки, не содержащей тромбоцитов. Некогда воспринимаемые как клеточный детрит «клеточная пыль» [4], МЧ теперь признаются научным сообществом как эффекторы с важными биологическими функциями, образовавшиеся в регулируемом процессе [5]. МЧ играют существенную роль

в таких процессах, как воспаление, сердечно- и невровазкулярные болезни, атеросклероз, иммунный ответ, диссеминация опухолей, диабет, гемостаз, ангиогенез.

Продукция тромбоцитарных микрочастиц (ТМЧ) стимулируется увеличением внутриклеточного содержания кальция, ROS (reactive oxygen species), тромбином, эндотоксином, активацией системы комплемента, медиаторами воспаления, АДФ, адреналином, гипоксией, стрессом, апоптозом [6]. В экспериментах *in vitro* в качестве активаторов отделения ТМЧ указываются липополисахариды, IL-6, эритропоэтин, коллаген, норадреналин, ионофор A23187, TNF α , С-реактивный белок [7]. Даже этот неполный список активаторов образования МЧ делает понятным тот факт, что почти при всех заболеваниях концентрация МЧ в крови возрастает. В принципе уровень увеличения соответствует тяжести болезни [8]. Такое положение представляется заманчивой областью для медицинских исследований. Нельзя исключить, что определяя клеточную принадлежность и концентрацию МЧ в крови, удастся совершенствовать диагностику, прогноз и эффективность терапии некоторых болезней. Есть и факты, свидетельствующие о реалистичности такого предположения. Так добавление витамина С к обычной терапии пациентам с инфарктом миокарда существенно снижало уровень прокоагулянтных ТМЧ и эндотелиальных МЧ. Иными словами, по содержанию МЧ можно судить о степени риска тромботических осложнений и, соответственно, о действии витамина С [9]. Повышенный уровень ТМЧ многократно находили при инсультах [10]. Способностью ТМЧ стимулировать тромбоз и ангиогенез некоторые авторы объясняют их вклад в метастазирование опухолей с перспективой использования ТМЧ в качестве диагностического и прогностического маркера в онкологии [11].

ТМЧ отличаются от МЧ всех других клеток. ТМЧ порождаются не клетками, а образованиями, которые сами соответствуют понятию МЧ — тромбоцитами, которые во-первых, не имеют ядра, во-вторых, по размеру «минимальные» тромбоциты «не выходят за рамки» максимальных МЧ — 1000 нм. Существует и ещё одно сходство между тромбоцитами и ТМЧ. Есть сообщения о том, что циркулирующие в крови здоровых людей ТМЧ продуцируются, как и сами тромбоциты, мегакариоцитами [12,13].

Сказанное не означает, однако, что в создании природой ТМЧ не удастся обнаружить биологической целесообразности, что они, будучи карликовым вариантом тромбоцитов, просто дублируют их функцию. ТМЧ, хотя и сходны с тромбоцитами, но имеют и существенные отличия от них. Главный отличаю-

щий момент — возможность слияния ТМЧ с реципиентом, с клеткой-мишенью. Тромбоцит же с другими клетками, по-видимому, не сливается, по крайней мере, сообщений об этом не найдено. Таким образом, в отличие от тромбоцита, взаимодействующего с клетками-мишенями только механизмом лиганд — рецептор, ТМЧ за счет возможности слияния увеличила набор взаимодействий.

Слияния ТМЧ с клетками-мишенями обеспечивают передачу этим клеткам генетической информации [14]. Наследуемый геном, а также возникающие в нем мутации, в том числе вызванные болезнью, определяют транскриптом мегакариоцитов и выражаются в особенностях трансляции и в тромбоцитах и в ТМЧ [15]. Современный уровень знаний об экстрацеллюлярных везикулах разрушает «заслуженную» и по возрасту и по значению догму биологии о том, что свойства клетки определяются геномом. Перенос ТМЧ мРНК и мкРНК, полученных от мегакариоцитов и тромбоцитов, в клетки-мишени меняет генетическую программу мишеней, придает им новые качества [16]. В тех случаях, когда ТМЧ осуществляют мРНК или мкРНК зависимый контроль функции клеток-мишеней, эффект достигается именно через механизм слияния МЧ. Этот механизм избавляет мРНК и мкРНК от деградации РНК-азами крови [17]. Ещё способ переноса содержимого МЧ в клетку мишень — фагоцитоз [18]. В эксперименте D. Faillie [19] ингибиторы как фагоцитоза, так и макропиноцитоза подавляли поглощение ТМЧ. Эта работа особенно интересна тем, что авторы исследовали эндоцитоз ТМЧ эндотелиальными клетками мозга — участниками очень важного регенераторного процесса. Разнообразие способов взаимодействия ТМЧ с клетками-мишенями наделяет ТМЧ способностью влиять на мишени не так как тромбоциты. Различие создается не только изоляцией внутреннего содержимого частиц от биоактивных молекул плазмы, но и тем фактом, что активность молекулы в растворе и фиксированной на мембране различна [20]. Содержание связанных с клеточной мембраной белков и липидов в тромбоцитах и ТМЧ может различаться [21]. Коллективом авторов из центра Гематологии РАМН показано, что прокоагуляционная активность поверхности ТМЧ в 50—100 раз превышает активность поверхности тромбоцитов. Те и другие активировались ионофором A23187 [22].

Для суждения о возможных эффектах тромбоцитов и их МЧ существенное значение имели бы данные морфологического, электронно-микроскопического анализа МЧ. Конечно, необходимо было бы знать о представительстве в МЧ гранул тромбоцитов, прежде всего богатых биологически-активными веществами и наиболее многочисленных в тромбоците α

гранул. Однако ответа на этот самый первостепенный и очевидный вопрос в литературе найти не удалось. Даже в статьях, посвященных методам анализа тромбоцитарных МЧ [23—26] первичных, доказательных морфологических препаратов не представлено. В отечественной статье по ТМЧ и, по-видимому, лучшей электронно-микроскопической работе по обсуждаемой теме, в МЧ различимы преимущественно только мембраны, а из внутреннего содержимого показаны митохондрии и гранулы гликогена [27].

Отделение активированными тромбоцитами МЧ сопровождается перемещением фосфатидилсерина с внутреннего слоя клеточной мембраны на наружный. Таким образом, усиливается (сравнительно с тромбоцитом) тромбогенное действие ТМЧ и, кроме того, фосфатидилсерин становится важным маркером для идентификации ТМЧ [28]. Количество и качество ТМЧ зависит от активирующего стимула [29]. Проточной цитометрией и протеомным анализом исследовали влияние 2 способов активации: стрессом сдвига и тромбином. При стрессе сдвига тромбоциты отделяли большее число МЧ. Существенное различие в зависимости от способа активации обнаружено по содержанию 30 белков, в том числе двух регуляторов ангиогенеза: Dok-2 и интегрин α 6 [30]. Содержание ТМЧ заметно различается даже у здоровых доноров [31].

Процесс образования МЧ тромбоцитами выражен значительно, чем это бывает в других клетках. МЧ тромбоцитов раньше других МЧ были идентифицированы и описаны [4]. Не так давно считали, что они наиболее многочисленны, составляют около 80% присутствующих в крови МЧ. [32, 33]. Однако более поздние исследования публикуют цифру: 25% [34]. Концентрация ТМЧ в крови 100/1000/мкл [35]. ТМЧ содержат мембранные белки и пептиды (рецепторы, цитокины), белки цитоскелета, в том числе актин, фосфатидилсерин, гликопротеины, протеолитические ферменты [36], металлопротеиназы, факторы роста [23], мРНК, мкРНК и ДНК [2].

Состав МЧ различается в зависимости от метода их анализа [24]. Такие технические моменты как: антикоагулянт, скорость центрифугирования, протокол фильтрации, условия хранения — влияют на особенности полученного образца [2].

Обширный комплект веществ, полученных от родительских клеток, обеспечивает ТМЧ возможность осуществлять большой набор межклеточных взаимодействий и таким образом участвовать во многих физиологических и патологических процессах. Описано, например, что в мозге они могут положительно влиять на синаптическую активность, регенерацию нервов, нейропротекцию [37] содержат ангиогенные факторы и стимулируют ангиогенез [38].

По данным А. Rank с сотрудниками [39], полупериод жизни перелитых ТМЧ в крови человека оказался 5,3—5,8 ч. Устраняться из циркулирующей крови МЧ могут несколькими способами: деградацией фосфолипазами и протеазами; опсонизацией и последующим фагоцитозом Купферовскими клетками, спленоцитами, макрофагами легких [2].

МЧ любых клеток могут проявлять прокоагулянтную активность уже за счет обилия мембранных поверхностей как пусковых моментов каскада тромбообразования. Не удивительно, что в отношении ТМЧ подозрения в прокоагулянтной активности кажутся наиболее оправданными. Действительно исследования обнаружили увеличение содержания ТМЧ при тромбозах венозного и артериального русла. Однако авторы не сочли возможным сделать заключение, о том является ли повышенное содержание ТМЧ в крови причиной или результатом тромбоза [40]. Есть сообщение, что ТМЧ могут усиливать тромбообразование на поздних стадиях при раке ободочной кишки [41]. В присутствии ТМЧ усиливается фиксация тромбоцитов и фибрина на атеросклеротических бляшках [42]. Генерация ТМЧ стимулируется *in vitro* при взятии и хранении крови. Это обстоятельство, отмеченное первооткрывателем ТМЧ Р. Wolf [4], может стать причиной осложнений при переливаниях крови [35]. Обнаружен повышенный уровень ТМЧ у людей перенесших инфаркт миокарда [43].

Недавно появилось сообщение большого коллектива по исследованию механизма тромботических осложнений при диабете и подходов к профилактике таких осложнений [44]. Изучали кровь здоровых и больных диабетом людей и мышей. В поиске способа профилактики авторы ориентировались на недавние сообщения о том, что стресс эндоплазматического ретикулаума стимулирует аутофагию и тем способствует выживанию клеток при оксидативном стрессе [45, 46]. Аутофагия — нормальный, регулируемый процесс очищения клетки от необратимо поврежденных структур с помощью лизосом. При макроаутофагии устраняются крупные образования, например, митохондрии. Явление в этом случае называется митофагией, происходит во многих клетках и в тромбоцитах в том числе. Оксидативный стресс, развивающийся при диабете, запускает в тромбоцитах следующую цепь событий: увеличивает содержание ROS, нарушает функцию митохондрий, фосфорилирует p53, усиливает апоптоз. Главным виновником большой частоты тромбозов в сердце и мозге у больных диабетом называют дисфункцию митохондрий и разрушение их апоптозом. Авторы конкретно не связывают апоптоз с увеличенным образованием ТМЧ, но, такое увеличение, как указывалось выше, не может не происходить и оно, конечно, усиливает гемостатиче-

ский потенциал крови. В то же время оксидативный стресс при диабете может выражаться и другой последовательностью изменений. Поврежденные митохондрии могут удаляться не апоптозом, а путем митофагии, уровень которой поддается регулированию. Необходимый уровень митофагии создавали *in vitro* в крови больных диабетом и наблюдали снижение гемостатических характеристик крови. В качестве перспективы клинического использования результатов работы успешно испытана возможность выращивать в культуре мегакариоцитов «тромбоцитоподобные частицы» (plateletlike particle), но экспериментов с ними не проводили и больным эти частицы не переливали. Видимо следует оценить это исследование как заслуживающее дальнейшей разработки и имеющее вероятность практического применения. Авторы смогли регуляцией уровня митофагии снизить коагулирующее действие крови больных диабетом. Конечно, на основе этого знания нельзя уже сегодня переливать соответственно обработанные тромбоциты больным, но после дополнительных проверок, эта идея, может быть, будет принята клиницистами. В этой связи следует сказать о разработке в последние годы (пока тоже не воплотившейся в практику) способа выращивания тромбоцитов в культуре [47, 48]. Возможно, однако, что более успешным в лечении окажется не переливание «исправленной» крови, а «исправление» на основе полученных знаний крови *in vivo*.

Прежде всего, ТМЧ влияют на биологические свойства ближайших соседей: клетки крови и кровяные клетки. Сокультивирование ТМЧ с нормальными стволовыми и прогениторными клетками крови, а также с лейкоцитарными клетками вызывало ответную реакцию этих клеток, выражающуюся хемотаксисом, стимуляцией адгезии, пролиферации и приживления, активацией внутриклеточных сигнальных систем [49]. Действие ТМЧ лишь частично снижалось нагревом или трипсином. Это доказывает, что их биологическая активность обусловлена не только белковым, но и липидным компонентом.

Есть сообщения о прорегенераторном действии ТМЧ. Из крови больных атеросклерозом выделяли мононуклеарные клетки и ТМЧ. Среди мононуклеаров были циркулирующие ангиогенные клетки (ЦАК) Сокультивирование ТМЧ и ЦАК повышало адгезивную способность ЦАК. Внутривенная инъекция таких ЦАК крысам с ишемией задних конечностей улучшала васкуляризацию, увеличивала инкорпорацию ЦАК в капилляры ишемизированных конечностей [50].

В клиническом исследовании американских и китайских врачей, проведенном на 112 больных с острым ишемическим инсультом (контроль 35 здоровых людей), обнаружено значительное увеличение

содержания ТМЧ и тромбоцитов у больных по сравнению с контролем. Антитромбоцитарная терапия у пациентов снижала уровень ТМЧ, но не тромбоцитов. Объем инфаркта положительно коррелировал с содержанием ТМЧ у больных с атеросклерозом крупных артерий. С содержанием тромбоцитов корреляции не отмечено. Не найдено корреляции уровня ТМЧ с факторами риска: гипертонической болезнью, диабетом [51].

Группа исследователей из Израиля изучала возможность терапевтического применения ТМЧ человека в экспериментах с ишемизирующим тромбозом в сердце и мозге. В модели инфаркта у крыс A. Brill с сотрудниками [52] сразу после перевязки левой коронарной артерии вводили в миокард по периферии ишемизированного участка ТМЧ. Через 3 нед. наблюдали статистически значимое увеличение числа сосудов в поврежденной области сравнительно с контролем (введение раствора без ТМЧ). В том же учреждении и по той же схеме эксперимента выполнены несколько работ по исследованию действия ТМЧ на течение инсульта [53]. У спонтанно гипертензивных крыс в возрасте 13 нед. вызывали окклюзию средней мозговой артерии, что приводило к инсульту фронто-париетальной коры, занимающей 19—24% полушария. Поврежденный участок закрывали пленкой (5x5 мм) биоразлагаемого полимера с фосфатным буферным раствором (ФБ) или с ФБ, содержащем взвесь 10 мкг/мл или 100 мкг/мл ТМЧ. Местным применением ТМЧ авторы рассчитывали создать регенеративный эффект и избавиться от тромботического эффекта циркулирующих по сосудам ТМЧ. В течение 90 сут. после инсульта многократно исследовали степень восстановления нарушенной двигательной активности. В проведенном через 90 сут. морфологическом исследовании иммуноцитохимически определяли число сосудов и меченых предшественником ДНК (BrdU) клеток. ТМЧ дозозависимо увеличивали плотность расположения сосудов на границе зоны инсульта. Частота коаголизации метки эндотелиоцитов и BrdU указывала на то, что многие из этих сосудов были вновь образованными. На границе зоны повреждения в группе животных с ТМЧ увеличивалось число клеток совмещавших метку BrdU с меткой астроцитов, олигодендроцитов и нейронов (в последнем случае демонстрация не убедительна). Это доказывает, что ТМЧ стимулируют дифференцировку нейральных стволовых клеток. В то же время большое количество клеток, совмещающих метку BrdU с меткой клеток-предшественников (SOX2, Nestin) как в группе с ТМЧ, так и в контроле свидетельствует, что полная дифференцировка клеток ЦНС занимает много времени. Тем не менее, недифференцированных предшественников в группе ТМЧ было боль-

ше. Первые признаки восстановления нарушенной инсультом двигательной активности отмечали через 20 сут. В группе ТМЧ восстановление происходило быстрее и с дозозависимым эффектом. Размер очагов инсульта был меньше в группе ТМЧ, однако разница с контролем не достигала статистически значимой величины. В другом, сходном по схеме, эксперименте того же коллектива, где испытывали не ТМЧ, а лизат тромбоцитов (введение в боковой желудочек) авторы наблюдали через 90 сут. статистически значимое уменьшение величины очага и увеличение скорости восстановления функции [54].

ТМЧ усиливают прокоагулянтное действие тромбоцитов, могут способствовать метастазированию раковых клеток, тромбообразованию после операций на сосудах [55], развитие воспаления, стимулировать процессы регенерации. Будучи посредником в передаче информации от тромбоцитов клеткам-мишеням, они не просто перемещают произведенные тромбоцитами активные молекулы, но могут количественно и качественно менять переданный сигнал. Очень важны для медицинской практики данные об ускоренном образовании ТМЧ при заготовке крови, разделении её на компоненты и хранении. Это может обернуться тромботическими и воспалительными побочными реакциями при переливаниях крови больным. Кроме того, отчетливо обозначается необходимость строгого соблюдения отработанных методов работы с жидкостями, содержащими ТМЧ, чтобы получать ожидаемые биологические эффекты. Имеются благоприятные результаты терапевтического использования ТМЧ.

References

1. Arraud N., Linares R., Tan S., Gounou C., Pasquet J.M., Mornet S., et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost.* 2014;12:614-27.
2. Barteneva N.S., Fasler-Kan E., Bernimoulin M., Stern J.N., Ponomarev E.D., Duckett L., et al. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol.* 2013; Apr 22:14-23.
3. O'Brien J.R. The platelet-like activity of serum. *Br J Haematol.* 1955; Apr;1(2):223-8.
4. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematology.* 1967;13(3):269-88.
5. McGinn C.M., MacDonnell B.F., Shan C.X., Wallace R., Cummins P.M., Murphy R.P. Microparticles: A Pivotal Nexus in Vascular Homeostasis and Disease. *Curr Clin Pharmacol.* 2016;11(1):28-42.
6. Antwi-Baffour S., Adjei J., Aryeh C., Kyeremeh R., Kyei F., Seidu M.A. Understanding the biosynthesis of platelets-derived extracellular vesicles. *Immun Inflamm Dis.* 2015; Sep;3(3):133-40.

7. Burger D., Schock S., Thompson C.S., Montezaño A.C., Hakim A.M., Touyz R.M. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical Science*. 2013;124(7):423-41.
8. Lannan K.L., Sahler J., Kim N., Spinelli S.L., Maggirwar S.B., Garraud O., et al. Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. *Front Immunol*. 2015; Feb 13:6:48.
9. Morel O., Jesel L., Hugel B., Douchet M.P., Zupan M., Chauvin M., et al. Protective effects of vitamin C on endothelium damage and platelet activation during myocardial infarction in patients with sustained generation of circulating microparticles. *J Thromb Haemost*. 2003;1:171-7.
10. Kuriyama N., Nagakane Y., Hosomi A., Ohara T., Kasai T., Harada S., et al. Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2010; Feb,16(1):26-32.
11. Falanga A., Tartari C.J., Marchetti M. Microparticles in tumor progression. *Thromb Res*. 2012; Apr;129 Suppl 1:S132-6.
12. Flaumenhaft R., Dilks J.R., Richardson J., Alden E., Patel-Hett S.R., Battinelli E., et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*. 2009; Jan 29;113(5):1112-21.
13. Italiano J.E., Mairuhu A.T., Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol*. 2010; Nov 17(6):578-84.
14. Goubran H.A., Burnouf T., Stakiw J., Seghatchian J. Platelet microparticle: a sensitive physiological «finetuning» balancing factor in health and disease. *Transfus Apher Sci* 2014; 52: 12-8.
15. Rondina M.T., Weyrich A.S. Regulation of the genetic code in megakaryocytes and platelets. *J Thromb Haemost*. 2015; Jun13 Suppl 1:S26-32.
16. Clancy L., Freedman J.E. New paradigms in thrombosis: novel mediators and biomarkers platelet RNA transfer. *J Thromb Thrombolysis*. 2014; 37: 12-6.
17. Diehl P., Fricke A., Sander L., Stamm J., Bassler N., Htun N., et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res*. 2012; 93:633-644.
18. Christianson H.C., Svensson K.J., van Kuppevelt T.H., Li J.P., Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:17380-5.
19. Faille D., El-Assaad F., Mitchell A.J., Alessi M.C., Chimini G., Fusai T., et al. Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J Cell Mol Med*. 2012; Aug 16(8):1731-8.
20. Tanaka M., Itai T., Adachi M., Nagata S. Down regulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med*. 1998;4:31-6.
21. Biro E., Akkerman J.W., Hoek F.J., Gorter G., Pronk L.M., Sturk A., et al. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2754-2763.
22. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Panteleev M.A., Krymskaya O.V., et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*. 2007; Mar 97(3):425-34.
23. Burnouf T., Goubran H.A., Chou M.L., Devos D., Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev*. 2014; Jul 28(4):155-66.
24. Schindler S.M., Little J.P., Klegeris A. Microparticles: a new perspective in central nervous system disorders *Biomol Res Int*. 2014;756327.
25. Arraud N., Linares R., Tan S., Gounou C., Pasquet J.M., Mornet S., et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 2014; May12(5):614-27.
26. Gyorgy B., Szabo T.G., Turiak L., Wright M., Herczeg P., Ledeczki Z., et al. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One*. 2012;7(11):e49726.
27. Ponomareva A.A., Nevzorova T.A., Mordakhanova E.R., Andrianova I.A., Litvinov R.I. Structural characterization of platelets and platelet-derived microvesicles. *Tsitologiya*. 2016;58(2):105-14. (in Russian)
28. Antwi-Baffour S., Adjei J., Aryeh C., Kyeremeh R., Kyei F., Seidu M.A. Understanding the biosynthesis of platelets-derived extracellular vesicles. *Immun Inflamm Dis*. 2015; Sep 3(3):133-40.
29. Perez-Pujol S., Marker P.H., Key N.S. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A*. 2007; 71: 38-45.
30. Shai E., Rosa I., Parguina A.F., Motahedeh S., Varon D., Garcia A. Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus. *J Proteomics*. 2012; Dec 5;76 Spec No.:287-96.
31. Kriebardis A.G., Antonelou M.H., Georgatzakou H.T., Tzounakas V.L., Stamoulis K.E., Papassideri I.S. Microparticles variability in fresh frozen plasma: preparation protocol and storage time effects. *Blood Transfus*. 2016; May 14(2):228-37.
32. Diamant M., Tushuizen M.E., Sturk A., Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004; 34: 392-401.
33. Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006; Sep 20(9): 1487-95.
34. Arraud N., Linares R., Tan S., Gounou C., Pasquet J.M., Mornet S., et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 2014; 12:614-27.
35. Simak J., Gelderman M.P. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* 2006;20:1-260.
36. Antwi-Baffour S., Adjei J., Aryeh C., Kyeremeh R., Kyei F., Seidu M.A. Understanding the biosynthesis of platelets-derived extracellular vesicles. *Immun Inflamm Dis*. 2015; Sep 3(3):133-40.
37. Lai C.P., Breakefield X.O. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Frontiers in Physiology*. 2012; 3, article 228.
38. Rhee J.S., Black M., Schubert U., Fischer S., Morgenstern E., Hammes H.P., et al. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2004;92:394-402.

39. Rank A., Nieuwland R., Crispin A., Grutzner S., Iberer M., Toth B., et al. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*. 2011;22:111-16.
40. Nomura S., Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J Intensive Care*. 2015; Jan 7:3(1):2.
41. Zhao L., Bi Y., Kou J., Shi J., Piao D. Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016; Mar 25: 35:54.
42. Suades R., Padro T., Vilahur G., Badimon L. Circulating and platelet-derived microparticles in human blood enhance thrombosis on atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*. 2012; Dec 108(6):1208-19.
43. Michelsen A.E., Brodin E., Brosstad F., Hansen J.B. Increased level of platelet microparticles in survivors of myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008; 68(5):386-92.
44. Lee S.H., Du J., Stitham J., Atteya G., Lee S., Xi-ang Y., et al. Inducing mitophagy in diabetic platelets protects against severe oxidative stress. *EMBO Mol Med*. 2016; Jul 1 8(7):779-95.
45. Habertzell P., Hill B.G. Oxidized lipids activate autophagy in a JNK-dependent manner by stimulating the endoplasmic reticulum stress response. *Redox Biol*. 2013 Jan 26;1:56-64.
46. Cai Y., Arikath J., Yang L., Guo M.L., Periyasamy P., Buch S. Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders. *Autophagy*. 2016;12(2):225-44.
47. Thon J.N., Mazutis L., Wu S., Sylman J.L., Ehrlicher A., Machlus K.R. et al. Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood*. 2014; Sep 18;124(12):1857-67.
48. Wang B., Zheng J. Platelet generation in vivo and in vitro. *Springerplus*. 2016; Jun 21;5(1):787.
49. Baj-Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D., Ratajczak J., Vilaire G., Kijowski J., et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2002; May 30(5):450-9.
50. Ohtsuka M., Sasaki K., Ueno T., Seki R., Nakayoshi T., Koiwaya H., et al. Platelet-derived microparticles augment the adhesion and neovascularization capacities of circulating angiogenic cells obtained from atherosclerotic patients. *Atherosclerosis*. 2013; Apr 227(2):275-82.
51. Chen Y., Xiao Y., Lin Z., Xiao X., He C., Bihl J.C., et al. The Role of Circulating Platelets Microparticles and Platelet Parameters in Acute Ischemic Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015; Oct;24(10):2313-20.
52. Brill A., Dashevsky O., Rivo J., Gozal Y., Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 30-8.
53. Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., Brill A., Varon D., Leker R. R. Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia. *Curr. Neurovasc. Res*. 2012; 9: 185-192.
54. Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., Varon D., Leker R.R. Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke. *Thromb. Haemost*. 2013; 11: 323-330.
55. Kuznik B.I., Bogdanov I.G., Isakova N.V., Serebrijskij I.I., Kas'janenko N.V. Thrombodynamic properties of arterial and venous blood in ischemic patients in preoperative and early postoperative periods after bypass grafting. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(1): 39-45. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2017
УДК 612.13.014.063

Горбунов А.С., Маслов Л.Н.

Триггерные и сигнальные механизмы адаптивного феномена ишемического посткондиционирования

«Научно-исследовательский институт кардиологии» Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский медицинский центр» Российской академии наук, 634012, г. Томск, ул. Киевская, д. 111

В ишемическом посткондиционировании сердца триггерную роль играют рецепторы аденозина, опиоидов, брадикинина и ген-кальцитониновый пептид. Сигнальная система ишемического посткондиционирования включает в себя: PI3-киназу, Akt-киназу, эндотелиальную NO-синтазу, NO, гуанилатциклазу, протеинкиназу G, протеинкиназу Cε, митохондриальный K_{ATP}-канал, активные формы кислорода, MPT-пору, белок Ras, MEK-киназу, ERK1/2-киназу.

Ключевые слова: сердце, посткондиционирование, киназы, K_{ATP}-канал, MPT-пора.

Для цитирования: Горбунов А.С., Маслов Л.Н. Триггерные и сигнальные механизмы адаптивного феномена ишемического посткондиционирования. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017; 61(1): 106–113.*

Для корреспонденции: Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии Томский НИМЦ, e-mail: Maslov@cardio-tomsk.ru

Финансирование. Статья подготовлена при поддержке Российского научного фонда грант 16-15-10001.

Конфликт интересов отсутствует.

Поступила 10.08.2016

Gorbunov A.S., Maslov L.N.

Trigger and signaling mechanisms of adaptive phenomenon of ischemic postconditioning

Cardiology Research Institute, Tomsk NRMS, ul. Kievskaya 111A, 634012 Tomsk

Receptors of adenosine, opioids, bradykinin and calcitonin gene-related peptide play a trigger role in ischemic postconditioning of heart. Signal system of ischemic postconditioning includes: PI3 kinase, Akt kinase, endothelial NO-synthase, NO, guanylyl cyclase, protein kinase G, protein kinase Cε, mitochondrial K_{ATP} channel reactive oxygen species, MPT pore, protein Ras, MEK kinase, ERK1/2 kinase.

Keywords: heart, postconditioning, kinases, K_{ATP} channel, MPT pore.

For citation: Gorbunov A.S., Maslov L.N. Trigger and signaling mechanisms of adaptive phenomenon of ischemic postconditioning. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61 (1): 106–113. (in Russ.)*

For correspondence: Maslov Leonid Nikolaevich, Doctor of Medical Sciences, Head, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk NRMS, ul. Kievskaya 111A, 634012 Tomsk, Russian Federation, e-mail: Maslov@cardio-tomsk.ru

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

Funding. The study was supported by Russian Science Foundation grant 16-15-10001.

Information about authors:

Gorbunov A.S., orcid.org/ 0000-0002-5890-071X

Maslov L.N. orcid.org/0000-0002-6020-1598

Received 10.08.16

Адаптивный феномен ишемического посткондиционирования был открыт в 2003 году группой американских физиологов [1]. В экспериментах на собаках они моделировали экспериментальный инфаркт миокарда с помощью 60-минутной окклюзии левой нисходящей коронарной артерии. После ишемии в процессе 3-часовой реперфузии сердца проводили три сеанса 30-секундной реперфузии и три сеанса 30-секундной ишемии. В результате этих манипуляций сердце становилось более устойчивым к реперфузионным повреждениям, это проявлялось в уменьшении индекса размер инфаркта/область риска (РИ/ОР) на 44% по отношению к группе контрольных животных, у которых не проводились сеансы реокклюзии [1]. Областью риска принято называть миокард, подвергшийся ишемии-реперфузии.

Кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования был воспроизведен в исследованиях, выполненных на различных лабораторных животных, в частности, на мышах, крысах, кроликах, свиньях [2].

Феномен ишемического посткондиционирования удаётся моделировать на изолированных кардиомиоцитах [3—6]. Следует отметить, что феномен ишемического посткондиционирования жестко ограничен временными рамками. Обычно первый сеанс ишемии моделируют уже через 10—30 с после возобновления коронарного кровотока, продолжительность ишемии не превышает 10—30 с, а длительность реперфузии составляет 10—30 с [7—12]. Общепринятого протокола посткондиционирования не существует, каждый коллектив исследователей вырабатывает свою методику, базируясь на собственных данных.

Основными проявлениями ишемии-реперфузии (ИР) миокарда являются: некроз и апоптоз кардиомиоцитов, эндотелиальная дисфункция, нарушения сердечного ритма, реперфузионная сократительная дисфункция сердца. Главной причиной гибели кардиомиоцитов во время ишемии является некроз, а после возобновления коронарной перфузии основной причиной гибели клеток сердца становится апоптоз [13—15]. Антиапоптотический эффект ишемического посткондиционирования впервые был показан в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах. Апоптоз оценивали по количеству «TUNEL-позитивных клеток» (terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling). Ишемическое посткондиционирование уменьшало на 21% количество TUNEL-позитивных клеток после гипоксии и реоксигенации кардиомиоцитов [6]. Антиапоптотический эффект посткондиционирования был подтвержден в независимых исследованиях, выполненных в опытах на крысах с коронароокклюзией-реперфузией [12, 16, 17]. По данным некоторых авторов,

ишемическое посткондиционирование снижает интенсивность апоптоза в период реперфузии в 2 раза [12, 16, 17].

Поскольку феномен ишемического посткондиционирования моделируется на изолированном сердце и культуре кардиомиоцитов, есть основание утверждать, что в механизме ишемического посткондиционирования решающее значение имеют локальные процессы, происходящие на уровне миокарда и кардиомиоцитов, а не вегетативная нервная система или циркулирующие в крови гуморальные факторы. Феномен посткондиционирования не имеет половой специфичности, по крайней мере, у крыс.

Учитывая определенное сходство ишемического прекодиционирования и ишемического посткондиционирования, уместно было предположить, что триггерными факторами этих адаптационных феноменов являются одни и те же биологически активные вещества. Известно, что в первой фазе ишемического прекодиционирования решающую роль играют: аденозин, брадикинин, опиоиды и активные формы кислорода (АФК) [18]. В отсроченном (поздняя фаза) ишемического прекодиционирования ключевую роль играет радикал оксида азота (NO[•]) и продукты метаболической активности циклооксигеназы-2 [18]. В одной из первых работ, посвященных изучению механизмов ишемического посткондиционирования, исследователи обратили внимание на то, что ишемическое прекодиционирование не усиливает кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования [9]. Это говорит о сходстве молекулярных механизмов прекодиционирования и посткондиционирования. При поиске эндогенных триггеров ишемического посткондиционирования исследователи, прежде всего, обратили внимание на вышеперечисленные биологически активные вещества.

Необходимо отметить, что способность агонистов аденозиновых (А) рецепторов избирательно предупреждать реперфузионные повреждения была обнаружена в 1997 г. ещё до открытия феномена посткондиционирования [19]. Первые публикации об участии эндогенного аденозина в механизме ишемического посткондиционирования появились в 2005 г. [20, 21]. В экспериментах, выполненных на изолированном перфузируемом сердце кролика, было показано, что блокада всего пула аденозиновых рецепторов препаратом 8-*p*-(sulphophenyl) theophylline (SPT) полностью устраняет защитный эффект ишемического посткондиционирования [21]. Блокада аденозиновых рецепторов второго (A_{2A}) или третьего типа (A₃) полностью устраняла кардиопротекторный эффект посткондиционирования в исследованиях, выполненных на изолированных перфузируемых сердцах мышей [20]. Однако ингибирование рецепторов первого

типа (A_1) не влияло на инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования. Основываясь на этих фактах, авторы работы полагают, что защитный эффект посткондиционирования связан с активацией A_{2a} - и A_3 -рецепторов эндогенным аденозином [20]. Китайские исследователи в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах имитировали феномен ишемического посткондиционирования с помощью добавления аденозина в среду инкубации кардиомиоцитов после воздействия гипоксии-реоксигенации [22]. Данный эффект не проявлялся в условиях селективной блокады A_1 -рецепторов препаратом ДРСРХ [22]. Это свидетельствует, что активация A_1 -рецепторов имитирует феномен посткондиционирования.

В настоящее время доказано, что аденозин является одним из триггерных факторов ишемического посткондиционирования. Большинство авторов полагают, что инфаркт-лимитирующий эффект ишемического посткондиционирования связан с оккупацией A_{2a} -рецепторов эндогенным аденозином.

В 2005 г. впервые были получены данные о том, что периферические опиоидные рецепторы (ОР) могут участвовать в посткондиционировании сердца [23]. В экспериментах на крысах было показано, что внутривенное введение за 5 мин до реперфузии неселективного антагониста ОР налоксона устраняет инфаркт-лимитирующий эффект ишемического посткондиционирования. В экспериментах, выполненных на изолированных перфузируемых по методу Лангендорфа сердцах крыс, было показано, что ишемическое посткондиционирование снижает реперфузионный выброс лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и предупреждает возникновение реперфузионной сократительной дисфункции. Кардиопротекторное действие ишемического посткондиционирования не проявлялось в условиях селективной блокады K -ОР норбиналторфимином [24]. Этот факт говорит об участии K -ОР в посткондиционировании. Прямо противоположные данные были получены в экспериментах на крысах *in vivo* [25]. Ишемическое посткондиционирование моделировали с помощью трёх сеансов реперфузии 10 с и реоокклюзии 10 с после 30-минутной коронароокклюзии. Антагонисты опиоидных рецепторов вводили внутривенно за 5 мин до начала реперфузии. Авторы пришли к заключению, что ишемическое посткондиционирование связано с активацией периферических μ -ОР и, возможно, δ -ОР, а K -ОР не участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте ишемического посткондиционирования [25].

Опиоиды могут имитировать феномен посткондиционирования. Этот факт был обнаружен в 2005 г. W.L. Chang и соавт. [26]. Оказалось, что внутривенная инъекция за 10 мин до реперфузии не-

селективного агониста ОР морфина (0,3 мг/кг) обеспечивает уменьшение размера инфаркта [26]. Защитный эффект морфина не проявлялся в условиях блокады ОР налоксоном или налтрексоном. Эти данные были подтверждены в независимом исследовании, выполненном в 2007 г. [27, 28]. Способность опиоидов имитировать феномен ишемического посткондиционирования была подтверждена в независимом исследовании [29] на изолированном перфузируемом сердце крысы. Сердце подвергали 45-минутной глобальной ишемии и 60-минутной реперфузии, ишемическое посткондиционирование имитировали с помощью добавления в перфузионный раствор морфина (0,3, 3 и 30 мкМ/л) в момент начала реперфузии. Перфузия с морфином продолжалась 10 мин. Во всех использованных концентрациях морфин уменьшал площадь инфарктированного миокарда и снижал реперфузионный выброс КФК. Блокада всех типов ОР приводила к исчезновению кардиопротекторного эффекта морфина. Инфаркт-лимитирующий эффект морфина не проявлялся в условиях селективной блокады K -ОР норбиналторфимином. Однако селективный антагонист δ -ОР налтриндол никак не влиял на инфаркт-лимитирующий эффект морфина [29]. Это говорит о том, что морфин имитирует феномен посткондиционирования, активируя K -опиоидные рецепторы. В опытах на изолированном сердце агонисты и антагонисты ОР вносили в перфузионный раствор за 5 мин до начала реперфузии, перфузия с лигандом ОР продолжалась 15 мин. Оказалось, что морфин и селективный δ -агонист BW373U86 имитируют феномен посткондиционирования [30]. В ходе исследований *in vitro* было установлено, что морфин индуцирует синтез NO в кардиомиоцитах. Этот эффект не проявлялся в условиях селективной блокады δ -ОР налтриндолом [30]. В экспериментах на изолированном сердце было показано, что кардиопротекторный эффект морфина не является в условиях блокады NO-синтазы или при ингибировании протеинкиназы G (ПКГ).

Подводя итог сказанному, следует отметить, что все исследователи единодушны в том, что эндогенные опиоиды и опиоидные рецепторы играют важную роль в ишемическом посткондиционировании. Однако авторы расходятся в вопросе о том, какие именно ОР участвуют в ишемическом посткондиционировании.

В экспериментах на изолированном сердце крысы было обнаружено, что блокада NO-синтазы полностью устраняет инфаркт-лимитирующий эффект ишемического посткондиционирования [31]. Следовательно, оксид азота так же может быть триггером посткондиционирования сердца.

В 2007 г. итальянские исследователи обнаружили, что брадикинин может участвовать в ишемическом посткондиционировании [31]. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы моделировали 30-минутную глобальную ишемию и 120-минутную реперфузию. Ишемическое посткондиционирование моделировали с помощью 5 циклов реперфузии 10 с и ишемии 10 с [31]. Ишемическое посткондиционирование уменьшало размер инфаркта более чем в 2 раза. Добавление в перфузат блокатора брадикининовых V_2 -рецепторов НОЕ 140 полностью устраняла кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования. В то же время добавление в реперфузионный раствор брадикинина и 3-минутная перфузия сердца этим раствором никак не влияла на размер инфаркта. Только перемежающаяся реперфузия сердца раствором, содержащим брадикинин, и раствором без брадикинина имитировала инфаркт-лимитирующий эффект ишемического посткондиционирования [31]. При проведении экспериментов на перфузированных сердцах «нокаутированных» мышей, у которых отсутствовал ген V_1 - или V_2 -рецептора брадикинина оказалось, что кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования не проявляется на сердцах мышей «нокаутированных» по гену V_2 -рецептора. Отсутствие гена V_1 -рецептора ослабляло, но не приводило к исчезновению инфаркт-лимитирующего эффекта посткондиционирования [32]. Следовательно, полученные данные говорят о том, что брадикинин может быть триггером посткондиционирования, а V_2 -рецепторы брадикинина играют важную роль в ишемическом посткондиционировании.

В 2008 г. были получены доказательства того, что триггером ишемического посткондиционирования сердца может быть ген-кальцитониновый пептид (calcitonin gene-related peptide, CGRP) [33]. Эксперименты проводили на изолированном перфузируемом сердце крысы. Продолжительность коронароокклюзии составляла 60 мин, реперфузия — 60 мин. Ишемическое посткондиционирование индуцировали с помощью 3 циклов реперфузии (1 мин и реоклюзии 1 мин). Ишемическое посткондиционирование на 40% уменьшало размер инфаркта и в 2 раза уменьшало реперфузионный выброс КФК. Селективный антагонист CGRP-рецепторов пептид CGRP 8-37 устранял защитный эффект ишемического посткондиционирования. Истощение запасов CGRP в сенсорных нервных терминалях с помощью предварительного введения капсаицина также устраняло кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования [33].

Первая публикация о триггерной роли активных форм кислорода (АФК) в посткондиционировании

появилась в 2006 г. [34]. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы моделировали глобальную 30-минутную ишемию и последующую 2-часовую реперфузию. Ишемическое посткондиционирование обеспечивало уменьшение размера инфаркта и снижение реперфузионного выброса ЛДГ из миокарда. Реперфузия сердца раствором, содержащим восстановитель сульфгидрильных групп N-ацетилцистеин, полностью устраняла инфаркт-лимитирующий эффект ишемического посткондиционирования. Авторы публикации сделали вывод о том, что триггерным фактором ишемического посткондиционирования могут быть АФК. В 2007 г. эти данные были подтверждены в независимом исследовании, выполненном японскими физиологами [35]. Они проводили эксперименты на мышах с экспериментальным инфарктом. При внутривенном введении восстановителя сульфгидрильных групп меркаптопропионил глицина (МПП) кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования устранялся. Таким образом, в независимых исследованиях показано, что АФК могут быть триггером посткондиционирования.

Еще одним претендентом на роль триггера ишемического посткондиционирования является ацетилхолин. Если ацетилхолин добавлять в среду инкубации кардиомиоцитов после воздействия гипоксии, то амплитуда сокращения клеток увеличивается почти до исходных нормальных значений [22]. В условиях блокады M_2 -холинорецепторов метоктрамином защитный эффект ацетилхолина не проявляется. Защитный эффект ацетилхолина не проявлялся в условиях блокады митохондриальных АТФ-чувствительных K^+ -каналов (мит K_{ATP} -каналов) 5-гидроксидеканоатом. Следовательно, активация M_2 -холинорецепторов и сопряженных с ними мит K_{ATP} -каналов имитирует феномен ишемического посткондиционирования. Необходимо отметить, что представленные данные говорят только о том, что ацетилхолин может имитировать феномен ишемического посткондиционирования и не позволяют утверждать, что этот нейротрансмиттер является триггером посткондиционирования.

В 2007 г. получены данные о том, что феномен ишемического посткондиционирования можно имитировать с помощью пептида урокортина, близкого по структуре кортикотропин-рилизинг-фактору [3]. При проведении экспериментов на изолированных кардиомиоцитах, моделировали 3-часовую гипоксию и 2-часовую реоксигенацию. Ишемическое посткондиционирование воспроизводили с помощью 5-минутной реоксигенации и 10-минутной гипоксии. Урокортин добавляли в инкубационную среду во время реоксигенации на 10 мин. В другой серии экспериментов на клетки сердца воздействовали с помощью сочетания

урокортина и ишемического посткондиционирования. Выяснилось, что ишемическое посткондиционирование и урокортин препятствуют реоксигенационному некрозу и апоптозу кардиомиоцитов. Сочетанное воздействие урокортина и посткондиционирования не приводило к статистически значимому усилению антиапоптотического и антиапоптозного эффекта посткондиционирования [3]. Эти данные говорят о том, урокортин имитирует феномен посткондиционирования.

В 2007 г. была опубликована работа, в которой было показано, что предсердный натрийуретический пептид-В (ПНУП-В) может имитировать ишемическое посткондиционирование [36]. В экспериментах на изолированном перфузируемом по Лангендорфу сердце моделировали 35-минутную коронароокклюзию и 2-часовую реперфузию. ПНУП-В вносили в перфузионный раствор за 5 мин до начала реперфузии и продолжали перфузию сердца раствором, содержащим пептид еще 10 мин после снятия лигатуры с коронарной артерии. ПНУП-В в 2 раза уменьшает величину индекса РИ/ОР. Ингибирование NO-синтазы привело к исчезновению кардиопротекторного эффекта использованного пептида. В условиях селективной блокады митК_{АТФ}-каналов 5-гидроксидеканоатом (5-ГД) или после селективной блокады сарколеммальных К_{АТФ}-каналов (сарколеммальных К_{АТФ}-каналов) препаратом НМР1098 защитный эффект ПНУП-В не проявлялся [36]. Следовательно, кардиопротекторный эффект ПНУП-В связан с активацией NO-синтазы и обоих пулов К_{АТФ}-каналов. Не известно, принимает ли эндогенный предсердный натрийуретический пептид-В участие в ишемическом посткондиционировании или он только имитирует указанный феномен.

В настоящее время имеются данные о триггерной роли опиоидов, аденозина, брадикинина, CGRP, АФК в ишемическом посткондиционировании. Показано, что предсердный натрийуретический пептид В, урокортин, ацетилхолин могут имитировать феномен посткондиционирования.

Основываясь на сходстве эффектов прекодиционирования и посткондиционирования, исследователи предположили, что в механизме ишемического посткондиционирования задействованы те же самые сигнальные системы, что и в ишемическом прекодиционировании: Р13-киназа (Р13К), Akt-киназа (anti-apoptotic kinase), протеинкиназа С (ПКС), МАПК (митоген-активируемая протеинкиназа), ERK (extracellular signal regulated kinase), тирозинкиназа, р38-киназа (МАПК с молекулярным весом в 38 кДа), JNK (от c-Jun N-terminal kinase), митК_{АТФ}-каналы, МРТ-поры [18].

В 2004 г. исследователи показали, что ингибиторы Р13К вортманнин и LY294002 в опытах на изолированном перфузируемом сердце крысы полностью ингибируют кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования [37]. В 2005 г. в экспериментах на изолированном сердце кролика показано, что ингибитор Р13К вортманнин полностью устраняет инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования [21]. В опытах на изолированном сердце крысы показано, что вортманнин и LY294002 ингибируют кардиопротекторный эффект посткондиционирования [38].

В 2004 г. эксперименты на изолированном сердце кролика, показали, что блокада киназ MEK и ERK полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования [39]. Годом позже, в независимом исследовании, были получены данные, подтверждающие участие ERK в посткондиционировании [40]. В 2006 г. исследователи установили факт фосфорилирования ERK, но не смогли обнаружить кардиопротекторный эффект посткондиционирования, что можно расценивать как доказательство отсутствия причинной взаимосвязи между активацией ERK и повышением устойчивости сердца к патогенному действию реперфузии [41].

В 2006 г. были получены данные об участии ПКС в механизме ишемического посткондиционирования [42]. В опытах *in vivo* на крысах было показано, что неселективный ингибитор ПКС хелеритрин или селективный блокатор ПКСε KIE1-1 устраняют кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования. Селективный блокатор ПКСδ роттлерин у этих животных уменьшал соотношение РИ/ОР, но не влиял на инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования [42].

В литературе встречаются данные о том, что в посткондиционировании участвуют так называемые «киназы смерти» (death kinases), к ним относится р38-киназа и JNK [15]. По мнению авторов, активация этих киназ способствует гибели клеток во время ишемии-реперфузии [15]. Неспецифический активатор р38-киназы и JNK анизомицин устраняет защитный эффект ишемического посткондиционирования. На основании полученных данных авторы сделали вывод о том, что дефосфорилирование р38-киназы и JNK имеет прямое отношение к цитопротекторному эффекту посткондиционирования [43]. Эти данные были подтверждены тем же коллективом авторов в более поздней публикации [5].

Гуанилатциклаза является одним из ключевых ферментов сигнальной цепи ишемического посткондиционирования. Эксперименты на изолированном сердце кролика, показали, что блокада гуанилатциклазы препаратом ODQ приводит к исчезновению кардиопротекторного эффекта ишемического посткондиционирования [21].

Предполагают, что митохондриальные K_{ATP} -каналы являются одним из конечных звеньев в цепи сигнальных событий во время ишемического посткондиционирования [15, 44].

МРТ-пора (mitochondrial permeability transition pore) является гипотетическим конечным эффектором ишемического посткондиционирования [44, 45]. МРТ-пора находится в закрытом состоянии во время ишемии, её открытие во время реперфузии запускает апоптоз кардиомиоцитов [46]. Первые данные об участии названной поры в механизме посткондиционирования были получены в 2005 г. [47]. Исследователи установили, что ишемическое посткондиционирование блокирует открытие МРТ-поры, а селективный ингибитор МРТ-поры NIM811 имитирует инфаркт-лимитирующий эффект ишемического посткондиционирования [47].

В настоящее время показано существование функциональной взаимосвязи между гуанилатциклазой (ГЦ), протеинкиназой G (ПКГ), которые находятся в цитоплазме, и митохондриальной ПКСε (митПКСε), мит K_{ATP} -каналами и МРТ-порой, которые локализованы в митохондриях. В 2008 г. исследователи в опытах на изолированном сердце кролика показали, что фармакологическая активация ПКГ за 5 мин до начала реперфузии имитирует феномен ишемического посткондиционирования [48]. Установлено, что цГМФ и ПКГ передают сигнал к расположенным на внутренней мембране митохондрий K_{ATP} -каналам, что ведёт к открытию последних, генерации АФК, активации ПКС и, в конечном итоге, к повышению толерантности сердца к ишемии-реперфузии [49]. Оставалось неизвестным, что выступает в роли посредника между ПКГ и мит K_{ATP} -каналами. Исследователи полагают, что в роли такого посредника выступает митПКСε [50]. Авторы обнаружили в митохондриях ПКСε и установили, что активация мит K_{ATP} -каналов диазоксидами приводила к закрытию МРТ-поры. Антиоксидант МПГ и блокаторы ПКСε предотвращали данный эффект диазоксида.

Анализ представленных данных позволяет предполагать, что во время посткондиционирования выстраивается следующая цепочка событий: посткондиционирование → G-белок сопряженные рецепторы → Р13К → Akt → eNOS → NO → ГЦ → цГМФ → ПКГ → белок R1 → митПКСε1 → K_{ATP} -канал → АФК → митПКСε2 → МРТ-пора → супрессия апоптоза. Другой сигнальный путь, который включает: посткондиционирование → G-белок сопряженные рецепторы → белок Ras → MEK → ERK1/2 → супрессия апоптоза не представляется бесспорным и требует дополнительного изучения [51]. Выше мы отмечали сходство прекодиционирования и постконди-

ционирования. Всё же речь идёт о двух разных феноменах, механизм которых должен быть различен. Таких различий пока найдено немного. Так, установлено, что ишемическое прекодиционирование вызывает активацию p38 MAPK и JNK [51], в то время как ишемическое посткондиционирование сопровождается ингибированием названных киназ [5, 43]. Видимо, различия в сигнальном механизме пре- и посткондиционирования будут выявлены в будущих исследованиях.

Подводя итог вышесказанному, можно утверждать, что в ишемическом посткондиционировании сердца триггерную роль играют рецепторы аденозина, опиоидов, брадикинина, CGRP, а сигнальная система ишемического посткондиционирования включает в себя: Р13К, Akt eNOS, NO, ГЦ, ПКГ, митПКСε1, митПКСε2, мит K_{ATP} -канал, АФК, МРТ-пора или белок Ras, MEK, ERK1/2.

References

1. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang N.P., Guyton R.A. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285(2): H579-88.
2. Maslov L.N., Headrick J.P., Mechoulam R., Krylatov A.V., Lishmanov A.Iu., Barzakh E.I. et al. Role of receptor transactivation in the cardioprotective effects of preconditioning and postconditioning. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2012; 98(3): 305-17. (in Russian)
3. Cserepes B., Jancso G., Gasz B., R6cz B., Ferenc A., Benko L. et al. Cardioprotective action of urocortin in early pre- and postconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1095: 228-39.
4. Sun H.Y., Wang N.P., Kerendi F., Halkos M., Kin H., Guyton R.A. et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca^{2+} overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288(4): H1900-8.
5. Sun H.Y., Wang N.P., Halkos M., Kerendi F., Kin H., Guyton R.A. et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis.* 2006; 11(9): 1583-93.
6. Wang H.C., Zhang H.F., Guo W.Y., Su H., Zhang K.R., Li Q.X. et al. Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation. *Apoptosis.* 2006; 11(8): 1453-60.
7. Boengler K., Buechert A., Heinen Y., Roeskes C., Hilfiker-Kleiner D., Heusch G. et al. Cardioprotection by ischemic preconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ Res.* 2008; 102(1): 131-5.
8. Dow J., Bhandari A., Kloner R.A. Ischemic postconditioning's benefit on reperfusion ventricular arrhythmias is maintained in the senescent heart. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2008; 13(2): 141-8.
9. Halkos M.E., Kerendi F., Corvera J.S., Wang N.P., Kin H., Payne C.S. et al. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg.* 2004; 78(3): 961-9.

10. Iliodromitis E.K., Zoga A., Vrettou A., Andreadou I., Paraskevaidis I.A., Kaklamanis L. et al. The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits. *Atherosclerosis*. 2006; 188(2): 356-62.
11. Kin H., Zhao Z.Q., Sun H.Y., Wang N.P., Corvera J.S., Halkos M.E. et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2004; 62(1): 74-85.
12. Kin H., Wang N.P., Mykytenko J., Reeves J., Deneve J., Jiang R. et al. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor- κ B translocation and TNF release. *Shock*. 2008; 29(6): 761-8.
13. Gottlieb R.A. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res Cardiol*. 2003; 98: 242-9.
14. Mocanu M.M., Baxter G.F., Yellon D.M. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol*. 2000; 130(2): 197-200.
15. Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res*. 2006; 70(2): 200-11.
16. Fang J., Wu L., Chen L. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta Cardiol*. 2008; 63(3): 377-87.
17. Taki J., Higuchi T., Kawashima A., Fukuoka M., Kayano D., Tait J.F. et al. Effect of postconditioning on myocardial ^{99m}Tc -annexin-V uptake: comparison with ischemic preconditioning and caspase inhibitor treatment. *J Nucl Med*. 2007; 48(8): 1301-7.
18. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 2003; 83: 1113-51.
19. Jordan J.E., Zhao Z.Q., Sato H., Taft S., Vinten-Johansen J. Adenosine A_2 receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 280(1): 301-9.
20. Kin H., Zatta A.J., Lofye M.T., Amerson B.S., Halkos M.E., Kerendi F. et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res*. 2005b; 67(1): 124-33.
21. Yang X.M., Philipp S., Downey J.M., Cohen M.V. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol*. 2005; 100(1): 57-63.
22. Lu J., Zang W.J., Yu X.J., Jia B., Chorvatova A., Sun L. Effects of postconditioning of adenosine and acetylcholine on the ischemic isolated rat ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*. 2006; 549(1-3): 133-9.
23. Kin H., Zatta A.J., Jiang R., Reeves J.G., Mykytenko J., Sorescu G. et al. Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by postconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2005a; 38(5): 827.
24. Wang J., Gao Q., Shen J., Ye T.M., Xia Q. κ -Opioid receptor mediates the cardioprotective effect of ischemic postconditioning. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2007; 36(1): 41-7.
25. Zatta A.J., Kin H., Yoshishige D., Jiang R., Wang N., Reeves J.G. et al. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294(3): H1444-51.
26. Chang W.L., Lee S.S., Su M.J. Attenuation of post-ischemia reperfusion injury by thaliporphine and morphine in rat hearts. *J Biomed Sci*. 2005; 12(4): 611-9.
27. Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J. Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3 β . *Diabetes*. 2007a; 56(1): 127-36.
28. Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J. GSK3 β inhibition and K_{ATP} channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 2007b; 102(4): 341-9.
29. Chen Z., Li T., Zhang B. Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts. *J Surg Res*. 2008; 145(2): 287-94.
30. Jang Y., Xi J., Wang H., Mueller R.A., Mueller R.A., Norfleet E.A. et al. Postconditioning prevents reperfusion injury by activating δ -opioid receptors. *Anesthesiology*. 2008; 108(2): 243-50.
31. Penna C., Mancardi D., Rastaldo R., Losano G., Pagliaro P. Intermittent activation of bradykinin B_2 receptors and mitochondrial K_{ATP} channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res*. 2007; 75(1): 168-77.
32. Xi L., Das A., Zhao Z.Q., Merino V.F., Bader M., Kukreja R.C. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A_1 and bradykinin B_2 receptors gene knockout mice. *Circulation*. 2008; 118(14): S32-7.
33. Li D., Li N.S., Chen Q.Q., Guo R., Xu P.S., Deng H.W. et al. Calcitonin gene-related peptide-mediated cardioprotection of postconditioning in isolated rat hearts. *Regul Pept*. 2008; 147(1-3): 4-8.
34. Penna C., Rastaldo R., Mancardi D., Raimondo S., Cappello S., Gattullo D. et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol*. 2006; 101(2): 180-9.
35. Tsutsumi Y.M., Yokoyama T., Horikawa Y., Roth D.M., Patel H.H. Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: *in vivo* and *in vitro* characterization. *Life Sci*. 2007; 81(15): 1223-7.
36. Burley D.S., Baxter G.F. B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart. *Basic Res Cardiol*. 2007; 102(6): 529-1.
37. Tsang A., Hausenloy D.J., Mocanu M.M., Yellon D.M. Postconditioning: a form of «modified reperfusion» protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*. 2004; 95(3): 230-2.
38. Bopassa J.C., Ferrera R., Gateau-Roesch O., Couture-Lepetit E., Ovize M. PI3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*. 2006; 69(1): 178-85.
39. Yang X.M., Krieg T., Cui L., Downey J.M., Cohen M.V. NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 36(3): 411-21.
40. Darling C.E., Jiang R., Maynard M., Whittaker P., Vinten-Johansen J., Przyklenk K. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289(4): H1618-26.

41. Schwartz L.M., Lagranha C.J. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290(3): H1011-8.
42. Zatta A.J., Kin H., Lee G., Wang N., Jiang R., Lust R. et al. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signaling. *Cardiovasc Res.* 2006; 70(2): 315-24.
43. Zhao Z.Q., Sun H.Y., Wang N.P., Kin H., Guyton R.A., Vinten-Johansen J. Hypoxic postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition JNK and p38 kinases pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38 (5): 870.
44. Vinten-Johansen J., Zhao Z.Q., Zatta A.J., Kin H., Halkos M.E., Kerendi F. Postconditioning — a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2005; 100(4): 295-310.
45. Gateau-Roesch O., Argaud L., Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 2006; 70(2): 264-73.
46. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion — a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004; 61(3): 372-85.
47. Argaud L., Gateau-Roesch O., Raissy O., Loufouat J., Robert D., Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005; 111(2): 194-7.
48. Kuno A., Solenkova N.V., Solodushko V., Dost T., Liu Y., Yang X.M. et al. Infarct limitation by a protein kinase G activator at reperfusion in rabbit hearts is dependent on sensitizing the heart to A_{2b} agonists by protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(3): H1288-95.
49. Costa A.D., Garlid K.D., West I.C., Lincoln T.M., Downey J.M., Cohen M.V., et al. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res.* 2005; 97(4): 329-36.
50. Costa A.D., Jakob R., Costa C.L., Andrukhiv K., West I.C., Garlid K.D. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 2006; 281(30): 20801-8.
51. Hausenloy D.J., Yellon D.M. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2007; 116(2): 173-91.

Сведения об авторах:

Горбунов Александр Сергеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии Томский НИМЦ

© Коллектив авторов, 2017
УДК 575.133

Синёв В.В.¹, Карагодин В.П.², Собенин И.А.^{1,2}, Постнов А.Ю.¹, Сазонова М.А.^{1,2}, Орехов А.Н.^{2,3}

Мутационная нагрузка митохондриального генома в различных органах и тканях человека

¹ — ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121500, г. Москва, Россия, Черепковская 3-я ул., 15-а

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

³ — Научно-исследовательский институт атеросклероза Инновационный центр Сколково, 121609, Московская обл., Россия, Сколково, ул. Новая, д. 100

Представлен анализ данных литературы по исследованию уровня гетероплазмии митохондриального генома человека в различных органах (мышцы, печень, почки, мозг, сердце, легкие, волосы, тонкая и толстая кишка, селезенка) и тканях (буккальный эпителий, лейкоциты, эпителиальные клетки мочи). Показаны существенные различия в уровне мутационной нагрузки митохондриального генома между образцами таких органов и тканей. При этом наблюдалась определенная закономерность в распределении уровня гетероплазмии митохондриальных мутаций в данных образцах.

Ключевые слова: митохондриальный геном; мутация; уровень гетероплазмии; мутационная нагрузка; орган человека; ткань человека.

Для цитирования: Синёв В.В., Карагодин В.П., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Сазонова М.А., Орехов А.Н. Мутационная нагрузка митохондриального генома в различных органах и тканях человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 114–120.

Для корреспонденции: Синёв Василий Владимирович, мл. науч. сотр. лаб. медицинской генетики отдела сердечно-сосудистой патологии РКНПК Минздрава России, e-mail: centaureaceanus@mail.ru

Финансирование. Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 14-14-01038.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.11.2016

Sinyov V.V.¹, Karagodin V.P.², Sobenin I.A.^{1,2}, Postnov A.Yu.¹, Sazonova M.A.^{1,2}, Orekhov A.N.^{2,3}

Mutational burden of mitochondrial genome in different organs and tissues in human

¹ — FSBI «Russian Cardiology Research and Production Complex», Moscow, Russian Federation, 121552, Moscow, Cherepkovskaya 3rd street, 15-a

² — FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8

³ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 121609, Moscow Region, Skolkovo, Novaya street, 100

In the present article the literature data on studies of the heteroplasmy level of human mitochondrial genome in different organs (muscles, liver, kidneys, brain, heart, lungs, hair, small and large bowel, spleen) and tissues (buccal, leukocytes, ruinous epithelial cells) are analyzed. The difference in mutational burden levels of mitochondrial genome between samples of such organs and tissues is shown. Meanwhile, certain regularity was observed in heteroplasmy level distribution of mitochondrial mutations in these samples.

Keywords: mitochondrial genome; mutation; heteroplasmy level; mutational burden; human organ; human tissue.

For citation: Sinyov V.V., Karagodin V.P., Sobenin I.A., Postnov A. Yu., Sazonova M.A., Orekhov A.N. Mutational burden of mitochondrial genome in different organs and tissues in human. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61(1): 114–120. (in Russ.).

For correspondence: Vasiliy V. Sinyov, Junior Research Scientist, Laboratory of Medical Genetics, Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russian Federation, 121552, Moscow, Cherepkovskaya 3rd street, 15-a, e-mail: centaureaceanus@mail.ru

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

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (Grant # 14-14-01038).

Information about authors:Sinyov V.V., <http://orcid.org/0000-0001-5105-5763>Karagodin V.P., <http://orcid.org/0000-0003-0501-8499>Sobenin I.A., <http://orcid.org/0000-0003-0978-6444>Postnov A.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-2501-7269>Sazonova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-7382-7197>Orekhov A.N., <http://orcid.org/0000-0002-6495-1628>

Received 03.11.2016

Введение

В клетках различных органов и тканей человека содержится различное количество митохондрий, а в данных органеллах — различное количество копий митохондриального генома, присущее определенному типу ткани или органу. Если все копии мтДНК оказываются идентичными, то говорят о гомоплазии митохондриального генома в исследуемых клетках или тканях. Вследствие не очень совершенной работы митохондриальной ДНК-полимеразы и репаративных систем мутации в мтДНК возникают намного чаще, чем в ядерной ДНК. В результате деления клеток, а, следовательно, и митохондрий, мутантная мтДНК попадает в другие клетки, где ее количество, посредством репликации, увеличивается в арифметической прогрессии. Этот процесс распространения мтДНК называют репликативной сегрегацией. Уровень гетероплазии (доля мутантной мтДНК) во время данного процесса может существенно меняться [1]. Таким образом, митохондриальная гетероплазия — это сосуществование в ткани или клетке альтернативных вариантов последовательности митохондриальной ДНК, т.е. одновременное присутствие в митохондриях нормальных и мутантных молекул ДНК [2].

Объяснением возникновению гетероплазии может быть появление морфологических и химических различий между клетками организма, в период эмбрионального развития человека в процессе детерминации клеток и тканей. В результате деления клеток митохондрии распределяются между ними случайно, что обуславливает их различие в соотношении нормальных и мутантных молекул митохондриальной ДНК. Более того, процент гетероплазии заметно варьирует в различных тканях одного и того же организма. Совокупность копий митохондриального генома, имеющих различные мутации, определяет фенотип индивида.

Выявление молекулярно-генетических механизмов возникновения и развития различных патологий является приоритетной задачей медико-биологического направления фундаментальной медицины [3—5]. Основные звенья патогенеза заболеваний до настоя-

щего времени изучены недостаточно. Однако именно они, как полагают, зачастую приводят к необратимым изменениям тканей и органов [6—13].

Согласно данным литературы, мутации митохондриального генома ассоциированы с рядом заболеваний, в том числе, сердечно-сосудистых [14—19]. В основе их развития лежит атеросклероз, поэтому большое значение приобретает ранняя диагностика и семейный анализ атеросклероза, в том числе с помощью методов молекулярной генетики [20, 21]. Полагают, что возможной причиной атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека [3, 6, 7, 19, 22].

В настоящей обзорной статье предпринята попытка проанализировать сведения, почерпнутые из экспериментальных статей ученых всего мира, посвященных анализу митохондриальных мутаций в различных органах и тканях человека.

Вариабельность мутаций мтДНК в различных типах тканей

Согласно данным литературы, однонуклеотидные полиморфизмы митохондриального генома распределены в тканях и органах неравномерно. Например, соотношение уровня гетероплазии, между лейкоцитами и буккальным эпителием, по одним данным, отличается в 4 раза [23], а по другим — в 1,5 раза [24]. Это может быть обусловлено как популяционными различиями, так и недостаточной статистической значимостью, на что указывают сами авторы данных работ. Однако и в первом, и во втором исследовании уровень гетероплазии в буккальном эпителии был выше аналогичного уровня в клетках лейкоцитов.

В частности, DeLaat P. с сотрудниками, проанализировав точечную мутацию m.3243A>G мтДНК в выборке из 127 чел. обнаружил, что уровень гетероплазии данных мутаций наиболее высок в мышцах и печени (79% и 69% соответственно), немного меньше — в мозге, волосах и сердце (от 36,7% до 30,2%). Более низкий уровень гетероплазии на-

блюдался в костной ткани, крови, легких и буккальном эпителии (19,8—16,2%). Накопление мутантных копий митохондриального генома было обнаружено в мышцах (в позициях 64, 72, 73, 189 и 408), печени (в позиции 72) и мозге (делеция в позиции 71) [25]. При этом возраст участников исследования составлял от 2 мес до 80 лет. Из них 42 человека были мужского пола, а 85 — женского.

Аналогично с предыдущими авторами, учеными из Великобритании было показано, что самый высокий уровень гетероплазмы мутации митохондриального генома m.3243A>G наблюдался в скелетных мышцах, был немного ниже в волосяных фолликулах, еще ниже — в буккальном эпителии, и самым низким — в клетках крови (n=5). Корреляции между мутационной нагрузкой с полом (три женщины и двое мужчин) и возрастом (от 26 до 56 лет) обнаружено не было [26].

Группа исследователей из Кореи анализировала уровень гетероплазмы второго гипервариабельного сегмента (ГВС2) митохондриального генома в клетках крови, мозга, сердца, печени, скелетных мышц и волосяных фолликулов, которые были собраны во время вскрытий 25 умерших, возраст которых варьировал от 5 до 75 лет. Половой состав исследуемой выборки не определялся. Гетероплазмия в клетках крови была обнаружена у 15 из 25 человек (60%). Кроме того, гетероплазмия была обнаружена в тканях мозга, сердца, печени и скелетных мышцах данных людей. У 13 из 15 индивидов была обнаружена гетероплазмия ГВС2 в клетках волосяных фолликулов. Статистически значимых отличий уровня гетероплазмы у индивидов, в зависимости от возраста, обнаружено не было [27].

Датские ученые, проанализировав мутацию m.3243A>G у 65 человек (26 мужчин и 39 женщин) из 9 семей, определили мутационную нагрузку (% мутированных мтДНК) в различных тканях. Возрастной состав членов выборки варьировал от 7 до 74 лет. Следует отметить, что мутационную нагрузку измеряли в различных типах клеток из трех эмбрионных зародышевых листков — лейкоцитах крови, буккальном эпителии, клетках скелетных мышц и эпителиальных клетках мочи. Согласно результатам данного исследования, выявлена статистически значимая корреляция мутационной нагрузки со всеми указанными выше видами тканей ($R = 0,80—0,89$, $p < 0,0001$). По отношению к клеткам крови, выступающим в качестве контроля, мутационная нагрузка в буккальном эпителии увеличилась на 16%, в эпителиальных клетках мочи — на 31%, а в мышцах на 37%. Отмечены значимые различия в мутационной нагрузке митохондриального генома между лейкоцитами крови, буккальным эпителием и эпителиальными

клетками мочи, но не было существенной разницы по данному параметру между мышцами и эпителиальными клетками мочи. Была выявлена отрицательная корреляция между кровью, буккальным эпителием, эпителиальными клетками мочи и возрастом. Статистически значимой корреляции между клетками скелетных мышц и возрастом выявлено не было. Различия по мутационной нагрузке между выборками мужчин и женщин отсутствовали [28].

Немецкие ученые проанализировали полный митохондриальный геном 12 образцов различных тканей, полученных при аутопсии у каждого из 152 индивидов, возраст которых на момент смерти варьировал от 3 сут. до 96 лет. Исследователи не акцентировали внимание на половом составе данной выборки. Был определен уровень гетероплазмы мутаций, локализованных в 393 позициях митохондриального генома. Уровень гетероплазмы некоторых мутаций оказался ассоциирован с определенными видами тканей, показывая именно в них высокие значения. Уровень гетероплазмы мутаций митохондриального генома имел высокую корреляцию с возрастом [29].

Исследователи из США изучили дефекты митохондриальной ДНК 10 видов тканей (почек, легких, печени, тонкой кишки, толстой кишки, скелетных мышц, селезенки, белого вещества мозга, кожи выше пояса и кожи ниже пояса), полученных в 2 аутопсиях лиц, не имевших онкологических заболеваний. Определение ассоциации мутаций мтДНК с полом и возрастом не проводилось. Оба индивида умерли от инфаркта миокарда. Было выявлено 20 мутаций с уровнем гетероплазмы более 1%. В 3 из 10 видов ткани (печень, почки и скелетные мышцы) обнаружены несколько митохондриальных мутаций, которые были общими для данных людей. Мутации митохондриального генома m.60T>C и m.72T>C выявлены в печени и почках обоих индивидов. В то же время однонуклеотидные замены m.94G>A и m.203G>A были обнаружены в печени и/или почках данных людей. Следует подчеркнуть, что мутации m.60T>C, m.72T>C и m.94G>A часто происходят в печени и почках людей. Еще 3 мутации в позициях 64, 189 и 408 были выявлены в скелетных мышцах. Мутация в позиции 67 была найдена только в скелетных мышцах. Уровень гетероплазмы данных мутаций, часто возникающих в печени, почках и скелетных мышцах, варьировал от 1% до 21%. Однако эти однонуклеотидные замены не были обнаружены в других видах тканей. Обращает на себя внимание, что в одних и тех же тканях разных индивидов значения уровня гетероплазмы мутаций были близки [30].

Группа ученых из Германии взяла в качестве материала для исследований клетки периферической крови, буккального эпителия и волосяных фолликулов

30-летней монозиготной тройни. Был изучен уровень гетероплазмы мутаций в гомополимерном участке, состоящем из повторов цитозина в регионе ГВС2. В клетках крови и буккального эпителия выявлено накопление молекул мутантной мтДНК с одной и двумя вставками повторов цитозина, по сравнению с референсной кембриджской последовательностью (CRS). При этом не было никаких статистически значимых различий в уровне гетероплазмы мутаций между клетками крови и буккального эпителия одного и того же индивида, а также между 3 монозиготными братьями. В клетках волосяных фолликулов было обнаружено уменьшение количества повторов цитозина, по сравнению с клетками крови и буккального эпителия, у всех троих однояйцовых близнецов [31].

Американские исследователи проанализировали образцы волос у 128 человек, из которых было 59 мужчин и 69 женщин. Возраст индивидов варьировал от 18 до 88 лет. Из 1589 образцов волос 1478 (93%) имели одну или несколько гомоплазмичных мутаций, а 111 (7%) — одну или несколько гетероплазмичных мутаций. 71% (82/116) участников исследования имели гомоплазмичные, а 29% (34/116) — гетероплазмичные мутации, по крайней мере, в одном образце волос. При этом гетероплазмия митохондриального генома в образцах волос составляла от 0 до 90% и ее уровень не зависел от принадлежности к определенной популяционной группе, косметического лечения, возраста, пола, и от того, взяты ли волосы у живого или мертвого человека [32].

Ученые из Эстонии исследовали 16 различных типов ткани у 3 мужчин, возраст которых составлял от 40 до 54 лет. Они обнаружили, что уровень гетероплазмы мутаций митохондриального генома в некоторых типах тканей может быть на очень низком уровне либо вовсе отсутствовать, в то время как в других типах тканей он достаточно высок. Например, уровень гетероплазмы мутации некодирующего региона $m.16093T>C$ варьировал, составляя 5—8% в костном мозге, в аорте — 31—60%, а в мочевом пузыре достигал 62%. Авторы полагают, что это может объясняться возникновением соматических митохондриальных мутаций в онтогенезе человека [33].

Ученые из США провели исследования одной из самых мутабельных областей митохондриального генома человека — ГВС2, с использованием сиквенс-специфических олигонуклеотидных зондов (SSO) у 43 индивидов (34 мужчин и 9 женщин). Возраст участников исследования был от 11 до 85 лет. Были проанализированы ткани мышцы, сердца, мозга и клетки крови. Уровень гетероплазмы ГВС2 отличался в разных типах тканей, будучи выше в мышечной ткани, что подтверждает результаты других исследований. Авторы отмечают, что с возра-

стом у людей уровень гетероплазмы ГВС2 повышается [34].

Исследователи из Китая проанализировали в своей обзорной статье мутационную нагрузку в различных типах клеток, а именно в гранулоцитах, В-лимфоцитах, Т-лимфоцитах и $CD34^+$ клетках. Ими было установлено, что гранулоциты имеют более высокую внутриклеточную гетерогенность по сравнению с В-лимфоцитами, Т-лимфоцитами и $CD34^+$ клетками. Авторы полагают, что гранулоциты имеют более высокий уровень активных форм кислорода, связанный с их функционированием. Последовательная оценка мутаций мтДНК в популяции одиночных $CD34^+$ клеток, полученных от одного и того же донора в течение определенного времени, свидетельствует о стабильности некоторых соматических мутаций (замена в позициях 227, 309, 541, 16221 и 16272) [35].

Вариабельность мутаций мтДНК в различных типах тканей от здоровых лиц и пациентов с различными заболеваниями

Ряд авторов изучали не только распределение гетероплазмы мутаций митохондриального генома в различных тканях, но сопоставляли полученные данные о мутационной нагрузке с различными заболеваниями человека.

Первая работа на эту тему была опубликована в 1994 г., когда группа британских ученых выявила различия в уровне гетероплазмы мутации $m.3243A>G$ между различными типами тканей у женщины с кардиомиопатией и молочнокислым ацидозом. Более высокий процент гетероплазмы был обнаружен в сердце (49%), скелетных мышцах (56%) и печени (55%), чем, например, в почках (3%). Кроме того, авторы сравнили вариабельность данной митохондриальной мутации у взрослого человека и эмбриона. Результаты исследования показали, отсутствие значимых отличий по уровню гетероплазмы мутации $m.3243A>G$ в различных типах тканей эмбриона. В то же время подобные отличия наблюдались у взрослого человека. Это, по мнению исследователей, может свидетельствовать о неравномерном распределении митохондриальной ДНК между различными тканями в процессе онтогенеза человека [36].

В 1997 г. американские ученые исследовали финскую семью, члены которой имели ряд заболеваний, ассоциированных с митохондриальной дисфункцией. В их работе был определен уровень гетероплазмы мутации $m.3243A>G$ в образцах цельной крови, буккального эпителия и волосяных фолликулов 3 пациентов. Первый пациент, женщина 48 лет, имела инсулиннезависимый сахарный диабет, нейросенсорную

тугоухость и дистрофию пигментного эпителия сетчатки. Второй пациент, мужчина 47 лет, который являлся братом данной женщины, имел инсулиннезависимый сахарный диабет, нейросенсорную тугоухость, но у него отсутствовала дистрофия пигментного эпителия сетчатки. Третий пациент, мужчина 28 лет, являвшийся сыном первой пациентки, не имел вышеупомянутых заболеваний. Распределение уровня гетероплазмы мутации $m.3243A>G$ у троих пациентов в образцах было следующим:

- пациент 1: цельная кровь — 8%, волосяные фолликулы — 6%, буккальный эпителий — 18%;
- пациент 2: цельная кровь — 12%, волосяные фолликулы — 33%, буккальный эпителий — 30%;
- пациент 3: цельная кровь — 23%, волосяные фолликулы — 15%, буккальный эпителий — 16%.

На основании полученных результатов авторы статьи пришли к следующим выводам: тяжесть симптомов заболевания (суммарное наличие или отсутствие установленных заболеваний), по-видимому, не коррелирует со средней степенью гетероплазмы мутационной нагрузки в 3 изученных тканях; исследование подтвердило, что гетероплазмия мтДНК передается по материнской линии [37].

Как показали исследователи из Тайваня, буккальный эпителий и клетки крови часто используются в качестве эталонных образцов при анализе ДНК. Основной целью данной работы было сравнение уровня дефектов митохондриальной ДНК буккального эпителия у лиц, регулярно жевавших бетель и здоровых людей, никогда его не жевавших. Изучены первый и второй гипервариабельные сегменты контрольного региона D-петли митохондриального генома в парных образцах крови и клеток буккального эпителия в трех группах:

- 1) 75 доноров, которые никогда не жевали бетель (контрольная группа). Возраст участников исследования составлял от 21 до 66 лет;
- 2) 60 доноров, жевавших бетель, возраст которых был от 18 до 62 лет;
- 3) 67 пациентов с бетелевым раком. Их возраст составлял от 21 до 80 лет.

Информация о половом составе групп в статье отсутствовала.

Среди этих 3 групп дефекты митохондриальной ДНК обнаружены у 61% (41 из 67) онкобольных. В группе доноров, жевавших бетель, 10% (6 из 60) митохондриальных хромосом имели мутации. В то же время в группе доноров, которые никогда бетель не жевали, дефекты митохондриального генома имелись только у 1,3% (1 из 75) индивидов. Значимой корреляции между возрастом и мутационной нагрузкой выявлено не было [38].

Группа исследователей из Британии обнаружила, что при тяжелом сепсисе в лейкоцитах периферической крови больных (5 мужчин и 6 женщин от 18 до 60 лет), имевших мутацию $m.3243A>G$, снижалось общее количество копий мтДНК. Аналогичное уменьшение копий митохондриального генома было замечено и при других митохондриальных цитопатиях, а также в клеточных линиях (гибридах NT2 тератокарциномы) с мутацией $m.3243A>G$. Ученые предположили, что одной из причин уменьшения количества копий мтДНК при тяжелом сепсисе может быть увеличение в крови количества нейтрофилов, в которых количество копий митохондриального генома в 3 раза меньше, чем в лейкоцитах. Однако при анализе отдельных моноцитов или лимфоцитов также выявлено снижение копий мтДНК, по сравнению с аналогичными отдельными клетками здоровых доноров. В данном исследовании не определялась зависимость мутации $m.3243A>G$ от пола и возраста [39].

Интересные результаты в своей работе получили отечественные ученые. Они сравнили мутационную нагрузку митохондриального генома в клетках крови и буккальном эпителии у 20 пациентов с митохондриальной энцефаломиопатией. Было установлено, что менее половины выявленных вариантов мтДНК встречались в обеих исследованных тканях. В образцах буккального эпителия пациентов была обнаружена мутация $m.3010G>A$, ассоциированная с синдромом циклической рвоты, которая в клетках крови пациентов выявлена не была. В то же время мутации $m.12308A>G$, характерная для СРЕО (хронической прогрессирующей наружной офтальмоплегии, инсульта, кардиомиопатии) и $m.4216 T>C$, встречающаяся при LHON и инсулинорезистентности, были детектированы как в буккальном эпителии, так и в крови пациентов. Авторы полагают, что межтканевые различия выявленных генных вариантов, возможно, связаны с особенностями проявления энергетического дисбаланса. Данные о возрасте и поле пациентов в данной работе не представлены [40].

Заключение

Согласно данным литературы, в различных органах и тканях одного и того же условно здорового человека уровень гетероплазмы мутаций митохондриального генома может существенно различаться. При этом в клетках крови человека уровень гетероплазмы митохондриальных мутаций оказался значительно ниже, по сравнению с другими типами клеток. Наибольший уровень гетероплазмы мутаций мтДНК наблюдался в мышцах, несколько меньший, но также достаточно высокий — в клетках буккального эпителия.

При сравнении выборок индивидов, имевших различные заболевания, и здоровых людей были выявлены статистически значимые отличия в уровне гетероплазмии мутаций митохондриального генома между определенными тканями и органами.

В отдельных источниках литературы отмечается зависимость мутационной нагрузки в исследованных образцах от пола и возраста доноров.

References

- Ginter E.K. *Medical genetics. [Meditsinskaya genetika]*. Moscow: Meditsina; 2003. (in Russian)
- Wallace D.C., Brown M.D., Lott M.T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 1999; 238(1): 211-30.
- Consigny P.M. Pathogenesis of atherosclerosis. *AJR Am J Roentgenol*. 1995; 164(3): 553-8.
- Temchenko A.V., Nikiforov N.G., Orekhova V.A., et al. Achievements in therapy of atherosclerosis. *Pathogenesis*. 2013; 11(2): 11-8.
- Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Dendritic cells in atherosclerosis: identification and pathophysiological significance. *Pathogenesis*. 2013; 11(1): 9-17.
- Incalcaterra E, Hoffmann E, Averna M.R., Caimi G. Genetic risk factors in myocardial infarction at young age. *Minerva Cardioangiol*. 2004; 52(4): 287-312.
- Ivashchenko T.E., Strelakov D.L., Soloviev D.V., et al. Testing genetic predisposition to multifactorial diseases and genetic passport. *Molekulayarno-biologicheskie tekhnologii v meditsinskoj praktike*. 2004; (5): 9-28. (in Russian)
- Miasoedova V.A., Kirichenko T.V., Orekhova V.A., et al. Study of intima-medial thickness (IMT) of the carotid arteries as an indicator of natural atherosclerosis progress in Moscow population. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; (3): 104-8. (in Russian)
- Ivanova M.M., Borodachev E.N., Sazonova M.A. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; (3): 115-22. (in Russian)
- Titov V.N. Statin-induced inhibition of cholesterol synthesis in liver and very low density lipoproteins. Statins, fatty acids and insulin resistance. *Pathogenesis*. 2013; 11(1): 18-26.
- Sobenin I.A., Karagodin V.P., Mel'nichenko A.A., Orekhov A.N. Cholesterol of circulating immune complexes as biomarker of atherosclerosis. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; (3): 99-103. (in Russian)
- Sobenin I.A., Korneev N.V., Romanov I.V., Orekhov A.N. Lowering of blood serum atherogenicity as a method of sanogenic prevention of atherosclerosis. *Patogenez*. 2008; 6(1): 33-41. (in Russian)
- Shoibonov B.B., Baronets V.Y., Ontoboev A.N., Panchenko L.F. Inhibition of the classical pathway of complement activation by blocking C1q with gipoxenum. *Pathogenesis*. 2013; 11(2): 51-7.
- Sazonova M.A., Budnikov E.Y., Khasanova Z.B., et al. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. *Atherosclerosis*. 2009; 204(1): 184-90.
- Ivanova M.M., Sazonova M.A., Orekhov A.N., Sobenin I.A. *Some mutations of human mitochondrial genome, associated with cytopathies*. *www.medline.ru*. 2012; 13(26): 309-30. (in Russian).
- Mazunin I.O., Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Sukernik R.I. Mitochondrial genome and human mitochondrial diseases. *Molekularnaya biologiya*. 2010; 44(5): 755-72. (in Russian)
- Sazonova M.A., Nurbaev S.D., Chicheva M.M., et al. Detection of mitochondrial mutations in genes of cytochromes B and C in lipofibrous plaques in intima of human aortas. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; (4): 62-5. (in Russian)
- Zhelankin A.V., Sazonova M.A. Association of the mutations in the human mitochondrial genome with chronic non-inflammatory diseases: type 2 diabetes, hypertension and different types of cardiomyopathy. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; (3): 123-8. (in Russian)
- Mitrofanov K.I., Sazonova M.A. Association of point mutations in human nuclear and mitochondrial genome with coronary artery disease. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; (2): 51-5. (in Russian)
- Sazonova M.A., Postnov A.I., Orekhov A.N., Sobenin I.A. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011; (4): 81-4. (in Russian)
- Chernova E.V., Sobenin I.A., Melnichenko A.A., Karagodin A.P., Orekhov A.N. Serum atherogenicity as a pathogenetic target for direct anti-atherosclerotic therapy. *Pathogenesis*. 2013; 11(2): 28-41.
- Sinyov V.V., Malyar N.L., Kosogorova S.A., et al. Mitochondrial genome variability in different types of human blood cells. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2013; 12(19): 58-61. (in Russian)
- Naue J., Horer S., Sanger T., et al. Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA. *Mitochondrion*. 2015; 20: 82-94.
- Chinnery P.F., Zwijnenburg P.J., Walker M., et al. Nonrandom tissue distribution of mutant mtDNA. *Am J Med Genet*. 1999; 85(5): 498-501.
- De Laat P., Koene S., van den Heuvel L.P., Rodenburg R.J., Janssen M.C., Smeitink J.A. Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35(6): 1059-69.
- Spyropoulos A., Manford M., Horvath R., et al. Near-identical segregation of mtDNA heteroplasmy in blood, muscle, urinary epithelium, and hair follicles in twins with optic atrophy, ptosis, and intractable epilepsy. *JAMA Neurol*. 2013; 70(12): 1552-5.
- Lee H.Y., Chung U., Park M.J., Yoo J-E., Han G-R., Shin K-J. Differential distribution of human mitochondrial DNA in somatic tissues and hairs. *Ann Hum Genet*. 2006; 70(1): 59-65.
- Frederiksen A.L., Andersen P.H., Kyvik K.O., Jeppesen T.D., Vissing J., Schwartz M. Tissue specific distribution of the 3243A->G mtDNA mutation. *J Med Genet*. 2006; 43(8): 671-7.
- Li M., Schroder R., Ni S., Madea B., Stoneking M. Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(8): 2491-6.
- Samuels D.C., Li C., Li B., et al. Recurrent tissue-specific mtDNA mutations are common in humans. *PLoS Genet*. 2013; 9(11): e1003929.
- Pfeiffer H., Lutz-Bonengel S., Pollak S., Fimmers R., Baur M.P., Brinkmann B. Mitochondrial DNA control regi-

on diversity in hairs and body fluids of monozygotic triplets. *Int J Legal Med.* 2004; 118(2): 71-4.

32. Roberts K.A., Calloway C. Characterization of Mitochondrial DNA Sequence Heteroplasmy in Blood Tissue and Hair as a Function of Hair Morphology. *J Forensic Sci.* 2011;56(1):46-60.

33. Křtjtskov K., Kolt ina M., Grand K., et al. Tissue-specific mitochondrial heteroplasmy at position 16,093 within the same individual. *Curr Genet.* 2014; 60(1): 11-6.

34. Calloway C.D., Reynolds R.L., Herrin G.L., Anderson W.W. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(4): 1384-97.

35. Yao Y.-G., Kajigaya S., Young N.S. Mitochondrial DNA mutations in single human blood cells. *Mutation Research.* 2015; 779: 68-77.

36. Matthews P.M., Hopkin J., Brown R.M., Stephenson J.B., Hilton-Jones D., Brown G.K. Comparison of the relative levels of the 3243 (A→G) mtDNA mutation in he-

teroplasmic adult and fetal tissues. *J Med Genet.* 1994; 31(1): 41-4.

37. Harrison T.J., Boles R.G., Johnson D.R., LeBlond C., Wong L.J. Macular pattern retinal dystrophy, adult-onset diabetes, and deafness: a family study of A3243G mitochondrial heteroplasmy. *Am J Ophthalmol.* 1997; 124(2): 217-21.

38. Pai C.-Y., Hsieh L.-L., Lee T.-C., et al. Mitochondrial DNA sequence alterations observed between blood and buccal cells within the same individuals having betel quid (BQ)-chewing habit. *Forensic Sci Int.* 2006; 156(2-3): 124-30.

39. Pyle A., Taylor R.W., Durham S.E., et al. Depletion of mitochondrial DNA in leucocytes harbouring the 3243A→G mtDNA mutation. *J Med Genet.* 2007; 44(1): 69-74.

40. Litvinova N.A., Voronkova A.S., Nikolaeva E.A., Sukhorukov V.S. Tissue-specific features of mitochondrial DNA polymorphisms. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii.* 2015; 5: 76-8. (in Russian)

Сведения об авторах:

Карагодин Василий Петрович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ ОПП РАН

Собенин Игорь Александрович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. медицинской генетики РКНПК МЗ РФ

Постнов Антон Ювенальевич, доктор мед. наук, зав. отделением сердечно-сосудистой патологии РКНПК МЗ РФ

Сафонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. медицинской генетики РКНПК МЗ РФ

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. ангиопатологии НИИОПП РАН

УДК 616-092

Кубышкин А.В.¹, Фомочкина И.И.¹, Кононенко Н.Н.²

Патофизиология и фармация: пути интеграции (Информация о VII Конгрессе патофизиологов Украины с международным участием)

¹ — Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь

² — Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Для корреспонденции: Кубышкин Анатолий Владимирович, e-mail: Kubyshkin_av@mail.ru

Поступила 15.11.2016

Kubyshkin A.V., Fomochkina I.I., Kononenko N.M.

Pathophysiology and Pharmacy. Ways of integration (VII Congress of the pathophysiologicalists of Ukraine)

Received 15.11.2016

5—7 октября 2016 г. в г. Харькове состоялся VII Конгресс патофизиологов Украины с международным участием. Конгресс собрал более 200 делегатов и участников — представителей различных специальностей: патофизиологов, молекулярных биологов, биохимиков, физиологов, анестезиологов-реаниматологов, клинических фармакологов и фармацевтов, которые в ходе научной и дискуссионной программы Конгресса приняли участие в обсуждении 10 пленарных докладов, 80 устных и стендовых докладов, 2 воркшопов и 6 научных симпозиумах.

Актуальные проблемы патофизиологии традиционно являлись предметом обсуждения на Конгрессах Научного общества патофизиологов Украины, которое в настоящее время насчитывает около 300 ученых.

Основная цель состоявшегося Конгресса «Патофизиология и фармация: пути интеграции» — подведение итогов, анализ, обсуждение и определение перспектив, стратегии, векторов дальнейшего развития патофизиологии и как науки, и как учебной дисциплины. Среди тем, которые поднимались на Конгрессе, наиболее обсуждаемыми стали молекулярно-генетические механизмы развития и профилактики заболеваний, патофизиология сердечно-сосудистой, нервной эндокринной и репродуктивной систем, экстремальных состояний и стресса. Особый интерес вызвали сообщения, посвященные фундаментальным и прикладным аспектам воспаления, иммунопатологии и патофизиологии опухолевого роста.

VII Конгресс прошел под девизом интеграции патофизиологической и фармацевтической наук. Создание лекарственных препаратов основывается на результатах патофизиологических исследований, фактически только раскрытие и понимание механизмов развития патологии позволяет определить пути и подходы к разработке лекарственных средств направленного действия. Поэтому уникальной особенностью нынешнего научного форума стало введение в его программу научной тематики фармацевтической отрасли. Внимание ученых было привлечено к симпозиумам, на которых обсуждались вопросы, объединяющие патофизиологию и современную фармацевтику, а также актуальные проблемы фармакологии, фармакогеномики и фармакогенетики. Развитие фармации, направленное прежде всего на создание новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов, в настоящее время невозможно без тесного сотрудничества с фармакологами и патофизиологами. Все докладчики были единодушны в том, что взаимодействие между патофизиологом и фармацевтом на этапах создания препаратов и доклинических испытаний — это краеугольный камень успеха. Благодаря такой кооперации на современный фармацевтический рынок выходят новые лекарственные препараты, необходимые для лечения социально значимых болезней. Вместе с фармацевтическим направлением все больше развивается как интегративная наука — клиническая патофизиология, изучающая изменения функционирования целостного организма при формировании патологических процессов.

Слова поздравления и пожелания конструктивной работы делегатам и участникам Конгресса прозвучали от ректора Национального фармацевтического университета, академика НАН Украины, профессора В.П. Черных, который отметил, что проведение Конгресса патофизиологов в стенах Национального фармацевтического университета — хорошая возможность совместить мощный потенциал медицины: патофизиологии и фармации.

В приветственном слове председатель оргкомитета Конгресса, академик НАМН А.Г. Резников отметил важность его проведения для экспериментальной, клинической медицины и фармации. Пленарная лекция А.Г. Резникова, посвященная фундаментальным проблемам патофизиологии эндокринной системы и эпигенетическим механизмам программирования врожденной патологии, вызвала оживленную дискуссию. Особое внимание А.Г. Резников уделил новому направлению медицины — превентивной нейроэндокринологии и теории гормон нейротрансмиссионного импринтинга мозга, получившей международное признание. Эти исследования открывают широкие перспективы в плане разработки нового поколения лекарственных препаратов.

В пленарной лекции профессора В.Е. Досенко были представлены материалы, обосновывающие роль нейтрофильных экстрацеллюлярных ловушек в патогенезе ишемического повреждения сердца. Особо подчеркивалось, что применение ингибиторов протеасомного протеолиза предупреждает гибель культивируемых кардиомиоцитов, снижая уровень некроза в культуре. Эти данные могут быть использованы не только в теоретическом аспекте, но и в плане поиска новых направлений защиты миокарда в условиях его ишемии.

Лекция профессора Ю.М. Колесника была посвящена структурно-функциональным и молекулярно-генетическим аспектам ремоделирования миокарда при артериальной гипертензии и сахарном диабете, а также роли дисбаланса между содержанием коллагена и тайтина в формировании патологической гипертрофии и прогрессировании фиброза. Результаты исследований показали, что эти процессы происходят на фоне выраженного энергодефицита кардиомиоцитов, возникающего в результате системной митохондриальной дисфункции, а также снижения экспрессии конститутивных изоформ в системе монооксида азота.

С современным взглядом на теорию болезни познакомил присутствующих профессор А.И. Гоженко. Он представил теоретическое обоснование возникновения и развития экологически и профессионально обусловленной патологии, предложив новую парадигму профилактической медицины. На основе общих положений теории болезни было обосновано прин-

ципально новое направление технологии лечения — внешне программируемое биоруководство организмом, которое базируется на изменении генетически обусловленной программы развития болезни.

Пленарный доклад профессора А.В. Кубышкина был посвящен патогенетическому обоснованию взаимосвязей при формировании основных синдромов критических состояний. На большом объеме экспериментального и клинического материала с использованием разных моделей и клинических состояний были показаны взаимосвязи развития синдрома системной воспалительной реакции, полиорганной недостаточности и нарушений гемостаза на молекулярном уровне. Сформулирована концепция нового подхода к классификации критических состояний и соответственно подходов к совершенствованию лечения больных в критических состояниях.

VII Конгресс патофизиологов продолжался 3 дня, в течение которых прозвучали доклады как корифеев патофизиологии — профессоров Сагача В.Ф., Атамана А.С., Клименко Н.А. и др., так и молодых ученых, только начинающих свой путь к покорению научного Олимпа. Наряду с научными секциями, состоялся мастер-класс, посвященный проблемам современного преподавания патофизиологии: опытом внедрения online программ поделились представители флагманских ВУЗов — Киева и Харькова. По завершении мастер-класса между участниками Конгресса развернулась оживленная дискуссия и обмен мнениями.

На Конгрессе состоялись выборы Президента, Правления и ревизионной комиссии научного общества патофизиологов Украины. Президентом был избран директор ГУ «Украинского научно-исследовательского института медицины транспорта», профессор А.И. Гоженко. Были проведены выборы президиума общества, обновлены позиции вице-президентов по учебной и научной работе, международной деятельности. Делегаты Конгресса приняли решение о начале работы по созданию фонда общенациональной базы наглядного материала (муляжи, тесты, лекции, видеофильмы, методические рекомендации к преподаванию дисциплины, видеоархив классических экспериментальных исследований и т.п.); создание учебника по патологической физиологии для студентов высшего фармацевтического учебного заведения и фармацевтических факультетов высших медицинских учебных заведений; создание условий для внедрения курса дистанционного обучения по дисциплине «патологическая физиология».

В рамках Конгресса работала специализированная выставка, участники смогли ознакомиться с современной литературой, новейшими достижениями в области производства лекарственных препаратов, а так-

же посетить центр клинических исследований инновационных лекарственных препаратов.

Материалы конгресса опубликованы в виде статей в журналах «Украинский биофармацевтический журнал» [1] и «Экспериментальная и клиническая медицина» [2], а также в сборнике тезисов «Патофизиология и фармация: пути интеграции» [3].

Список литературы

1. Материалы VII Национального конгресса патофизиологов Украины с международным участием. *Украинский биофармацевтический журнал*, 2016; 4: 8-37.
2. Материалы VII Национального конгресса патофизиологов Украины с международным участием. *Экспериментальная и клиническая медицина*, 2016; 2: 7-245
3. Патофизиология и фармация пути интеграции: тезисы докладов VII Национального конгресса патофизи-

ологов Украины с международным участием (5-7 октября 2016). Х.: Изд-во НФаУ, 2016; 1-279.

References

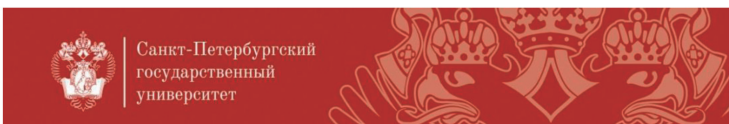
1. VII National Congress of Ukraine pathophysiologists with international participation. *Ukrainian biopharmaceutical Journal*. 2016; 4: 8-37.
2. VII National Congress of Ukraine pathophysiologists with international participation. *Experimental and Clinical Medicine*. 2016; 2: 7-245
3. *Pathophysiology and Pharmacy: the way of integration: abstracts VII National Congress Ukraine pathophysiologists with international participation (5-7 October 2016)*. Kharkov, 2016; 1-279.

Сведения об авторах:

Кубышкин Анатолий Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей и клинической патофизиологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО КФУ им. В.И. Вернадского. Кубышкин А.В. / Kubyshkin A.V., orcid.org/0000-0002-1309-4005

Фомочкина Ирина Ивановна, доктор мед. наук, проф. каф. общей и клинической патофизиологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО КФУ им. В.И. Вернадского. Фомочкина И.И. / Fomochkina I.I., orcid.org/0000-0003-3065-5748

Кононенко Надежда Николаевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии Национального фармацевтического университета (Харьков). Кононенко Н.Н. / Kononenko N.M., orcid.org/0000-0002-3850-6942



**XX МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ
НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ
"ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА. ЧЕЛОВЕК И ЕГО ЗДОРОВЬЕ"**

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО

Санкт-Петербургский государственный университет.
Российское физиологическое общество им. И.П. Павлова.
СПб отделение Международного общества патофизиологов.
СПб Хирургическое общество Н.И. Пирогова.
СПб отделение Всероссийского общества анатомов, гистологов и эмбриологов.
СПб Общество естествоиспытателей.
Медицинские научные и профессиональные общества Санкт-Петербурга.

22 апреля 2017 года состоится XX Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье».

Место проведения – СПбГУ, Здание Двенадцати коллегий (Университетская наб. 7-9), Актовый и Петровский залы. К участию приглашаются школьники, студенты, ординаторы, аспиранты, молодые научные работники (в возрасте до 35 полных лет). Принимаются работы, посвященные широкому кругу проблем всех отраслей клинической и профилактической медицины, а также морфологии, физиологии, патологии, фармакологии, биофизики, биоинформатики, биомедицинской кибернетики, биохимии, генетики.

Цель конференции – привлечение молодых исследователей к решению актуальных задач современной науки, интеграция высшего образования и фундаментальной науки. Из представленных работ будут отобраны *устные и стендовые* доклады. Тезисы докладов конференции *будут опубликованы в продолжающемся издании СПбГУ, входящем в РИНЦ: «Фундаментальная наука и клиническая медицина»* (Fundam. Nauka Klin. Med.), ISSN 2221-5654, том 20.

Тезисы принимаются до **1 марта 2017** года и могут быть поданы **только** через автоматическую систему регистрации участников и подачи материалов, расположенную по адресу:

<http://med.spbu.ru/index7k.htm>

Авторами тезисов могут быть **только** исследователи в возрасте до 35 полных лет, научных руководителей можно отметить благодарностью в конце тезисов.

Предельный размер текста – 2500 знаков включая пробелы. Иллюстрации не предусмотрены. Библиография допустима в счет общего объема тезисов по желанию авторов, до 5 источников. Литературные ссылки указываются в тексте номерами в квадратных скобках: [1] и т.д., в списке идут в столбик в порядке следования, с указанием первого автора, по образцу:

1. Самойлов М.О. и соавт.// Патол. физиол. эксперим. терап. – 2012. – №3. – с. 3 – 10.
2. Abbas A.K. et al. Cellular & Molecular Immunology. Saunders-Elsevier, 2007. – 566 p.

В конце тезисов доклада привести номер гранта, если он использовался. В тексте тезисов вместо греческих букв применять их русские названия (например, вместо α использовать "альфа").

Тезисы, оформленные с нарушением указанных правил, приняты быть не могут. После рассмотрения тезисов редколлегией авторы получают уведомление об участии в конференции и об устной или стендовой форме доклада.

E-mail: science_conferenceMFSPbGU@mail.ru NB! Адрес эл. почты указан только для вопросов, тезисы по эл. почте приняты быть не могут.

Научный оргкомитет конференции "Фундаментальная наука и клиническая медицина - 2017"