

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

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

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

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

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

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

ИФ РИНЦ 2014—2015 0,735

Журнал включен в базу данных Scopus

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

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

Сдано в набор 10.06.2016 г.
Подписано в печать 08.07.2016 г.

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и Экспер. тер.
2016. Том 60. № 3. 1—104

Перепечатка материалов и использование их в
любой форме, в том числе и в электронных СМИ,
возможны только с письменного разрешения из-
дателя.

За содержание рекламных публикаций
ответственность несет рекламодатель.

Тираж 300 экз.

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2016.

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 60, № 3, 2016

Июль—сентябрь

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

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

Редакционный совет

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

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

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

ИФ РИНЦ 2013 0,600

ISSN 0031-2991
Pathological
physiology
and experimental
therapy
2016. Vol. 60. № 3. 1–104

Moscow

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2016.

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATOLOGICHESKAYA FISIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIA

Pathological physiology and experimental therapy

*Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol. 60, № 3, 2016

July—September

Editor in chief B.B. Moroz

Assistant editors in chief:

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

Executive editor, scientific editor: N.S. Gourko

Members of editorial board:

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

Staff

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Тарасова Т.В., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Скворцова В.И.* Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов. . . . 4
- Тюренок И.Н., Перфилова В.Н., Лашеннова Л.И., Жакупова Г.А., Лебедева С.А.* Сравнение физического развития и скорости формирования сенсорно-двигательных рефлексов у потомства крыс с различными моделями экспериментальных преэклампсий. . . . 10
- Уракова М.А., Брындина И.Г.* Водный баланс легких и оксид азота крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва. . . . 18
- Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г.* Анализ экспрессии шаперонов DNAJB6/MRJ семейства HSP40 в клетках крови больных atopическим дерматитом при разных стадиях заболевания. . . . 23
- Тимофеева М.Р., Лукина С.А.* Сурфактантная система и водный баланс легких при моделировании нейродегенерации и очага патологической активности в черной субстанции. . . . 31
- Дьякова М.Е.* Особенности пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких. . . . 36
- Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Измestьев С.В.* Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии. . . . 42
- Роткина А.С., Пронина И.В., Лазарев В.Н., Ахаев Д.Н., Баскова И.П.* Дестабилаза-лизозим-2, оригинальный рекомбинантный тромболитический препарат медицинской пивки, ингибирует агрегацию тромбоцитов лошади. . . . 47
- Коннов В.А., Шаповалов К.Г.* Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с местной холодовой травмой при различном нутритивном статусе. . . . 52
- Невидимова Т.И., Мастерова Е.И., Савочкина Д.Н., Бохан Н.А.* Цитокинопосредованные изменения болевой чувствительности в оценке предрасположенности к формированию зависимости от психоактивных веществ. . . . 57
- Гордиенко А.И., Белоглазов В.А., Кубышкин А.В.* Дисбаланс показателей гуморального антиэндотоксинового иммунитета и низкоинтенсивное воспаление при сахарном диабете 1 и 2 типа. . . . 61
- Повешченко А.Ф., Казаков О.В., Орлов Н.Б., Повешченко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Соловьева И.Г., Струнkin Д.Н., Кабаков А.В., Райтер Т.В., Лыков А.П., Богачев С.С., Покушалов Е.А., Коненков В.И.* Цитокины лимфы как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar. . . . 68
- Карзакова Л.М., Автономова О.И., Кудряшов С.И., Комелягина Н.А., Ухтерова Н.Д.* Роль циркулирующих цитокинов и тиреоидных гормонов в развитии нефротического варианта гломерулонефрита. . . . 76
- Брин В.Б., Митциев К.Г., Митциев А.К., Кабисов О.Т.* Влияние гипervитаминоза D₃ на гемодинамические проявления экспериментальной медной интоксикации. . . . 83

ОБЗОРЫ

- Дмитриева Л.А., Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С.* Современное состояние проблемы доставки лекарственных веществ с использованием эритроцитов в качестве клеток-переносчиков. . . . 88

МЕТОДИКА

- Сухоруков В.Н., Камон Л., Ломм М., Карагодин В.П., Чепмен Д., Контуш А., Орехов А.Н.* Модификация метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией для анализа липидома ЛПВП. . . . 95
- Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Татур В.Ю., Веснин С.Г., Иванова Н.Д., Зиборов В.С.* СВЧ-излучение раствора альбумина при внешнем возбуждении. . . . 101

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Tarasova T.V., Ustyugov A.A., Ninkina N.N., Skvortsova V.I.* The new line of genetically modified mice with constitutive knockout of the gene alpha synuclein to study pathogenetic aspects of differential loss of dopaminergic neurons
- Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Lashhenova L.I., Zhakupova G.A., Lebedeva S.A.* Comparison of physical development and rate of formation sensory-motor reflexes offspring of rats with different experimental model of preeclampsia
- Urakova M.A., Bryndina I.G.* Water balance of lung and nitrogen oxide in blood at experimental autoimmune encephalomyelitis after capsaicin blockade of vagus nerve
- Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Grechko A.V., Morozov S.G.* Heat shock protein HSP40 family chaperone DNAJB6/MRJ expression analysis in blood cells obtained from patients with atopic dermatitis in different phases
- Timofeeva M.R., Lukina S.A.* Surfactant system and water balance of the lungs in modeling of neurodegeneration and focus of pathological activity in the substantia nigra
- Dyakova M.E.* Features purine metabolism in patients with pulmonary tuberculosis
- Tsybikov N.N., Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Izmest'ev S.V.* Endothelial dysfunction in experimental hyperhomocysteinemia
- Rotkina A.S., Pronina I.V., Lazarev V.N., Akhaev D.N., Baskova I.P.* Destabilase-lysozyme-2 — original recombinant thrombolytic preparation of medicinal leech inhibits horse platelets aggregation
- Konnov V.A., Shapovalov K.G.* Lymphocyte-platelet interactions in patients with deep frostbites with various nutritional statuses
- Nevidimova T.I., Masterova E.I., Savochkina D.N., Bokhan N.A.* Cytokine mediated changes of pain sensitivity in predisposition to substance dependence
- Gordienko A.I., Beloglazov V.A., Kubys'kin A.V.* Changes of humoral anti-endotoxin immunity and low-intensity inflammation in diabetes mellitus type 1 and 2
- Poveshchenko A.F., Kazakov O.V., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Bondarenko N.A., Solovieva I.G., Strunkin D.N., Kabakov A.V., Rayter T.V., Lykov A.P., Lykov A.P., Bogachev S.S., Pokushalov E.A., Konenkov V.I.* Lymph cytokines as markers oncogenesis and effective treatment of experimental breast cancer Wistar rat
- Karzakova L.M., Avtonomova O.I., Kudryashov S.I., Komelyagina N.A., Ukhterova N.D.* The role of circulating cytokines and thyroid hormones in the development of the nephrotic variant of glomerulonephritis
- Brin V.B., Mittsiev K.G., Mittsiev A.K., Kabisov O.T.* Influence hypervitaminosis D₃ on hemodynamic presentation of experimental copper intoxication

REVIEWS

- Dmitrieva L.A., Pivovarov Yu.I., Kuril'skaya T.E., Sergeeva A.S.* Modern state of problem of delivery of medicines with use of erythrocytes as cell-carriers

METHODS

- Sukhorukov V.N., Camont L., Lhomme M., Karagodin V.P., Chapman M.J., Kontush A., Orekhov A.N.* Novel liquid chromatography-mass spectrometry method to analyze hdl lipidome
- Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S.* SHF radiation from albumin solution upon external excitation

Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092.9

Тарасова Т.В.^{1,2}, Устюгов А.А.¹, Нинкина Н.Н.^{1,2}, Скворцова В.И.³

Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов

¹ — ФГБНУ «Институт физиологически активных веществ», Российская академия наук, 142432, Московская область, Черноголовка, Северный проезд, д. 1

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

³ — ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117415, Москва, ул. Лобачевского, д. 42, корп. 6

Цель исследования. Определение роли белка альфа-синуклеина в развитии и формировании популяций дофаминергических нейронов. **Методы.** В данной работе для моделирования недостаточности функции альфа-синуклеина была использована новая линия мышей с генетическим нокаутом *SNCA*. С помощью сравнительного морфометрического анализа у нокаутных и контрольных мышей была исследована динамика формирования двух различных популяций дофаминергических нейронов, дифференциально поражаемых у больных с болезнью Паркинсона (БП). **Результаты.** Показано, что альфа-синуклеин оказывает выраженный модулирующий эффект на развитие дофаминергических (ДА) нейронов чёрной субстанции (ЧС), поражение которых характерно для БП, и не влияет на формирование ДА нейронов вентральной области покрышки (ВОП), которая в меньшей степени подвержена дегенеративным изменениям при БП. **Заключение.** Новая линия нокаутных мышей является удобной моделью для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения ДА нейронов.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания; альфа-синуклеинопатии; дофаминергические нейроны; болезнь Паркинсона (БП); генетический нокаут.

Для цитирования: Тарасова Т.В., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Скворцова В.И. Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 4–9.

Для корреспонденции: Тарасова Татьяна Владимировна, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Институт физиологически активных веществ», Российская академия наук, e-mail: tarasovat189@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (идентификатор RFMEFI60414X0144).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.03.2016

Tarasova T.V.^{1,2}, Ustyugov A.A.¹, Ninkina N.N.^{1,2}, Skvortsova V.I.³

The new line of genetically modified mice with constitutive knockout of the gene alpha synuclein to study pathogenetic aspects of differential loss of dopaminergic neurons

¹ — Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences (IPAC RAS). Severniy pr., Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

² — The Institute of general pathology and pathophysiology. 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia

³ — Department of fundamental and clinical neurology and neurosurgery of Russian national research medical University Medicobiologic faculty. 42 Lobachevscogo st., Moscow, 117415, Russia

The purpose. This study investigated the role of alpha-synuclein in the development of dopaminergic neurons. **Methods.** In this study a new *SNCA* knockout mouse line has been used to model the deficiency of alpha-synuclein function. In the knockout and control mice the dynamics of the formation of two distinct populations of dopaminergic neurons differentially affected in patients with PD was studied by the comparative morphometric analysis. **Results.** Here, we revealed a

prominent modulating effect of alpha-synuclein on the developing DA neurons in substantia nigra (SN) which is the most affected region in PD patients. Yet, alpha-synuclein had no effect on the formation of DA neurons in ventral tegmental area which is much less susceptible to degeneration in PD patients. **Conclusion.** The new line of knockout mice is a convenient model for studying pathophysiological aspects of selective impairment of DA neurons.

Keywords: neurodegenerative diseases; alpha-synucleinopathies; dopaminergic neurons; Parkinson's disease (PD); knockout mice

For citation: Tarasova T.V., Ustyugov A.A., Ninkina N.N., Skvortsova V.I. The new line of genetically modified mice with constitutive knockout of the gene alpha synuclein to study pathogenetic aspects of differential loss of dopaminergic neurons. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 4–9. (in Russ).

For correspondence: Tatiana V. Tarasova, Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences (IPAC RAS). Severniy pr., Chernogolovka, Moscow region, 142432, e-mail: tarasovat189@gmail.com

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

Funding. The work was supported by the RF Ministry of Education and Science RFMEFI60414x0144.

Received 23.03.2016

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) — социально значимое нейродегенеративное заболевание, частота встречаемости которого прямо коррелирует с возрастом, и по данным мировых популяционных исследований составляет от 0,5 до 1% среди населения в возрасте старше 65 лет. В возрастной группе старше 65 лет эти показатели еще выше и составляют 2—4% [1—3]. В подавляющем большинстве случаев диагностируются идиопатические формы БП и лишь 5—10% являются семейными формами [4].

Характерным патогистологическим признаком БП являются классические цитоплазматические тельца Леви [5], выявляемые в аутопсийном материале больных, в первую очередь, в области черной субстанции (ЧС) [6]. В составе этих эозинфильных включений в качестве основного компонента был обнаружен агрегированный альфа-синуклеин [7].

Мутации в гене альфа-синуклеина (*SNCA*) часто являются причиной изменения его агрегационных свойств и формирования включений. После описания первой аутосомно-доминантной мутации в гене *SNCA* при семейной форме БП, существенно активизировалось изучение локуса альфа-синуклеина [8]. Всего в результате медико-генетических исследований больных с БП было выявлено 6 мутаций с заменой аминокислот. Все они расположены между вторым и четвертым КТК-повторами, которые представляют собой повторяющейся аминокислотный мотив КТКЕГV на протяжении первых 87 аминокислотных остатков белковой молекулы [4, 9, 10]. Помимо точечных мутаций описаны дубликации [11] и трипликации [12] в локусе гена *SNCA*, которые также ассоциированы с наследственными формами БП. Считается, что мутации в гене альфа-синуклеина могут быть причиной агрегации этого белка и формирова-

ния фибрилл амилоидного типа с развитием прогрессирующей альфа-синуклеинопатии, которая характерна для болезни Паркинсона.

Данная работа посвящена изучению роли альфа-синуклеина в развитии дофаминергических нейронов в двух близко расположенных анатомических структурах мозга: черной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП) среднего мозга. Если поражение дофаминергических нейронов черной субстанции является основным признаком БП, то ДА нейроны вентральной области покрышки практически не затрагиваются дегенеративным процессом.

Цель исследования — изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе нарушения конформационной стабильности, метаболизма и компартиментализации альфа-синуклеина и его роли в патогенезе болезни Паркинсона.

Методика

В качестве экспериментальной модели была использована новая линия нокаутных мышей с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина [*SNCA*^{ΔfloX/ΔfloX}]. Генетические модификации, обеспечивающие делецию содержащего старт-кодон экзона, были выполнены в минимально возможном на сегодняшний день объеме [13]. В качестве контрольной группы были использованы когорты мышей, полученные в процессе производства нокаутных животных и имеющие с ними общих производителей, не получившие модифицированный аллель (дикого типа). Все животные группы были на генетическом фоне линии C57Bl6J.

Колонии экспериментальных и контрольных мышей содержались в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч светлого времени, 12 ч темного времени) при постоянной температуре 20°C. Работы с животными

проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г.

Подсчёт клеток проводили на эмбриональных стадиях развития, когда происходит активное формирование ДА нейронов: на 11,5 день развития, а также на 12,5 и 13, эмбриональные дни, и в период постнатального синаптогенеза — 7 сут. после рождения, а также у взрослых шестимесячных животных.

Для приготовления гистологических препаратов фиксацию эмбрионов проводили с помощью холодного 4% параформальдегида на физрастворе, также как и головного мозга 7-суточных животных для последующего иммуногистохимического анализа. Материал от взрослых животных фиксировали в жидкости Карнуа. После фиксации отмывали образцы в фосфатно-солевом буфере и проводили дегидратацию. На последнем этапе де-

гидратации использовали ксилол в случае эмбриональных тканей, а для тканей взрослых животных — хлороформ. Серийные срезы толщиной 8 мкм получали с помощью ротационного микротомы Leica RM2265 и монтировали на предметные стекла. Иммуногистохимическое окрашивание ДА нейронов проводили с использованием антител против тирозингидроксилазы (ТГ) (Mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase clone TH-2, Sigma) в концентрации 1:1000. Подсчёт ТГ-позитивных нейронов выполняли на серии срезов во всей анатомической структуре черной субстанции и, отдельно, в вентральной области покрышки. Для анализа количества ДА нейронов использовали стереологический подход для подсчёта ТГ-позитивных нейронов в серии срезов во всей анатомической структуре чёрной субстанции и отдельно в вентральной области покрышки [14, 15],

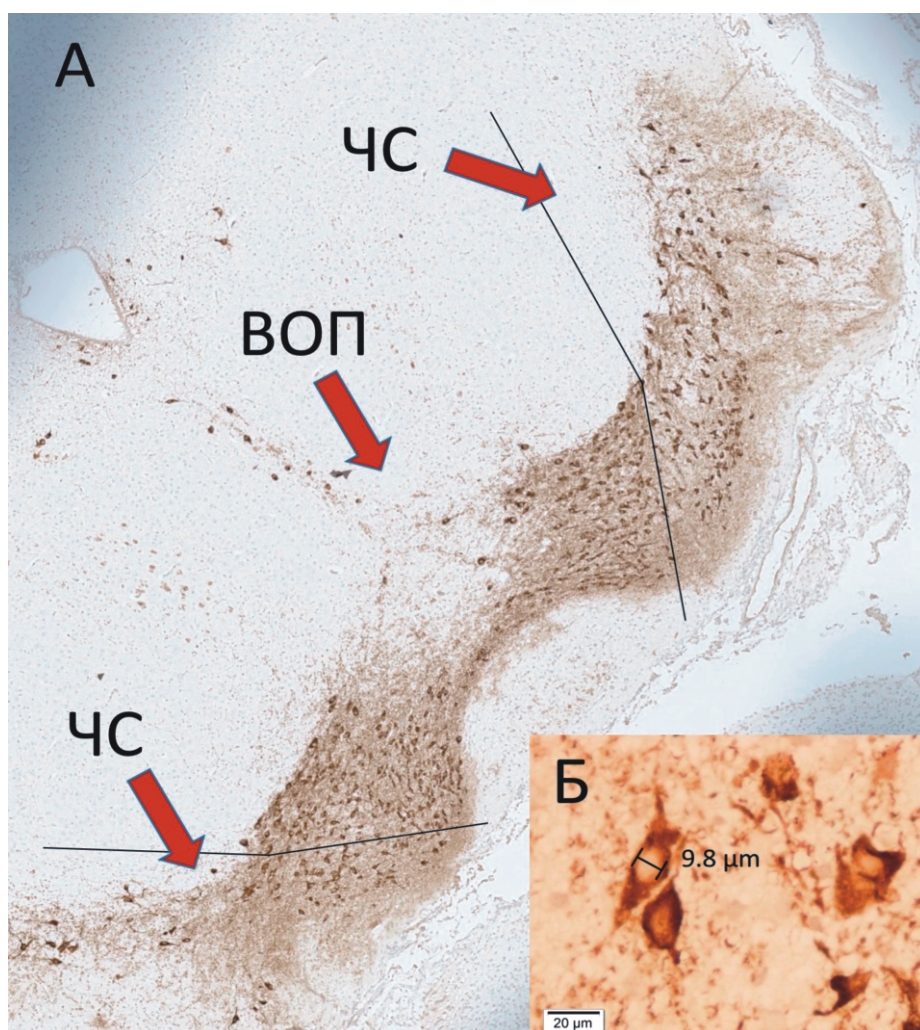


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание среза головного мозга мыши для подсчёта ТГ-позитивных нейронов. А. Общий план, локализация черной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП) в среднем мозге мыши на 7-й день постнатального развития. Окраска моноклональными антителами против тирозингидроксилазы. Стрелками указаны области чёрной субстанции для левой и правой сторон и вентральной области покрышки. Увеличение 100х. Б. Измерение диаметра ядра нейрона. Увеличение 200х.

с некоторыми собственными модификациями [16]. Локализацию анализируемой анатомической структуры определяли по атласу [17].

Для подсчета каждый 5-й срез располагали на предметном стекле, всего 10 срезов толщиной в 8 мкм на стекло, и проводили стандартную иммуногистохимическую окраску. Выполняли микроскопию и получали микрофотографии при увеличении 200х и 400х на фотокамере Leica DFS 490 с программным обеспечением Leica Application Suit v. 2.8.1. Подсчет количества нейронов, окрашенных тирозингидроксилазой, проводили вручную. Подсчитывали общее число нейронов для ВОП и отдельно значения для правой и левой частей ЧС. Вычисляли общее значение числа ДА нейронов во всем объеме анализируемой анатомической структуры. Не все видимые под микроскопом на каждом срезе нейроны являются целыми объектами, поскольку диаметр клетки может быть больше, чем толщина микротомного среза. Для введения коррекционной поправки измеряли диаметр 30 нейронов, располагавшихся в каждой из исследуемых областей (рис. 1), и определяли общее количество нейронов в популяции во всем объеме исследуемой анатомической структуры с помощью поправки Абекромби по формуле [18, 19] с собственными модификациями [16]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных пакетов Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.) и GraphPad Prism 6.

Результаты и обсуждение

Нами было выявлено, что при формировании предшественников ДА нейронов в ЧС у животных линии [SNCA^{Δflox/Δflox}] в период эмбриогенеза на стадии E11.5 количество ТГ-положительных клеток одинаково, как в опытной, так и в контрольной группе. На эмбриональной стадии E13.5 у мышей линии [SNCA^{Δflox/Δflox}] детектировалось статистически значимое увеличение ТГ-положительных клеток на 20% по сравнению с контрольными животными дикого типа от тех же производителей (рис. 2).

Нельзя исключить потенциальную возможность повышения регенеративного ресурса в изучаемой анатомической области за счёт олигодендроцитов, важная роль которых в регенеративных процессах мозга была описана в ряде работ [20]. При анализе популяций ТГ-положительных клеток в ВОП у нокаутных и контрольных животных дикого типа в эмбриогенезе статистически значимых различий выявлено не было (рис. 3), что согласуется

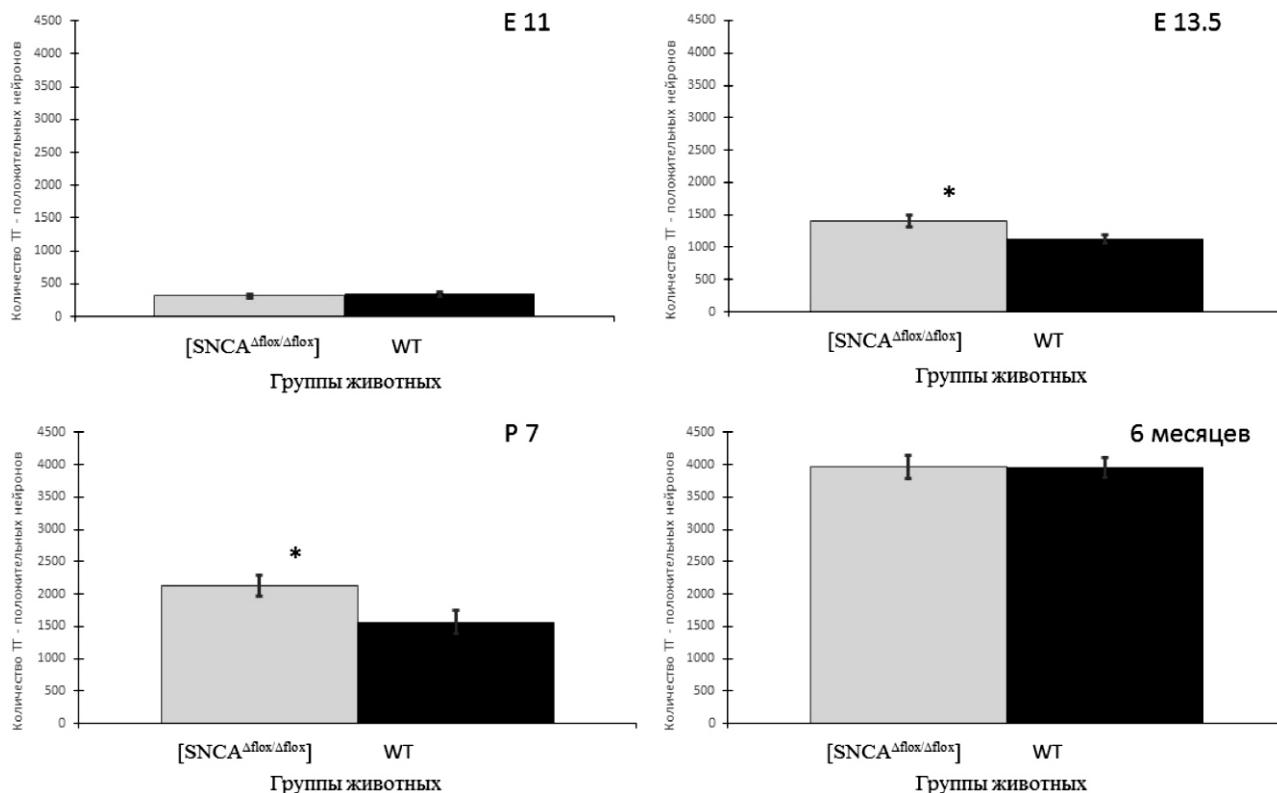


Рис. 2. Сравнительный морфометрический анализ дофаминергических нейронов в чёрной субстанции мозга мышей при генетической инактивации альфа-синуклеина. Общее число ДА нейронов в анатомической структуре у животных нокаутной линии [SNCA^{Δflox/Δflox}] и контрольных группы животных дикого типа (WT) в эмбриогенезе: E11.5 и E13.5, P7 — раннем постнатальном периоде (7-й день после рождения) и у взрослых особей (возраст 6 мес.); $n = 5$ для каждой группы, * — $p < 0,01$ по критерию U Вилкоксона—Манна—Уитни.

с патогистологическими данными по исследованию этих анатомических областей мозга у больных с БП, указывающими на гораздо менее выраженные признаки поражения ДА нейронов ВОП по сравнению с ЧС.

В раннем постнатальном периоде морфометрический анализ ДА нейронов в ЧС у $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ мышей на 7-е сут. после рождения показал, что у нокаутных животных их число статистически значимо выше (9%), чем у контрольных животных дикого типа (рис. 2). Однако при анализе ДА нейронов в области ВОП и на этом этапе развития nigrostriарной системы не было выявлено статистически значимых различий у нокаутных животных и контрольных животных дикого типа (рис. 3).

Поскольку известно, что дефицит ДА нейронов, выявляемый на ранних стадиях развития ЧС, компенсируется на последующих стадиях [21], был проведен сравнительный морфометрический анализ ДА нейронов у молодых животных в возрасте 6 мес. с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ и контрольных мышей с генотипом дикого типа из тех же пометов. Было показано, что у молодых

взрослых животных происходит компенсаторная нормализация количества ДА нейронов и статистически значимой разницы в количестве клеток не обнаруживается ни в ВОП, ни в ЧС (рис. 2, 3).

В данном исследовании нами было выявлено влияние альфа-синуклеина на развитие дофаминергических нейронов в эмбриогенезе в черной субстанции и вентральной области покрышки среднего мозга новой линии нокаутных мышей с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина. Был проведен морфометрический анализ дофаминергических нейронов в двух анатомических областях: ЧС и ВОП на стадии постнатального синаптогенеза с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина, при котором были выявлены отличия от контрольной группы. Таким образом, в отсутствие альфа-синуклеина, в развивающемся мозге мышей происходит ускоренная дифференцировка ТГ-позитивных нейронов в области черной субстанции, а также более активный синаптогенез, в то время, как их пролиферация, миграция, дифференцировка во время эмбрионального развития и в период активного синаптогенеза в зоне вентраль-

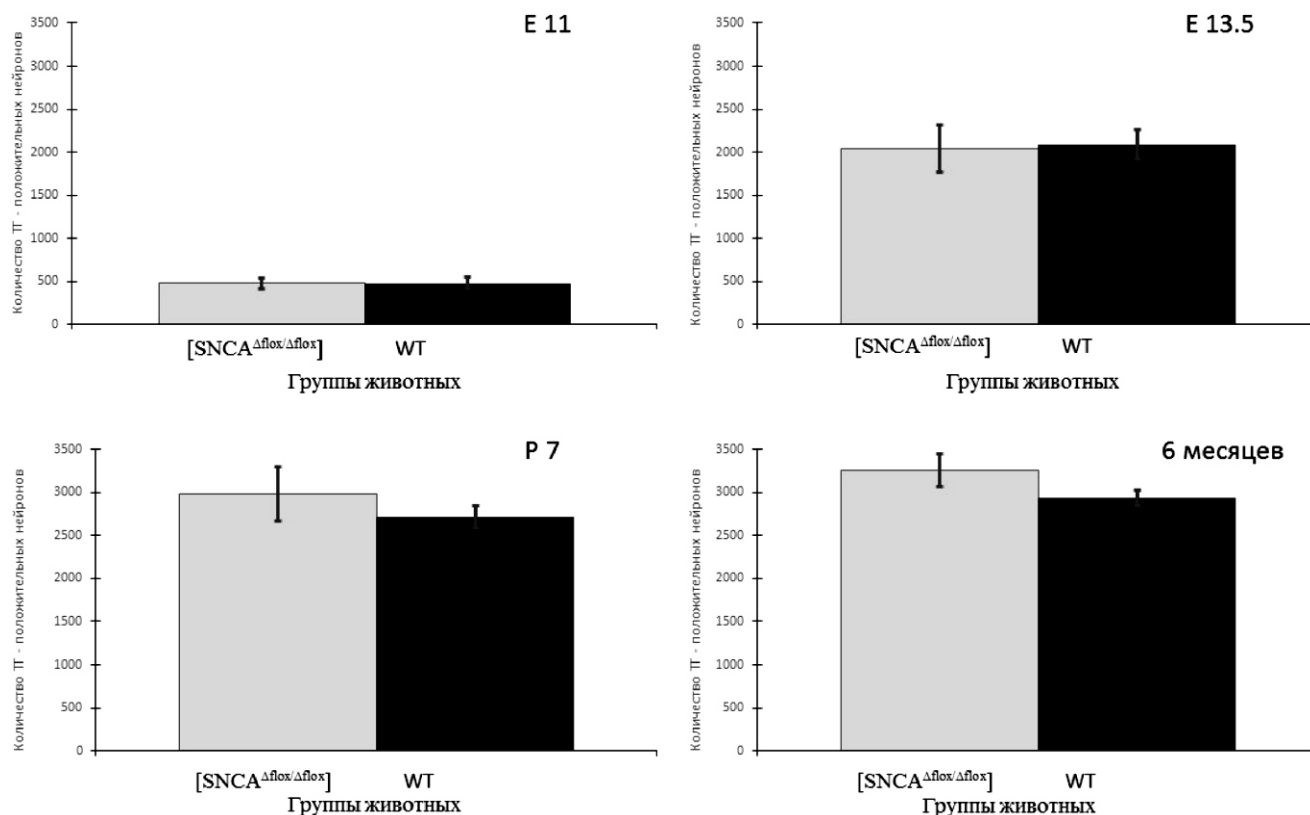


Рис. 3. Сравнительный морфометрический анализ дофаминергических нейронов в вентральной области покрышки (ВОП) мозга мышей при генетической инактивации альфа-синуклеина.

Общее число ДА нейронов в анатомической структуре у животных нокаутной линии $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ и контрольной группе животных дикого типа (WT) в эмбриогенезе: E11.5 и E13.5, P7 — раннем постнатальном периоде (7-й день после рождения) и у взрослых особей (возраст 6 мес.); $n = 5$ для каждой группы.

ной области покрывки не отличается от контрольной группы животных.

Была выявлена нормализация количества ДА нейронов при анализе шестимесячных животных, что возможно достигается за счёт пластичности головного мозга.

Полученные данные демонстрируют моделирующее действие альфа-синуклеина в процессе формирования ДА нейронов чёрной субстанции среднего мозга на различных этапах онтогенеза и в постнатальном периоде.

References

1. Rinne J.O., Anichtchik O.V., Eriksson K.S., Kaslin J., Tuomisto L., Kalimo H. et al. Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *J Neurochem*; 2002; 81 (5): 954-60.
2. Schapira A.H. Disease-modifying strategies and challenges in PD: interactive breakout sessions. *Neurology*. 2003; V. 61, (№ 6 Suppl 3): S56-63.
3. de Lau L.M., Breteler M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006; 5 (6): 525-35.
4. Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet*; 2009; 18(№ R1): R48-59.
5. Kryzhanovskiy G.N., Karaban I.N., Magaeva S.V., Kucheryanu V.G., Karaban N.V. Parkinson's disease. [Bolezni Parkinsona] *Moscow: Meditsina*; 2002. (in Russian)
6. Dickson D.W., Braak H., Duda J.E., Duyckaerts C., Gasser T., Halliday et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*. 2009; 8(12): 1150-7.
7. Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(11): 6469-73.
8. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997; 276 (5321): 2045-7.
9. Appel-Cresswell S., Vilarino-Guell C., Encarnacion M., Sherman H., Yu I., Shah B. et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013; 28(6): 811-3.
10. Pasanen P., Myllykangas L., Siitonen M., Raunio A., Kaakkola S., Lyytinen J. et al. Novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging*. 2014; 35 (9): 2180 e1-5.
11. Ibanez P., Bonnet A.M., DeBarges B., Lohmann E., Tison F., Pollak P. et al.; Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004; 364 (9440): 1169-71.
12. Singleton A., Gwinn-Hardy K.; Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: a difference in dose? *Lancet*. 2004; 364 (9440): 1105-7.
13. Ninkina N., Connor-Robson N., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Shelkovnikova T.A., Buchman V.L. A novel resource for studying function and dysfunction of alpha-synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression. *Sci Rep*. 2015; V. 5: P. 16615.
14. Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Dorig N., Connor-Robson N. et al. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J Neurosci*. 2011; 31(20): 7264-74.
15. Robertson D.C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P.A., Sharkey J., Buchman V.L. Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice. *J Neurochem*. 2004; 89 (5): 1126-36.
16. Bachurin S.O., Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O., Khritankova I., Afanasieva M.A. et al. Dimebon slows progression of proteinopathy in gamma-synuclein transgenic mice. *Neurotox Res*. 2012; 22(1): 33-42.
17. Franklin K.B.J., Paxinos G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates; Third Edition: USA: *Academic Press is an imprint of Elsevier*; 2007.
18. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*. 1946; V. 94: P. 239-47.
19. Abercrombie M., Johnson M.L. The effect of reinnervation on collagen formation in degenerating sciatic nerves of rabbits. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1947; 10(2): 89-92.
20. Kubatiev A.A., Paltsyn A.A. Intracellular brain regeneration: a new view. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh nauk*. 2012; V. 8: p. 21-5. (in Russian)
21. Tarasova T.V., Lytkina O.A., Roman A.U., Bachurin S.O., Ustyugov A.A. The role of alpha-synuclein in the development of the dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *Doklady Akademii Nauk*. 2016; V 466 (№5): p.620-3. (in Russian)

Сведения об авторах:

Устюгов Алексей Анатольевич, канд. биол. наук, «Институт физиологически активных веществ», Российская академия наук

Нинкина Наталья Николаевна, доктор мед. наук, зав. лаб. генетического моделирования нейродегенеративных процессов, «Институт физиологически активных веществ», Российская академия наук

Скворцова Вероника Игоревна, доктор мед. наук, член-кор., каф. фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии МБФ РНИМУ, 117415, Москва, ул. Лобачевского, д. 42, корпус 6 +7

Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Лашенцова Л.И., Жакупова Г.А., Лебедева С.А.

Сравнение физического развития и скорости формирования сенсорно-двигательных рефлексов у потомства крыс с различными моделями экспериментальных преэклампсий

ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ, 400131, г. Волгоград, площадь Павших борцов, д. 1

Цель исследования: сравнительное изучение влияния АДМА-подобной преэклампсии (ПЭ) и преэклампсии, модулируемой путем замены питьевой воды на 1,8%-ный раствор NaCl в период гестации у самок, на физическое развитие и скорость формирования сенсорно-двигательных рефлексов у потомства. **Методика.** Исследование выполнено на 3 группах беременных крыс в возрасте 3—4 мес. с исходной массой 210—250 г и их потомстве. Были сформированы группы: 1-я контрольная — самки с неосложненной беременностью (n = 6) и их потомство (n = 49); 2-я (1-я опытная — беременные самки с ЭП) (n = 6), вызванной внутрибрюшинным введением L-NAME в дозе 25 мг/кг с 14-го по 21-й день гестации (АДМА-подобная преэклампсия), и их потомство (n = 35); 3-я — опытная 2-я группа — беременные самки с ЭП (n = 6), модулируемой заменой питьевой воды на 1,8% раствор NaCl в течение всего периода гестации, и их потомство (n = 45). Изучение физического развития потомства крыс с ЭП проводилось по срокам появления признаков: отлипания ушной раковины, появления волосяного покрова, прорезывания резцов, открытия глаз. Скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов и координацию движений потомства крыс с ЭП оценивали по времени появления опоры на задние конечности, подъема всего тела, ползания, поднимания головы и передних лап, переворачивания в свободном падении и на плоскости, отрицательному геотаксису, реакции на акустический стимул, обонятельной реакции, длительности удержания на горизонтальной сетке. **Результаты.** У потомства самок с ЭП обеих опытных групп установлены более поздние сроки отлипания ушной раковины, прорезывания резцов, появления волосяного покрова по сравнению с соответствующими показателями крысят контрольной группы. Также у потомства крыс в опытных группах выявлено отставание в сроках начала выполнения тестов «переворачивание на плоскости», «отрицательный геотаксис», «переворачивание в свободном падении», «избегание обрыва», «мышечная сила», «поднимание головы и передних лап», «опора на задние конечности», «обонятельная реакция», «реакция на акустический стимул» относительно таковых у крысят, рожденных от самок с неосложненной беременностью. **Заключение.** ЭП, модулируемые введением беременным самкам АДМА и заменой питьевой воды на 1,8% раствор NaCl, вызывают задержку физического развития, отставание в формировании сенсорно-двигательных рефлексов и вестибулярной реакции у потомства.

Ключевые слова: экспериментальная преэклампсия, физическое развитие потомства, сенсорно-двигательные рефлексы

Для цитирования: Тюренков И.Н., Перфилова В.Н., Лашенцова Л.И., Жакупова Г.А., Лебедева С.А. Сравнение физического развития и скорости формирования сенсорно-двигательных рефлексов у потомства от крыс с различными моделями экспериментальных преэклампсий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 10—17.

Для корреспонденции: Перфилова Валентина Николаевна, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии ВолгГМУ, e-mail: vnperfilova@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.09.2015

Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Lashhenova L.I., Zhakupova G.A., Lebedeva S.A.

Comparison of physical development and rate of formation sensory-motor reflexes offspring of rats with different experimental model of preeclampsia

Volgograd State Medical University, 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russian Federation

Summary. A comparative study of the physical development and the rate of formation of sensory-motor reflexes offspring of rats with experimental preeclampsia (EP) was carried out. In the first experimental group EP was modeled intraperitoneal conduct of L-NAME at a dose of 25 mg/kg from 14 to 21 days of gestation, the second experimental group — the replacement of drinking water by 1.8% sodium chloride solution for the entire period of gestation. In the offspring of both groups, there was a delay of physical development, which was reflected in the later timing of the hair coat development, incisor eruption, pinna detachment as compared to the pups in the control group. It also noted the gap in the formation of sensory-motor reflexes and vestibular reactions. This was manifested in the delayed appearance of the olfactory response, auditory sensitivity, later performing tests «righting reflex», «negative geotaxis», «aerial righting reflex», «cliff avoidance», «horizontal wire test», «raising the head and forelegs», «supporting their bodies on hind legs» as compared to the indices of the pups of the female rats with an uncomplicated pregnancy. The most pronounced lag in postnatal development was observed in the offspring of rats with EP, which instead of drinking water was prepared 1.8% sodium chloride during the entire period of gestation. **The purpose.** To make a comparative study of the impact of ADMA-like preeclampsia (PE) and preeclampsia modeled by the replacement of drinking water consumed by female rats during gestation with 1.8% NaCl solution on the physical development and the rate of the maturation of sensory motor reflexes of their offspring. **Methods.** The study was performed on three groups of pregnant female rats aged 3—4 months whose original weight was 210—250 g and their pups. They were divided into three groups: 1: Control group including female rats with an uncomplicated pregnancy (n = 6) and their pups (n = 49); 2. Experimental group 1 — pregnant female rats with PE (n = 6) induced by intraabdominal introduction of L-NAME at a dose of 25 mg/kg from 14 to 21 day of gestation (ADMA-like preeclampsia) and their offspring (n = 35); 3. Experimental group 2 — pregnant female rats with PE (n = 6) modeled by the replacement of drinking throughout gestation with 1.8% NaCl solution and their pups. When studying the physical development of the pups we considered the terms of pinna detachment, hair coat development, incisor eruption and the time when they began to open their eyes. To estimate the rate of the maturation of sensory motor reflexes and motor coordination of the pups of the rats with PE we analyzed the time when they started to support their bodies on hind legs, lift their bodies off the floor, crawl, raise their head and forelegs, show the aerial righting reflex and the righting reflex, negative geotaxis, reactions to auditory and olfactory stimuli as well as the time they managed to stay on the horizontal wire. **Results.** The pups of the female rats with PE of both experimental groups were found to have later pinna detachment, incisor eruption and hair coat development as compared to the indices of the control group. In addition, the offspring of the experimental groups demonstrated a delay in the performance of the following tests: «righting reflex», «negative geotaxis», «aerial righting reflex», «cliff avoidance», «horizontal wire test», «raising the head and forelegs», «supporting their bodies on hind legs», «reaction to an olfactory stimulus» and «reaction to an auditory stimulus» as compared to the indices of the pups of the female rats with an uncomplicated pregnancy. **Conclusion.** PE induced by the introduction of ADMA to pregnant female rats and by the replacement of drinking water consumed by female rats during gestation with 1.8% NaCl solution causes a delay in physical development, maturation of sensory motor reflexes and vestibular reactions in their offspring.

Keywords: experimental pre-eclampsia, physical development of the offspring, sensory-motor reflexes.

For citation: Tyurenkov I.N., Perfilova V.N., Lashhenova L.I., Zhakupova G.A., Lebedeva S.A. Comparison of physical development and rate of formation sensory-motor reflexes offspring of rats with different experimental model of preeclampsia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 10—17. (in Russ).

For correspondence: Valentina N. Perfilova, Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher Research Institute of Pharmacology of Volgograd State Medical University; 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russian Federation, e-mail: vnperfilova@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Tyurenkov I.N. [Http://orcid.org/0000-0001-7574-3923](http://orcid.org/0000-0001-7574-3923)

Perfilova V.N. <http://orcid.org/0000-0002-2457-8486>

Received 15.09.2015

Введение

У детей, родившихся от матерей, перенесших преэклампсию (ПЭ), перинатальная заболеваемость встречается 78% случаев, а смертность в 3—4 раза превышает популяционную. В результате ПЭ может наблюдаться гипоперфузия маточно-плацентарного комплекса и гипоксия, вызывающие плацентарную недостаточность, снижение содержания амниотической жидкости, маленький для гестационного возраста размер плода (small gestational age, SGA), низкую массу тела при рождении [1] и различные патологии постнатального развития [2, 3].

Несмотря на широкий спектр фармакологических препаратов, применяемых для снятия симптомов ПЭ и корригирующих нарушения наблюдаемые у детей, рожденных матерями с этим осложнением беременности, эффект далеко не всегда удовлетворяет требованиям врачей клинической практики. Для поиска новых эффективных лекарственных веществ нужны адекватные экспериментальные модели преэклампсий, отражающие отклонения в постнатальном развитии потомства.

В исследованиях широко используется экспериментальная модель преэклампсии, вызванная внутрибрюшинным введением N-нитро-L-аргинин-метилового эфира (L-NAME) — ADMA (асимметричный диметиларгинин) — подобная модель ПЭ [4—6]. ADMA — физиологический ингибитор e-NOS (эндотелиальной синтазы оксида азота), он блокирует синтез оксида азота и способен легко вовлекаться в патологические реакции, связанные со свободнорадикальным окислением в организме матери и развитии эндотелиальной дисфункции, являющейся ключевым звеном в патогенезе ПЭ, приводящей к снижению кровообращения в маточно-плацентарном комплексе, возникновению гипоксии и развитию нарушений внутриутробного развития плода. Неселективный блокатор NO-синтаз — L-NAME — моделирует состояние, сходное с повышенным содержанием ADMA в крови, он подавляет выработку NO, что приводит к повышению вазоконстрикции, увеличению артериального давления, нарушению целостности эндотелия сосудов и развитию ПЭ.

В 2007 г. Beausejour A. и соавт. была предложена легко воспроизводимая модель преэклампсии, вызванная заменой питьевой воды на 1,8% раствора хлорида натрия с 14-го дня гестации до родов. В настоящее время она достаточно часто используется в экспериментах.

Цель исследования — сравнительное изучение влияния ADMA-подобной преэклампсии (ПЭ) и преэклампсии, модулируемой путем замены питьевой воды на 1,8%-ный раствор NaCl в период гестации,

на физическое развитие и скорость формирования сенсорно-двигательных рефлексов у потомства.

Методика

Исследование выполнено на беременных крысах в возрасте 3—4 мес. с исходной массой 210—250 г и их потомстве.

Крысы были разделены на 3 группы по 6 животных в каждой:

- 1-я группа (контроль — самки с неосложненной беременностью и их потомство (n = 49));
- 2-я (опытная группа 1) — беременные самки с экспериментальной преэклампсией, вызванной внутрибрюшинным введением L-NAME в дозе 25 мг/кг с 14-го по 21-й день гестации (ADMA-подобная преэклампсия) [7, 6] и их потомство (n = 35);
- 3-я (опытная группа 2) — беременные самки с ЭП, модулируемой заменой питьевой воды на 1,8% раствор NaCl в течение всего срока гестации [8], и их потомство (n = 45).

Животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово» (Ленинградская область) и содержались в условиях вивария ВолгГМУ на обычном рационе и свободном доступе к воде. Уход за ними осуществляли согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Международных рекомендаций «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [The European Convention, 1986]. Работа выполнена в соответствии с заключением Регионального Независимого Этического Комитета (ГУ Волгоградский Медицинский Научный Центр): протокол № 176-2013 от 28 июня 2013 г.

Физическое развитие потомства крыс с ЭП оценивали по срокам: отлипания ушной раковины, появления волосяного покрова, прорезывания резцов, открытия глаз.

Скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов и координацию движений потомства крыс с ЭП оценивали по времени появления следующих признаков: опора на задние конечности, подъем всего тела, ползание, поднимание головы и передних лап, переворачивание в свободном падении и на плоскости, отрицательный геотаксис, реакция на акустический стимул, обонятельная реакция, длительность удержания на горизонтальной сетке. Все тесты воспроизводились по рекомендациям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [9].

Тест «Перевоорачивание на плоскости» проводили на плоской поверхности со 2-х сут. после рождения. Крысят укладывали на спину и фиксировали факт возвращения в нормальное положение на все 4 лапы. Тест считался выполненным, если крысята возвращались на все лапы в течение 30 с.

Тест «Отрицательный геотаксис» проводили с 5-х сут. постнатального периода. Крысят помещали на наклонную плоскость (25°) головой вниз. Рефлекс считался сформированным, если крысята поворачивались на 180°.

Тест «Избегание обрыва» проводили с 6-х сут. послеродового периода. Крысят клали на стол таким образом, чтобы передние лапы касались края стола. Формирование рефлекса считалось завершенным, если в течение 10 с они отползали от края.

Тест «Перевоорачивание в свободном падении» проводили на 17-е сут. после рождения. Крысят держали спиной вниз на высоте 60 см над мягкой поверхностью и быстро отпускали. Визуально регистрировали, переворачиваются ли крысята в воздухе, чтобы упасть на все 4 лапы.

Реакцию на акустический стимул регистрировали визуально с 8-х сут. после рождения. Крысят помещали на небольшую площадку в звукоизолированной клетке. Рефлекс считался сформированным, если животное реагировало на акустический стимул (хлопок в ладоши).

Обонятельная реакция изучалась с 10-х сут. постнатального периода. Животное помещали на середину рейки шириной 6 см, которую клали на 2 клетки (одну — пустую, другую — с потомством и матерью, в которой детеныши содержались перед исследованием). Рефлекс фиксировался, если крысенок двигался по направлению к своей клетке.

Поднимание головы и передних лап, ползание, опора на задние конечности и подъем всего тела, регистрировались визуально при помещении крысят на плоскую поверхность, начиная с 8-х, 9-х, 13-х сут. соответственно.

Мышечную силу и тонус мышц у животных оценивали на 15-е сут. постнатального периода по време-

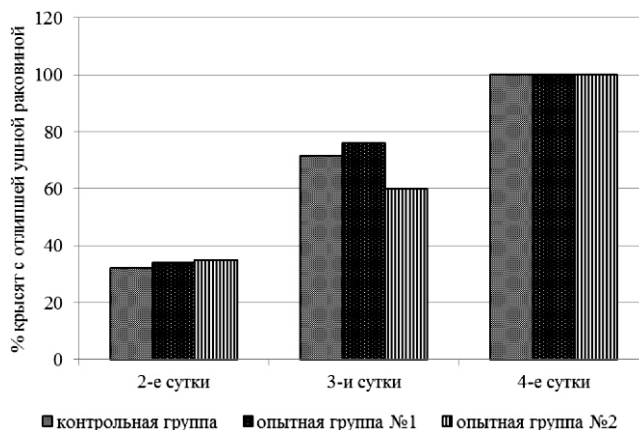


Рис. 1. Сроки отпадения ушной раковины у потомства самок с экспериментальными преэклампсиями.

ни удержания на горизонтальной сетке. Животное помещали на густую проволочную сетку и сразу же переворачивали ее на 180°. Регистрировали время с момента посадки до момента падения с сетки. В каждом сеансе тест повторяли трижды.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0». После проверки выборок на нормальность распределения по W-критерию Шапиро—Уилка применяли H-критерий Крускала—Уоллиса, Сигела—Кастеллана. Для сравнения данных с альтернативной формой реакции использовался точный критерий Фишера. Результаты представлены в виде $M \pm \sigma$, где M — выборочное среднее, σ — стандартное отклонение от среднего [10].

Результаты и обсуждение

При изучении влияния ЭП на физическое развитие потомства выявлено, что отпадение ушной раковины в 100% случаев у крысят всех исследуемых групп отмечается на 4-е сут. постнатального периода, однако у потомства 2-й опытной группы на 3-и сут. наблюдалось незначительное отставание как от контрольной группы, так и от 1-й опытной (рис. 1).

Таблица 1

Сроки прорезывания резцов у потомства самок с экспериментальными преэклампсиями

Группа животных	К-во / % крысят с прорезавшимися резцами				
	6-е сут.	7-е сут.	8-е сут.	9-е сут.	10-е сут.
Контрольная группа (n = 56)	11 / 19,6	45 / 80,4	53 / 94,6	54 / 96,4	56 / 100
1-я опытная группа (n = 42)	2 / 4,7*	17 / 40,4*	25 / 59,2*	38 / 90,4	42 / 100
2-я опытная группа (n = 59)	0 / 0,0#	19 / 32,2*	27 / 46,6*	29 / 52,7**	59 / 100

Примечание. * — изменения статистически значимы относительно потомства контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$); # — изменения статистически значимы относительно потомства 1-й опытной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$)

Сроки открытия глаз у потомства самок с экспериментальными преэклампсиями

Группа животных	К-во / % крысят, открывших глаза				
	15-е сут.	16-е сут.	17-е сут.	18-е сут.	19-е сут.
Контрольная группа (n = 56)	11/19,6	28/50,0	43/76,8	53/94,6	56/100
1-я опытная группа (n = 43)	10/23,3	25/58,2	32/74,4	36/83,7	43/100
2-я опытная группа (n = 48)	3/6,3 [#]	27/56,3	36/75,0	45/93,7	48/100

Примечание. [#] — изменения статистически значимы относительно потомства 1-й опытной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

Сроки появления вестибулярной реакции в тесте «Переворачивание на плоскости» у потомства самок с экспериментальными преэклампсиями

Группа животных	К-во / % крысят, выполнивших тест					
	2-е сут.	3-и сут.	4-е сут.	5-е сут.	6-е сут.	7-е сут.
Контрольная группа (n = 56)	37/66,0	42/75,0	50/89,3	56/100		
1-я опытная группа (n = 46)	20/43,4*	24/53,1*	34/73,9	41/89,1*	45/97,8	46/100
2-я опытная группа (n = 60)	33/55,0	39/65,0	47/78,3	59/98,3	60/100	

Примечание. * — изменения статистически значимы относительно потомства контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

Последовательность прорезывания резцов у крысят всех 3-х групп представлена в табл. 1. В обеих опытных группах наблюдалось значительное отставание в появлении данного признака в сравнении с потомством самок контрольной группы, но наиболее выражено оно было во 2-й опытной группе.

Отставание в сроках открытия глаз было отмечено во 2-й опытной группе на 15-е сут., появление исследуемого показателя у 100% животных всех групп происходило на 19-е сут. (табл. 2).

Появление волосяного покрова у потомства крыс контрольной группы отмечено на 5-е сут., у крысят

опытных групп — на 6-е сут. На 4-е сут. в 1-й и 2-й опытных группах крысят с волосяным покровом было в 1,4 ($p < 0,05$) и 1,2 ($p < 0,05$) раза соответственно меньше, чем в контрольной (рис. 2).

У потомства самок с ЭП выявлена задержка в формировании вестибулярной функции и координации движений, на что указывают более поздние сроки выполнения теста «Переворачивание на плоскости» в 100% случаев по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

Отставание в выполнении тестов «Избегание обрыва», «Переворачивание в свободном падении» и «Отрицательный геотаксис» наблюдалось в обеих опытных группах, но наиболее выраженным оно было у крысят, рожденных самками с ЭП, воспроизведенной путем замены питьевой воды на 1,8%-ный раствор хлорида натрия (рис. 3, А, Б, В).

Задержка в формировании двигательных рефлексов потомства самок с ЭП, в большей мере выраженная у животных 2-й опытной группы, также отмечается в тестах «Поднимание головы и передних лап» и при формировании навыка ползания (табл. 4, 5).

Выраженное отставание в появлении опоры на задние конечности и подъеме всего тела также наблюдалось у крысят, рожденных самками с ЭП (табл. 6).

Для оценки мышечной силы у крысят на 1-е сут. после рождения было измерено время удержания на горизонтальной сетке, которое составило в контрольной группе крысят 125 ± 16 с, у потомства животных

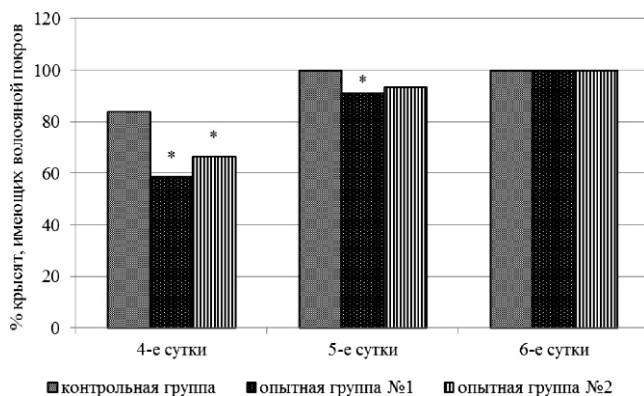


Рис. 2. Сроки появления волосяного покрова у крысят самок с экспериментальными преэклампсиями;

* — изменения статистически значимы относительно потомства контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

1-й опытной группы — 120 ± 13 с, у крысят 2-й опытной группы — 33 ± 4 с ($p < 0,05$, критерий Крускала—Уоллиса), что свидетельствует о снижении силы и тонуса мышц у потомства самок с осложненной беременностью.

Реакция на акустический стимул у 100% крысят контрольной и 1-й опытной группы отмечалась на 15-е сут., в то время как во 2-й опытной группе — на 18-е сут., но существенное отставание наблюдалось, начиная с 8-х сут. и в течение всего времени наблюдения (табл. 7).

Отмечалось значительное отставание в формировании обонятельной реакции у потомства крыс с обеими формами ЭП по сравнению с контрольной группой (табл. 8).

Таким образом, у потомства самок с ЭП обеих опытных групп наблюдается задержка физического развития, что проявляется в более поздних сроках отлипания ушной раковины, прорезывания резцов, открытия глаз, появления волосяного покрова. Также у крысят, рожденных самками с осложненной беременностью, отмечается отставание в формировании сенсорно-двигательных рефлексов и вестибулярной реакции. Это проявляется в более поздних сроках выполнения тестов «Переворачивание на плоскости», «Отрицательный геотаксис», «Переворачивание в свободном падении», «Избегание обрыва», «Мышечная сила», «Поднимание головы и передних лап», «Опора на задние конечности», «Обонятельная реакция», «Реакция на акустический стимул» по сравнению с потомством самок с неосложненной беременностью.

Преэклампсия, модулируемая путем замены питьевой воды на 1,8% раствор NaCl, оказывает более существенное негативное влияние на плод, чем АДМА-подобная преэклампсия, что выражается в большем отставании потомства этой группы в физическом развитии и сроках формирования сенсорно-двигательных рефлексов. Возможно, это связано с тем, что воздействие производилось в течение всего периода гестации, тогда как в случае с применением L-NAME только с 14-го дня беременности.

Задержка постнатального развития потомства самок с ЭП вероятно связано с нарушением микроциркуляции и повышенным тромбообразованием в плаценте, что ведет к сокращению маточно-плацентарного кровотока, недостаточному обеспечению плода кислородом и питательными веществами, а также неполному и несвоевременному удалению продуктов обмена [11]. Накопление метаболитов и гипоксия могут быть причиной нарушения внутриутробного развития плодов и даже их гибели, а также отклонений в постнатальном онтогенезе.

Выводы

1. У потомства, рожденного от крыс с экспериментальными преэклампсиями, наблюдается отставание физического развития, о чем свидетельствуют более поздние сроки прорезывания резцов и появления волосяного покрова по сравнению с контрольной группой.

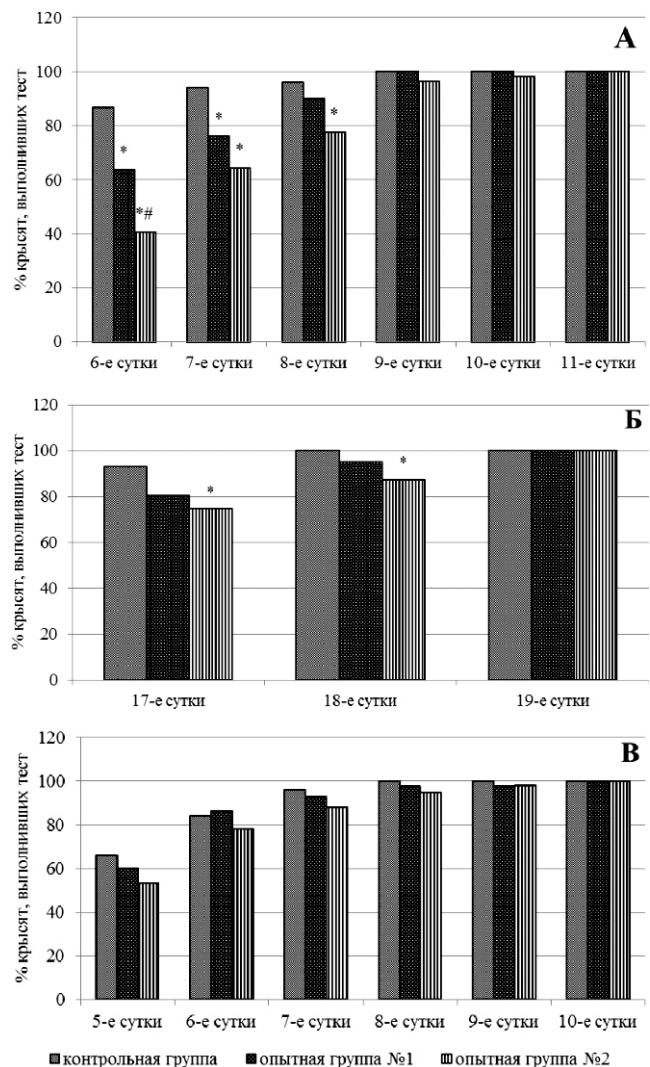


Рис. 3. Сроки формирования вестибулярной реакции у потомства крыс с экспериментальными преэклампсиями в тестах «Избегание обрыва» (А), «Переворачивание в свободном падении» (Б), «Отрицательный геотаксис» (В);

* — изменения статистически значимы относительно показателей потомства крыс контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$); # — изменения статистически значимы относительно потомства 1-й опытной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

Поднимание головы и передних лап у потомства крыс с экспериментальными преэклампсиями

Группа животных	К-во / % крысят, выполнивших тест						
	8-е сут.	9-е сут.	10-е сут.	11-е сут.	12-е сут.	13-е сут.	14-е сут.
Контрольная группа (n = 56)	41/73,2	48/85,7	54/96,4	56/100			
1-я опытная группа (n = 41)	18/43,9*	30/73,2	34/82,9*	37/90,2*	41/100		
2-я опытная группа (n = 52)	15/28,9*	29/55,7*	36/69,2*	42/80,7*	43/82,7*#	56/88,5*	52/100

Примечание. * — изменения статистически значимы относительно потомства контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$); # — изменения статистически значимы относительно потомства 1-й опытной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

Формирование навыков ползания у потомства крыс с экспериментальными преэклампсиями

Группа животных	К-во / % крысят, выполнивших тест										
	Сроки выполнения теста										
	9-е сут.	10-е сут.	11-е сут.	12-е сут.	13-е сут.	14-е сут.	15-е сут.	16-е сут.	17-е сут.	18-е сут.	19-е сут.
Контрольная группа (n = 56)	15/26,8	31/55,4	45/80,4	56/100							
1-я опытная группа (n = 41)	19/46,3	22/53,6	22/53,6*	26/63,4*	28/68,3*	37/90,2*	41/100				
2-я опытная группа (n = 52)	12/23,1#	15/28,8*#	22/42,3*	25/48,1*	28/53,8*	31/59,6*#	34/65,4*	40/76,9*#	47/90,4*	49/94,2	52/100

Примечание. * — изменения статистически значимы относительно потомства контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$); # — изменения статистически значимы относительно потомства 1-й опытной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

Формирование опоры на задние конечности у потомства крыс с экспериментальными преэклампсиями

Группа животных	К-во / % крысят, выполнивших тест								
	13-е сут.	14-е сут.	15-е сут.	16-е сут.	17-е сут.	18-е сут.	19-е сут.	20-е сут.	
Контрольная группа (n = 56)	5/8,9	20/35,7	39/69,6	52/92,8	100				
1-я опытная группа (n = 41)	0	6/14,6*	10/24,3*	27/65,8*	34/82,9*	34/82,9*	37/90,2*	41/100	
2-я опытная группа (n = 52)	0	1/1,9*#	13/25*	22/42,3*	38/73,1*	40/76,9*	46/88,5*	100	

Примечание. * — изменения статистически значимы относительно потомства контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$); # — изменения статистически значимы относительно потомства 1-й опытной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

Сроки формирования реакции на акустический стимул у потомства крыс с экспериментальными преэклампсиями

Группа животных	К-во / % крысят, выполнивших тест										
	Время формирования слуховой чувствительности										
	8-е сут.	9-е сут.	10-е сут.	11-е сут.	12-е сут.	13-е сут.	14-е сут.	15-е сут.	16-е сут.	17-е сут.	18-е сут.
Контрольная группа (n = 56)	14/25	37/66,1	40/71,4	41/73,2	43/76,8	48/85,7	50/89,3	56/100			
1-я опытная группа (n = 41)	3/7,3*	6/15*	11/26,8*	15/36,6*	25/60,9	27/65,8*	34/82,9	41/100			
2-я опытная группа (n = 52)	1/1,9*	4/7,6*	16/30,7*	26/50*	31/59,6	32/61,5*	34/65,3*	40/76,9*#	46/88,5*	46/88,5*	52/100

Примечание. * — изменения статистически значимы относительно потомства контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$); # — изменения статистически значимы относительно потомства 1-й опытной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

Сроки формирования обонятельной реакции у потомства крыс с экспериментальными преэклампсиями

Группа животных	К-во / % крысят, выполнивших тест							
	10-е сут.	11-е сут.	12-е сут.	13-е сут.	14-е сут.	15-е сут.	16-е сут.	17-е сут.
Контрольная группа (n = 56)	27/48,2	40/71,4	49/87,5	52/92,86	52/92,86	54/96,43	56/100	
1-я опытная группа (n = 41)	6/14,6*	14/34,2*	22/53,7*	33/80,5	35/85,4	40/97,6	40/97,6	41/100
2-я опытная группа (n = 52)	14/26,9*	21/40,4*	29/55,8*	38/73,1*	38/73,1*	42/80,1*	43/82,7*	52/100

Примечание. * — изменения статистически значимы относительно потомства контрольной группы по точному критерию Фишера ($p < 0,05$).

2. Выявлена задержка формирования сенсорно-двигательных рефлексов у потомства самок с ЭП по сравнению с крысятами контрольной группы, на что указывают более поздние сроки выполнения тестов: «Переворачивание на плоскости», «Отрицательный геотаксис», «Избегание обрыва», «Переворачивание в свободном падении», «Реакция на акустический стимул», «Обоняние», «Поднимание головы и передних лап», «Опора на задние конечности», «Мышечная сила».

3. Наиболее выраженная задержка постнатального развития наблюдается у потомства крыс с ЭП, вызванной заменой питьевой воды на 1,8%-ный раствор NaCl с 1-го дня гестации по сравнению с ADMA-подобной преэклампсией.

References

1. Sibai B., Dekker G., Kupferminc M. Pre-eclampsia. *The Lancet*. 2005; 365 (9461): 785-99.
2. Miettola S., Hovi P., Andersson S., Strang-Karlsson S., Pouta A., Laivuori H., et al. Maternal preeclampsia and bone mineral density of the adult. *Am J Obstetrics and Gynecology*. 2013; 209 (5): 1519-22.
3. Ogland B., Nilsen S.T., Forman M.R., Vatten L.J. Pubertal development in daughters of women with pre-eclampsia. *Archives of disease in childhood*. 2011; 7 (96(8)): 740-3.
4. Gureev V.V., Aljohin S.A., Dolzhikov A.A., Mostovoj A.S. Correction ADMA-like preeclampsia in the experiment. *Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*. 2012; 1: 14-9. (in Russian)
5. Pokrovskij M.V., Filippenko N.G., Korokin M.V., Gureev V.V., Pokrovskaja T.G., Barsuk A.A. et al. Realities and perspectives of pharmacological correction «ADMA-eNOS»-associated pathways in preeclampsia. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2010; 6(6): 882-7. (in Russian)
6. Pokrovskij M.V., Kochkarov V.I., Pokrovskaja T.G., Gladchenko M.P., Artjushkova E.B., Pashin E.N. et al. The methodical approach for quantitative evaluation of the endothelial dysfunction in L-NAME-induced model of nitric oxide deficiency in experiment. *Kubanskiy nauchno-medicinskiy vestnik*. 2006; 10: 72-7. (in Russian)
7. Ribeiro M.O., Antunes E., De-Nucci G., Lovisolo S.M., Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992; 20: 298-303.
8. Beausejour A., Bibeau K., Lavoie J.C. Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia. *Placenta*. 2007; 28 (1): 52-8.
9. Durnev A.D., Smol'nikova N.M., Skosyreva A.M., Nemova E.P., Solomina A.S., Shrede O.V. et al. Guidelines for the study of reproductive toxicity of drugs. In book.: Mironov A.N., ed. *Guidelines for pre-clinical studies of drugs [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]* P.1. Moscow: Grif i K; 2012; 80-94. (in Russian)
10. Agafonov A.A., Piotrovskij V.K. Program M-INR assess systemic pharmacokinetic parameters by model-independent method of statistical moments. *Khimiko-farmatsevticheskij zhurnal*. 1991; 10: 16. (in Russian)
11. Koval' S.B., Kovalenko T.N., Seredenko M.M. Intratrombotsitarnye changes in pregnancies complicated by EPH-preeclampsia. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2003; LII (1): 76-9. (in Russian)

Сведения об авторах:

Тюренок Иван Николаевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, зав. каф. фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ

Лашенцова Людмила Ивановна, науч. сотр. лаб. фармакологии сердечно-сосудистых средств «НИИ фармакологии» ВолгГМУ

Жакупова Гульнара Александровна, канд. пед. наук, докторант каф. фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ

Лебедева Светлана Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. синтеза противовирусных средств «НИИ фармакологии» ВолгГМУ, e-mail: vnperfilova@mail.ru

Уракова М.А., Брындина И.Г.

Водный баланс легких и оксид азота крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», 426034, г.Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281

Цель исследования — изучение водного баланса легких и содержания NO в крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва. **Методика.** Опыты проведены на 47 половозрелых (16-недельных) крысах-самцах массой (220—280 г). Для моделирования экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) крысам подкожно вводили энцефалитогенную смесь в полном адьюванте Фрейнда (0,2 мл; содержание убитых микобактерий туберкулеза — 5 мг/мл) из расчета 100 мг гомогената гомологичного спинного мозга на одно животное. Капсаициновую блокаду осуществляли путем двусторонней аппликации 50 мкМ капсаицина («Sigma») на шейную часть блуждающих нервов. Животные были разделены на 4 группы: интактные — контроль 1; модель ЭАЭ; капсаицин на блуждающий нерв + модель ЭАЭ; выделение блуждающего нерва без последующего наложения капсаицина + модель ЭАЭ — контроль 2. Определяли содержание оксида азота в плазме крови, белка в бронхо-альвеолярных смывах, параметры водного баланса легких — количество общей, экстра- и интраваскулярной жидкости и кровенаполнение легких, учитывая содержание гемоглобина крови и легочной ткани, определяемых гемиглобинцианидным методом. **Результаты.** Установлено, что ЭАЭ сопровождается увеличением количества общей, экстраваскулярной жидкости (ЭВЖ) и кровенаполнения легких на фоне повышения содержания оксида азота в артериальной (NO_{арт}) и венозной (NO_{вен}) крови. При ЭАЭ и его сочетании с билатеральной капсаициновой блокадой блуждающего нерва выявлена сильная отрицательная корреляция между коэффициентом NO_{арт} / NO_{вен} и количеством ЭВЖ. Блокада капсаицин-чувствительных афферентов вагуса нормализует нарушенный при ЭАЭ водный баланс легких и восстанавливает уровень оксида азота в плазме крови. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют об участии капсаицин-чувствительных афферентов блуждающего нерва с вовлечением нитроксидергических механизмов в развитии гипергидратации легких при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

Ключевые слова: водный баланс легких; оксид азота; капсаицин; блуждающий нерв; экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

Для корреспонденции: Уракова Мария Анатольевна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, e-mail: urakova-mariya@yandex.ru

Для цитирования: Уракова М.А., Брындина И.Г. Водный баланс легких и оксид азота крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 18—22.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.10.15

Urakova M.A., Bryndina I.G.

Water balance of lung and nitrogen oxide in blood at experimental autoimmune encephalomyelitis after capsaicin blockade of vagus nerve

State Budgetary Educational Institution Higher Professional Education «Izhevsk State Medical Academy», 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034, Russia

The purpose of research. To study the water balance of lung and NO level in blood in experimental autoimmune encephalomyelitis combined with capsaicin blockade of vagus nerve. **Methods.** Experiments were conducted on 47 adult (16-week-old) male rats weighing 220—280 g. To simulate the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) rats were subcutaneously injected with encephalitogenic mixture in complete Freund's adjuvant (0.2 ml; the content of inactivated *Mycobacterium tuberculosis* was 5 mg/ml) at the rate of 100 mg of homologous spinal cord homogenate per animal. Capsaicin blockade was performed by bilateral application of 50 uM capsaicin («Sigma») on the neck portions of vagus nerves. The animals were divided into 4 groups: intact rats — control group1; rats with EAE; rats with capsaicin application

on vagus nerve + EAE; sham operated rats subjected to vagus nerves allocation without the subsequent capsaicin application + EAE — control group 2. The next parameters were detected: the content of nitric oxide in blood plasma; protein content in broncho-alveolar lavage fluid; lung water balance indices including the amount of total, extra- and intravascular fluid and blood supply of lungs, which were calculated based on wet and dry lung mass and the hemoglobin content in blood and lung tissue determined by hemiglobincyanide method. **Results.** It was found that EAE is accompanied by an increase of total fluid, extravascular fluid (EVF) and blood supply of lungs on the background of increasing content of nitric oxide in arterial (art) and venous (ven) blood. In EAE and its combination with bilateral capsaicin blockade of vagus nerve a strong negative correlation between the NO_{art} / NO_{ven} coefficient and EVF amount was found out. The blockade of capsaicin-sensitive vagal afferents normalized lung water balance impaired in EAE and restored the levels of nitric oxide in blood plasma. **Conclusion.** The obtained results suggest that capsaicin-sensitive vagal afferents with NO-ergic mechanisms involvement take part in the development of pulmonary hyperhydration during experimental autoimmune encephalomyelitis.

Keywords: water balance of the lungs; nitric oxide; capsaicin; the vagus nerve; experimental autoimmune encephalomyelitis.

For citation: Urakova M.A., Bryndina I.G. Water balance of lung and nitrogen oxide in blood at experimental autoimmune encephalomyelitis after capsaicin blockade of vagus nerve. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 18–22. (in Russ).

For correspondence: Mariya A. Urakova, Candidate of Medical Sciences, 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034, Russian Federation, e-mail: urakova-mariya@yandex.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 21.10.2015

Введение

К настоящему времени экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) является общепризнанной моделью для изучения особенностей патогенеза рассеянного склероза в ходе фундаментальных исследований. Различная локализация формирующихся очагов демиелинизации в белом веществе головного и спинного мозга объясняет многообразие клинических проявлений рассеянного склероза, а несостоятельность иммунорегуляторных механизмов, обеспечивающих супрессию аутоиммунного ответа в норме, приводит к прогрессированию заболевания. Среди различных осложнений этой аутоиммунной патологии можно выделить изменения дыхательной системы, характеризующиеся снижением жизненной емкости легких и нарушением газового состава крови [1]. Установлено наличие легочной дисфункции при данном заболевании даже в отсутствие клинической манифестации респираторных синдромов [2].

В условиях формирования патологических процессов, в том числе в дыхательной системе, большое значение приобретает изменение местных регулирующих влияний. Так, установлена важная роль NO в развитии синдрома острого повреждения легких [3]. Вместе с тем, при рассмотрении периферических механизмов регуляции легочных функций обращает на себя внимание «локальная эффекторная функция» афферентов блуждающего нерва [4]. Избирательное влияние на чувствительные тонкие немиелинизированные С-волокна n. vagus оказывает капсаицин. Данный нейро-

токсин вызывает дозозависимый эффект, проявляющийся кратковременным возбуждением с последующей десенситизацией и деструкцией терминалей афферентов [4].

Цель работы — изучение параметров водного баланса легких и содержания NO в крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва.

Методика

Экспериментальные исследования проведены на 47 половозрелых (16-недельных) крысах-самцах массой 220—280 г. Опыты проводились с соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. ЭАЭ индуцировали у крыс (n = 15) путем подкожной инъекции энцефалитогенной смеси в полном адьюванте Фрейнда (0,2 мл; содержание убитых микобактерий туберкулеза — 5 мг/мл) из расчета 100 мг гомогената гомологичного спинного мозга на 1 животное [5]. Контролем служили ложнопереоперированные крысы, которым осуществляли операционный доступ к блуждающим нервам, без их последующего выделения (n = 7) и интактные животные (n = 15). Остальным крысам (n = 10) за 5—7 сут. до моделирования ЭАЭ осуществляли двустороннюю аппликацию 50 мкМ капсаицина («Sigma») на шейную часть блуждающих нервов [6, 7]. Неврологический статус животных оценивали (табл. 1) по выраженности и распространенно-

сти неврологической симптоматики: регистрировали время появления клинических признаков заболевания, его продолжительность и тяжесть, которую оценивали в баллах по клиническому индексу — КИ [5]. КИ спустя 3 недели у 90% животных соответствовал 3—4 баллам.

Таблица 1
Клинический индекс (КИ) животных с ЭАЭ

Клинические симптомы	Количество баллов
Отсутствие клинических симптомов	0
Частичный паралич хвоста	0,5
Полный паралич хвоста	1
Мягкий паразетоз	2
Умеренный паразетоз	3
Полный паралич задних ног или тяжелая атаксия	4
Полный паралич задних ног и недержание мочи	5
Тетраплегия	5,5
Летальный исход	6

Животных выводили из эксперимента спустя 3 нед. путем декапитации под этаминаловым наркозом (30 мг/кг), предварительно накладывали зажим на трахею для предотвращения попадания крови в дыхательные пути. У крыс извлекали легкие и путем трехкратного лаважа 0,9% раствором NaCl получали бронхо-альвеолярные смывы (БАС), в которых определяли содержание белка биуретовым способом («Витал»). В эти же сроки измеряли содержание гемоглобина в крови и легочной ткани гемиглобинцианидным методом при помощи наборов «Био-Латест» («Erba Lachema», Чехия). На основании полученных данных, а также массы сердца, влажных и высушенных легких рассчитывали количество общей, экстра-, интраваскулярной жидкости и кровенаполнение легких [8]. Количество оксида азота в венозной (NO_{вен}) и артериальной (NO_{арт}) крови оценивали по методике Метельской В.А. [9]. Рассчитывали показатель NO_{арт}/NO_{вен}.

Статистическая значимость отличий изучаемых параметров оценивали с помощью U-критерия Манна—Уитни. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного (25-й и 75-й процентиля размаха). Различия выборок считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Обработку статистических данных осуществляли с помощью программного обеспечения «SPSS 22».

Результаты и обсуждение

В ходе исследований установлено увеличение общего количества жидкости легких с 105,45[86,07;115,83]% у интактных животных до 133,33[117,65;160,00]% у крыс с ЭАЭ ($p < 0,05$). При этом происходило повышение экстраваскулярного сектора с 93,51[76,90;104,49]% в контроле до 118,08 [104,34; 146,69]% при аутоиммунной патологии ($p < 0,05$). Количество белка в БАС возрастало с 0,41[0,40;0,42] г/л у контрольных животных до 0,44[0,43;0,46] г/л при ЭАЭ ($p < 0,05$). Кровенаполнение легких увеличивалось с 11,93[9,82;12,94]% в контроле до 16,33[16,04;18,02]% у животных с аутоиммунной патологией ($p < 0,05$). Выявлено, что изменения у ложнопериоперированных животных не отличались от данных интактных крыс. Так как для рассеянного склероза характерно разнообразие поражений структур головного мозга, среди которых часто встречаются очаги, локализованные в гипоталамусе [10], можно предположить наличие дизрегуляторных гипоталамических влияний, обуславливающих гипергидратацию легких. С нашими предположениями согласуются данные, полученные при экспериментальных воздействиях на гипоталамус, которые характеризовались изменением водного баланса легких [11]. Повышенное содержание белка в БАС позволяет высказать предположение о наличии мембраногенного компонента в отеке легких, выявленном при ЭАЭ.

У крыс с ЭАЭ в сочетании с капсаициновой блокадой блуждающего нерва наблюдалось нивелирование изменений водного баланса легких, выявленных у крыс без дополнительного воздействия. Происходило снижение количества общей и экстраваскулярной жидкости легких по сравнению с аутоиммунной патологией головного мозга (до 111,11[108,57;114,18]% и 100,15[98;103,33]% соответственно, $p < 0,05$). Содержание белка в БАС при ЭАЭ в условиях дополнительного капсаицинового воздействия уменьшалось до 0,41[0,40;0,42] г/л и не отличалось от контрольных значений. Легочное кровенаполнение у крыс с аутоиммунной патологией в условиях капсаициновой блокады составляло 12,93[12,24;13,21]% и было статистически значимо ниже, чем у животных без воздействия на *p. vagus*. Известно, что капсаицин, относящийся к ваниллоидам, в концентрации 50 мкМ оказывает нейротоксическое действие на С-афференты терминалей блуждающего нерва, приводящее к прекращению секреции из них нейропептидов (субстанции Р, кальцитонин ген родственного пептида, нейрокина А) [4, 7]. По-видимому, нормализация водного баланса легких, наблюдающаяся при дополнительной аппликации капсаицина на блуждающий нерв, объясняется исключением эффекторных влияний афферентов *p. vagus*, в том числе за счет прекращения локального выделе-

Содержание оксида азота в крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите и двусторонней капсаициновой блокаде блуждающих нервов

	Контроль	ЭАЭ	ЭАЭ + аппликация капсаицина на n. vagus
NO арт, мкмоль/л	49,50 [45,00;52,00]	63,85 [63,15;64] *	50,00 [49,55;50,65] #
NO вен, мкмоль/л	33,00 [29,00;36,00]	59,40 [58,65;59,80] *	34,30 [33,90;34,80] #
NO арт/ NO вен	1,5 [1,25;1,79]	1,07 [1,06;1,08]*	1,47 [1,43;1,48] #

Примечание. * — статистическая значимость различий по сравнению контролем; # — статистическая значимость различий по сравнению с ЭАЭ

ния субстанции P. Имеются сведения о том, что повышение секреции субстанции P, вызванное активацией C-волокон n. vagus, увеличивает экстравазацию плазмы в легочных сосудах [12]. Вместе с тем, механизмы влияния субстанции P на изменение сосудистой проницаемости остаются до конца не выясненными.

Изучение содержания оксида азота в условиях ЭАЭ выявило его повышение в артериальной и венозной крови и снижение коэффициента NO арт/NO вен по сравнению с контролем (табл. 2). Капсаициновая блокада блуждающего нерва устраняла изменения уровня оксида азота в крови и статистически значимое снижение коэффициента NO арт/NO вен (табл. 2).

В литературе последних лет оксид азота (NO) рассматривается как универсальный паракринный и аутокринный регулятор [13]. К настоящему времени выявлено три изоформы NO-синтазы (NOS), участвующих в биосинтезе NO — индуцибельная, нейрональная и эндотелиальная. Основной вклад в его образование в легких вносит эндотелиальная NOS, несмотря на то, что в легочном эндотелии представлены все 3 изоформы [14]. Продуцируемый в эндотелии легких NO играет важную роль в поддержании низкого тонуса сосудов малого круга кровообращения [15]. Высказано предположение, что NO или неизвестный трансмиттер, выделяемый при вагусной стимуляции, через секрецию NO регулирует проницаемость легочных сосудов [16].

Нами выявлена сильная отрицательная корреляция между коэффициентом NO арт/NO вен и количеством экстравазальной жидкости легких как при ЭАЭ ($r = 0,90$; $p < 0,05$), так и при аутоиммунной патологии с дополнительным капсаициновым воздействием ($r = 0,88$, $p < 0,05$). Можно предположить, что в повышении экстравазации плазмы через сосудистую стенку, наблюдаемом при капсаициновой блокаде высвобождения субстанции P из афферентов блуждающего нерва, принимают участие нитроксидергические механизмы. С нашими предположениями согласуются данные авторов, показавших, что увели-

чение проницаемости сосудов легких, вызванное стимуляцией C-волокон блуждающего нерва и сопровождающееся повышенной выработкой нейропептидов, снижается при введении L-NAME — ингибитора синтазы оксида азота [17]. С использованием количественной флуоресцентной микроскопии установлено увеличение коэффициента проницаемости сосудистой стенки для альбумина, связанное с выделением субстанции P и опосредованное выделением NO [18]. Указывается на нитроксидергический механизм действия субстанции P при раздражении ирритантных рецепторов легких, вызванном повышением экстравазации плазмы в паренхиму легких [19].

Таким образом, билатеральная капсаициновая блокада блуждающего нерва при аутоиммунном экспериментальном энцефаломиелите нормализует водный баланс легких и содержание оксида азота в плазме крови. Полученные результаты свидетельствуют об участии капсаицин-чувствительных афферентов блуждающего нерва с вовлечением нитроксидергических механизмов в развитии нейрогенного отека легких при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

References

1. Howard R.S., Wiles C.M., Hirsch N.P., Loh L., Spencer G.T., Newsom-Davis J. Respiratory involvement in multiple sclerosis. *Brain*. 1992; 115 (Pt 2): 479-94.
2. Altintas A., Demir T., Ikitimur H.D. Pulmonary function in multiple sclerosis without any respiratory complaints. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2007; 109 (3): 242-6.
3. Shumatova T.A., Shumatov V.B., Markelova E.V., Sukhoteplaya L.G. The role of nitric oxide and cytokines in the development of acute lung injury. *Vestnik intensivnoy terapii*. 2001; 1: 15-9. (in Russian)
4. Zolotarev V.A., Nozdrachev A.D. Capsaicin-sensitive fibers of the vagus. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova*. 2001; 87 (2): 182-204. (in Russian)
5. Li Z., Liu Wh., Han S., Peng B.W., Yin J., Wu Y.L. Selective inhibition of CCR7(-) effector memory T cell activation by a novel peptide targeting Kv1.3 channel in a rat experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Biol. Chem.* 2012; 287(35): 479-94.
6. Urakova M.A., Bryndina I.G. Surfactant and water balance of lung in intracerebral hemorrhage at conditions of va-

gus nerve capsaicin blockade. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova*. 2015; 101 (3): 308-15. (in Russian)

7. Gamse R., Petsche U., Lembeck F., Jancso G. Capsaicin applied to peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. *Brain Res*. 1982; 239(2): 447-62.

8. Bobrikov A.V., Serikov B.V. Lymphatic drainage and water balance in the lungs during mechanical ventilation with end-expiratory pressure. *Aktual'nye voprosy pul'monologii: Sb. nauchnykh trudov*. 1984; 55-8. (in Russian)

9. Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. Nitric oxide: role in the regulation of biological functions, methods of determining human blood. *Laboratornaya meditsina*. 2005; 7: 19-21. (in Russian)

10. Haider L., Simeonidou C., Steinberger G., Hametner S, Grigoriadis N, Deretzi G. Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2014; 85 (12): 1386-95.

11. Tel' L.Z., Lysenkov S.P. *Central nervous mechanisms of pulmonary edema: a monograph. [Tsentral'nye nervnye mekhanizmy oteka legkikh: monografiya]*. Alma-Ata, Kazakhstan; 1989. 236 p.

12. Delaunois A., Gustin P., Ansay M. Effects of capsaicin on the endothelial permeability in isolated and perfused rabbit lungs. *Fundam. Clin. Pharmacol*. 1993; 7(2): 81-91.

13. Motavkin P.A., Gel'tser B.I. *Clinical and experimental pathophysiology of lungs. [Klinicheskaya i ehksperimental'naya patofiziologiya legkih]*. Moscow, Nauka; 1998. (in Russian)

14. Voelkel N.F., Rounds Sh. *The pulmonary endothelium*. Wiley-Blackwell; 2009. 511p.

15. Kiely D.G., Lee A.F., Struthers A.D., Lipworth B.J. Nitric oxide: an important role in the maintenance of systemic and pulmonary vascular tone in man. *Br. J. Clin. pharmacol*. 1998; 46(3): 263-66.

16. Liu S.F., Kuo H.P., Sheppard M.N. Vagal-stimulation induces increased pulmonary vascular permeability in guinea-pig. *Amer. J. Respirat. and Crit. Care Med*. 1994; 149 (3): 744-50.

17. Kuo H.P., Liu S., Barnes P.J. The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol*. 1992; 221 (2-3): 385-88.

18. Nguyen L.S., Villablanca A.C., Rutledge J.C. Substance P increases microvascular permeability via nitric oxide-mediated convective pathways. *Amer. J. Physiology*. 1995; 268: 1060-68.

19. Joad J. P., Kott S. K., Bonham A. C. Nitric oxide contributes to substance P-induced increases in lung rapidly adapting receptor activity in guinea-pigs. *Journal of Physiology*. 1997; 503 (3): 635-43.

Сведения об авторах:

Брындина Ирина Георгиевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии; e-mail: i_bryndina@mail.ru

Елистратова И.В.¹, Иванченко О.Б.², Гречко А.В.³, Морозов С.Г.⁴

Анализ экспрессии шаперонов DNAJB6/MRJ семейства HSP40 в клетках крови больных атопическим дерматитом при разных стадиях заболевания

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

² — ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого», институт «Торгово-экономический университет», 194021, Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, д. 50

³ — ФГБНУ «Госпиталь для incurable больных — Научный лечебно-реабилитационный центр», 109240, Москва, ул. Солянка, д. 14, стр. 3

⁴ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Целью работы было сравнение экспрессии белков теплового шока DNAJB6/MRJ у больных атопическим дерматитом на разных стадиях заболевания с показателями здоровых доноров. Тяжесть состояния при АД определяли по индексу SCORAD. **Методы.** Клетки крови разделяли на градиенте плотности Перколл, окрашивали антителами к DNAJB6/MRJ и анализировали на проточном цитометре. Бактериальную контаминацию кожи определяли методом ПЦР в реальном времени. Статистический анализ проводили по программе ANOVA. **Результаты.** Во всех образцах клеток крови, полученных от больных атопическим дерматитом, экспрессия белка DNAJB6/MRJ была выше по сравнению со здоровыми донорами. Наиболее выраженная интенсивность флуоресценции этого белка была в нейтрофилах по сравнению с лимфоцитами. Наиболее высокий уровень экспрессии DNAJB6/MRJ выявлен в острой стадии АД у наиболее тяжелых больных (по индексу SCORAD). В лимфоцитах экспрессия белка DNAJB6/MRJ была максимальной при подостром течении АД, а также имела тенденцию к повышению при верифицированной бактериальной контаминации кожи. **Выводы.** В нейтрофилах и лимфоцитах больных атопическим дерматитом повышена экспрессия внутриклеточного белка DNAJB6/MRJ семейства HSP40 по сравнению со здоровыми донорами. Максимальный уровень экспрессии DNAJB6/MRJ регистрируется в острой фазе атопического дерматита при наиболее тяжелом течении и постепенно снижается при хроническом течении заболевания.

Ключевые слова: атопический дерматит, HSP40, DNAJB6/MRJ, нейтрофилы, лимфоциты

Для корреспонденции: Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. лаб. общей и перинатальной нейрориммунопатологии, врио директора ФГБНУ НИИОПП, e-mail: biopharm@list.ru

Для цитирования: Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г. Анализ экспрессии шаперонов DNAJB6/MRJ семейства HSP40 в клетках крови больных атопическим дерматитом при разных стадиях заболевания. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 23–30.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.03.2016

Elistratova I.V.¹, Ivanchenko O.B.², Grechko A.V.³, Morozov S.G.⁴

Heat shock protein HSP40 family chaperone DNAJB6/MRJ expression analysis in blood cells obtained from patients with atopic dermatitis in different phases

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

² — The Peter the Great St.-Petersburg's Polytechnic University, 194021, St. Petersburg, 50 Novorossiyskaya St.

³ — Federal State Budgetary Scientific Institution «Hospital for Incurable Patients — the Scientific Medical and Rehabilitation Center, 109240, Moscow, 14 — 3 Solyanka St.

⁴ — Scientific research institute of the general pathology and pathophysiology, 125315, Moscow, 8 Baltiyskaya St.

Heat shock protein HSP40 family molecular chaperone DNAJB6/MRJ expression has been analyzed in blood cells of patients with atopic dermatitis compared with healthy donors. Severity of disease was estimated according index SCORAD. **Methods.** Peripheral blood cells were separated using Percoll density gradient. Purified neutrophils and lymphocytes have been stained with antibodies to the heat shock protein DNAJB6/MRJ. Cells were analyzed using flow cytometry. Real time PCR method has been used to verify the bacterial contamination of the skin of patients with atopic dermatitis. Statisti-

cal analysis was performed by ANOVA. **Results.** Expression of DNAJB6/MRJ protein has been found to be elevated in all samples of cells obtained from patients with atopic dermatitis. The highest level of the DNAJB6/MRJ protein expression was shown in neutrophils at the acute phase of severe atopic dermatitis. DNAJB6/MRJ protein expression in lymphocytes of patients with atopic patients was less extensive compared with neutrophil level and was shown to be higher at subacute phase of disease. The DNAJB6/MRJ protein expression was found to be statistically significant higher in lymphocytes from atopic patients compared with healthy donors. The bacterial contamination of skin (verified by PCR) was shown to influence the DNAJB6/MRJ protein level in lymphocytes of atopic dermatitis patients. **Conclusions.** Expression of the heat shock protein DNAJB6/MRJ was elevated in neutrophils and lymphocytes of patients with atopic dermatitis compared with healthy donors. The highest level of the DNAJB6/MRJ protein was found to be in neutrophils at acute phase of severe atopic dermatitis and gradually decline as continue to the disease.

Key words: atopic dermatitis, HSP40, DNAJB6/MRJ, neutrophils, lymphocytes

For citation: Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Grechko A.V., Morozov S.G. Heat shock protein HSP40 family chaperone DNAJB6/MRJ expression analysis in blood cells obtained from patients with atopic dermatitis in different phases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 23–30. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 20.03.2016

Введение

Патогенез атопического дерматита (АД) связан с многочисленными изменениями на уровне генов, белков, сигнальных путей, субклеточных структур, что обуславливает нарушение функциональной активности кожи и ряда систем организма. Заболеваемость атопическим дерматитом возрастает, при этом всё чаще регистрируются его тяжелые формы с редкими ремиссиями. Стресс играет значительную роль в обострении АД. Молекулярные механизмы стресса включают в себя функционирование системы молекулярных шаперонов — белков теплового шока (Heat Shock Proteins), которые контролируют качество внутриклеточных белков, предотвращают их агрегацию, способствуют фолдингу белков в нативную конформацию. В настоящее время имеется очень ограниченный список публикаций, касающихся роли HSP в патогенезе АД. Мы впервые обнаружили повышение экспрессии белков HSP90 у больных АД [1]. Также нами впервые установлена роль митохондриальных шаперонов DNAJC15 и DNAJA3 семейства HSP40 в патогенезе АД [2,3]. Данное исследование посвящено другому шаперону этого семейства — DANJB6 (также называется MRJ — mammalian relative of DnaJ), который, в отличие от первых двух, локализуется в цитозоле или в ядре, что обуславливает специфичность выполняемых им функций.

У человека обнаружено 49 белков семейства HSP40, включая 14 членов подсемейства В, в которое входит DNAJB6 [4]. Белки HSP40 (или DNAJ по названию консервативного J домена, который присутствует во всех белках этого семейства) классифи-

цируются на основании структурной организации [5]. Белки Hsp40 подсемейств А и В — гомодимеры, связывающие полипептид в щели между двумя мономерами за счет гидрофобных взаимодействий. Структурные различия между белками определяют специфичность к субстратам и различия в их внутриклеточной активности. Белки подсемейства А включают цинк-связывающий домен, а цитозольные белки подсемейства В имеют последовательность, распознающую мотив EEVD на С-конце белков HSP70, ко-шаперонами которых они являются [6].

Мутации в J-домене белков HSP40 (DNAJB2, DNAJB6, DNAJC5, DNAJC6, DNAJC13, DNAJC19, DNAJC29) приводят к заболеваниям человека, связанным в основном с центральной нервной системой [7].

Альтернативный сплайсинг гена *mrj* дает две изоформы белка — DNAJB6a (36 кДа, 326 а.к.о.) и DNAJB6b (26 кДа, 242 а.к.о.). DNAJB6a локализуется в ядре за счет наличия в структуре ядерно-локализирующего сигнала (NLS — nuclear localization sequence), а DNAJB6b — преимущественно в цитозоле. В ответ на стресс или гипоксию не наблюдается значительного повышения транскрипции гена *mrj*, но регистрируется быстрое повышение концентрации белка DNAJB6 в ядре за счет перемещения его малой изоформы в ядро, где DNAJB6b проявляет свойства, противоположные действию DNAJB6a, и работает как промотор пролиферации [8].

В лимфоцитах DNAJB6/MRJ может супрессировать клеточный цикл, так как негативно регулирует сигнальный путь с участием белка Slfn1 [9]. Ядерный

фактор активированных Т клеток (NFATc3 — Nuclear factor of activated T cells) сопряжен с шапероном DNAJB6/MRJ, который в ядре взаимодействует с гистон-деацетилазой II класса и ингибирует транскрипционную активность NFAT, в частности, снижает аффинность связывания NFATc3 с промотором гена TNF- α [10].

Сигнальные пути, сопряженные с DNAJB6/MRJ, включают в качестве вторичных мессенджеров циклин-зависимые киназы (cdk), а также гистон-деацетилазу (HDAC4), ингибирующую прохождение клеточного цикла [11].

В паре с HSP70 DNAJB6/MRJ блокирует NO-индуцированный апоптоз макрофагов путем ингибирования транслокации белка Bax к митохондриям [12].

DNAJB6/MRJ предотвращает агрегацию кератинов [13], регулирует обмен кератинов K8 и K18 — промежуточных филаментов эпителия. Как ко-шаперон HSP70 DNAJB6/MRJ специфически связывается с K18 и участвует в организации K8/K18 филаментов. [14]. Так как кератин подвергается интенсивной реорганизации при прохождении клеточного цикла, участие DNAJB6/MRJ в регуляции кератинов оказывает влияние на клеточный цикл кератиноцитов и эпителиальных клеток. В М-фазе клеточного цикла уровень белка DNAJB6/MRJ в клетке повышается, и он распределен по всей клетке, в интерфазе он локализуется в ядрышках [15].

Урокиназный тип рецептора активатора плазминогена (uPAR) регулирует адгезию клеток к витронектину, протеолиз в ECM, взаимодействие клеток с ECM, сигнальные пути. Ко-шаперон DNAJB6/MRJ специфически связывает uPAR и вместе с HSP70 формирует комплекс с uPAR, что повышает адгезию клеток (в т.ч. к эндотелию) и их миграцию [16]. DNAJB6/MRJ негативно регулирует сигнальные пути Wnt/-катенина (маркера эпителиально — мезенхимальных переходов) [17]. DNAJB6/MRJ участвует в самообновлении стволовых клеток нервной системы на ранних этапах развития [18], регулирует агрегацию белков и нейротоксичность при стрессе [11].

Цитозольные белки HSP40 подсемейства В выполняют функцию ко-шаперонов для HSP70. J-домен участвует в стимуляции N-концевого АТФ-азного домена HSP70, стабилизирует взаимодействие HSP70 с клиентскими белками за счёт конформационных изменений в пептид-связующем домене HSP70, который располагается между димерами HSP40, а С-концевая последовательность EEVD на HSP70 участвует в связывании Hsp40 и контролирует эффективность переноса полипептида с Hsp40 на Hsp70 [19].

Пары шаперонов HSP70/HSP40 I класса и HSP70/HSP40 II класса выполняют разные функции, но все регулируют фолдинг белков и препятствуют их агрегации. В цитозоле пара шаперонов HSP70/HSP40 II класса участвует в посттрансляционной транслокации вновь синтезированных предшественников белков и полипептидов через клеточные мембраны, в эндоплазматический ретикулум и в митохондрии [6].

Показано, что клетки разных организмов отвечают на термальный стресс по сходному сценарию для белков HSP40 и HSP70, которые, однако, имеют разную кинетику. HSP40 достигает максимума между 1 и 2 часом, после чего постепенно снижается. HSP70 повышается в 4 раза сильнее, чем HSP40, достигает пика между 2 и 3 часом и постепенно снижается [20].

Анализ экспрессии белков теплового шока в клетках даёт новую информацию о патогенезе атопического дерматита.

Цель исследования — изучение экспрессии белка DNAJB6/MRJ семейства HSP40 в клетках периферической крови больных атопическим дерматитом в разных стадиях.

Методика

Пациенты и доноры

В данном исследовании приняли участие 88 мужчин в возрасте от 18 до 36 лет, у которых диагностирован атопический дерматит (индекс SCORAD от 12 до 60) в острой (n = 28), подострой (n = 38) и хронической (n = 22) стадиях заболевания. Донорами были 36 здоровых мужчины в возрасте от 18 до 34 лет, которые обращались в медучреждение за справками.

Все пациенты и доноры подписывали форму информированного согласия. Критериями исключения пациентов из исследования были острые вирусные или бактериальные инфекции, системные аллергические или воспалительные заболевания, онкологические заболевания, соматическая патология, которая могла бы существенно изменить полученные результаты, а также состояние психического стресса.

Определение контаминации кожи патогенами

Взятие соскоба кожи проводили по правилам МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». Пробы брали с предплечья в участках без признаков воспаления. Наличие бактериальной или грибковой контаминации верифицировали методом ПЦР в реальном времени с парами праймеров, синтезированных на основании соответствующих олигонуклеотидов патогенов, известных из базы данных [21]. В работе

использовали методику, применяемую для клинических исследований [22, 23].

Работа с клетками крови

Кровь получали из локтевой вены в вакутайенерах с ЭДТА, освобождали от эритроцитов лизирующим буфером (Becton Dickinson), отмывали в фосфатном буфере (PBS). Очищенные популяции нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов крови выделяли на градиенте плотности Перколла. Изотонический раствор Перколла (90%) получали из 27 мл исходного Перколла и 3 мл 10-кратного фосфатного буфера, его использовали для получения остальных ступеней градиента плотностью 81%, 70%, 60% и 55%, которые соответствовали известной средней плотности клеток крови. Градиенты центрифугировали 20 мин при $t +22^{\circ}\text{C}$ и ускорении 500g. После центрифугирования на дне пробирки концентрировались эритроциты, нейтрофилы выделялись в интерфазе между слоями плотностью 81% и 70%; лимфоциты — между слоями 70% и 60%. После этого клетки отмывали, переводили в полную среду RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и инкубировали 2 ч при $+37^{\circ}\text{C}$ и 5% CO_2 для восстановления мета-

болизма. Для исследования рецепторов плазматической мембраны (CD16, CD32, CD3, CD4, CD8 и др.) клетки окрашивали антителами, затем фиксировали в 4% параформальдегиде.

Окраска клеток на белки теплового шока

Для исследования внутриклеточных белков клетки сначала фиксировали в 4% параформальдегиде с 0,001% Тритоном X-100, отмывали, а затем окрашивали кроличьими поликлональными антителами к белку теплового шока DNAJB6 (ab96539) (Abcam). Вторыми антителами были антикроличьи F(ab)2 фрагменты иммуноглобулинов, меченные FITC (длина волны возбуждения лазера — 493 нм, длина волны эмиссии — 528 нм). Для двойной окраски пары шаперонов HSP40/HSP70 клетки одновременно окрашивали мышинными моноклональными антителами к белку теплового шока HSP70 [EPR16892] (ab204691), конъюгированными с фикоэритрином (длина волны возбуждения лазера — 488 нм, длина волны эмиссии — 575 нм). Интенсивность флуоресценции измеряли на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson) по программе SimulSet. В каждом образце регистрировали 10 000 событий.

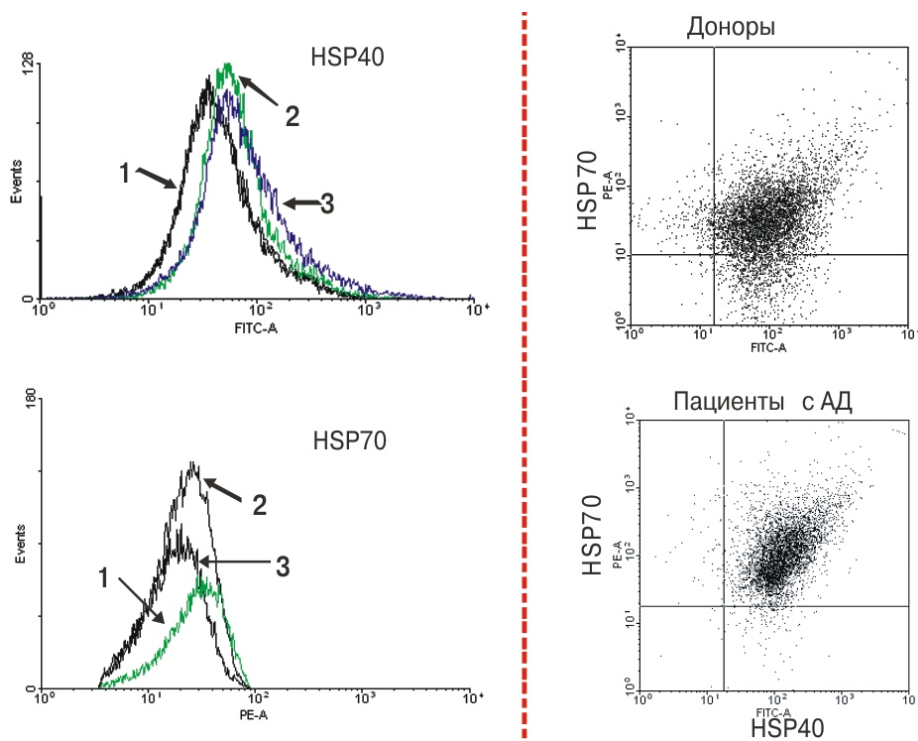


Рис. 1. Данные проточной цитометрии по двойной окраске на белки теплового шока HSP70 и HSP40 (DNAJB6/MRJ) нейтрофилов крови больных atopическим дерматитом и здоровых доноров.

Справа представлены данные проточной цитометрии по двойной окраске нейтрофилов периферической крови антителами к белкам теплового шока HSP40 (DNAJB6/MRJ) (канал FITC-A) и HSP70 (канал PE-A) здорового донора и больного atopическим дерматитом. Слева представлены гистограммы экспрессии белка HSP40 и белка HSP70 в нейтрофила: 1 — доноры, 2 — больные в острой фазе atopического дерматита, 3 — больные atopическим дерматитом в хронической стадии заболевания.

Статистический анализ

Полученные результаты анализировались по программе ANOVA. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, статистический анализ нескольких групп проводился с помощью непараметрического анализа методом множественного сравнения по критерию Ньюмена—Кейлса. Статистически значимым различие между группами считали $p \leq 0,05$.

Результаты

Анализ одновременной экспрессии белков теплового шока HSP40 (DNAJB6/MRJ) и HSP70 в нейтрофилах крови

На первом этапе работы выделенные на градиенте плотности нейтрофилы были окрашены на шаперон HSP70 и его ко-шаперон HSP40 (белок DNAJB6/MRJ), которые совместно регулируют множество внутриклеточных функций). Гейт нейтрофилов крови больных АД (рис. 1) перемещается вверх по оси ординат, что указывает на повышение интенсивности флуоресценции белка HSP70 в нейтрофилах больных по сравнению с донорами. Представленные гистограммы отражают уровень интенсивности флуоресценции обоих белков у доноров и больных АД: повышение уровня экспрессии HSP70 существенно более выражено по сравнению с повышением уровня HSP40, что вполне согласуется с кинетикой изменения этих белков, показанной для разных организмов [20]. Уровень флуоресценции обоих белков повышается у больных АД по сравнению с донорами, достигает максимума в острой фазе АД, затем постепенно снижается по мере продолжения течения заболевания.

Измерение экспрессии белков теплового шока DNAJB6/MRJ в нейтрофилах

Результаты измерения интенсивности флуоресценции белка DNAJB6/MRJ, отражающей уровень его экспрессии в нейтрофилах, выделенных из периферической крови, представлены на рис. 2: в острой фазе АД экспрессия DNAJB6/MRJ максимальна и постепенно снижается по мере пролонгирования течения заболевания, во всех случаях оставаясь статистически значимо выше показателей доноров.

В острой стадии АД экспрессия белка DNAJB6/MRJ напрямую зависит от тяжести состояния больного (рис. 3): наиболее высокий уровень регистрируется у самых тяжелых больных. Уровень экспрессии белка DNAJB6/MRJ у больных с средней и более выраженной степенью тяжести заболевания не выявил статистически значимых различий, тогда как между соответствующими показателями больных

с легким течением АД и показателями у больных с более тяжелыми формами имеются статистически значимые различия.

В зависимости от наличия ($n = 56$) или отсутствия ($n = 32$) верифицированной методом ПЦР бактериальной контаминации кожи больных АД статистиче-

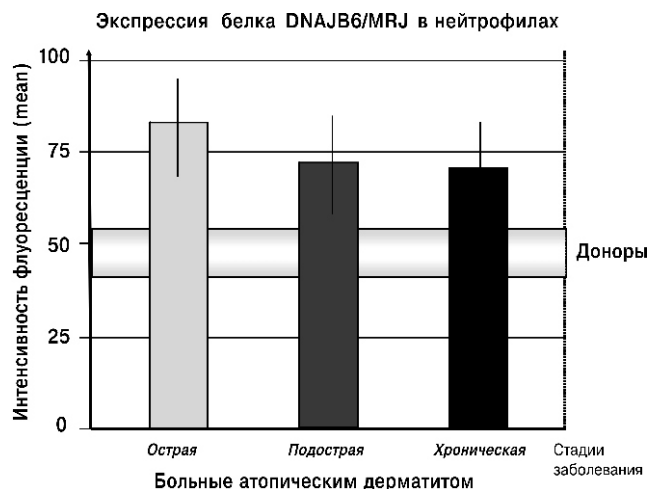


Рис. 2. Экспрессия белка DNAJB6/MRJ в нейтрофилах периферической крови больных атопическим дерматитом на разных стадиях заболевания.

Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJB6/MRJ в нейтрофилах крови больных атопическим дерматитом ($n = 88$) в острой ($n = 28$), подострой ($n = 38$) и хронической ($n = 22$) стадии заболевания. Все показатели больных статистически значимо выше ($p < 0,05$) показателей доноров ($n = 36$).

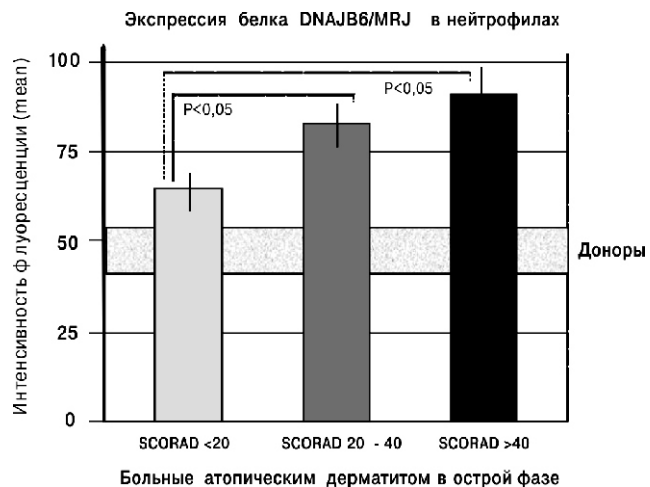


Рис. 3. Сравнение уровня экспрессии белка теплового шока DNAJB6/MRJ в нейтрофилах периферической крови здоровых доноров и больных атопическим дерматитом в острой фазе заболевания в зависимости от тяжести состояния.

Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (mean) (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJB6/MRJ в нейтрофилах периферической крови здоровых доноров ($n = 36$) и больных атопическим дерматитом ($n = 88$) с легким течением (SCORAD < 20, $n = 24$), средней степени тяжести (SCORAD 20–40, $n = 56$) и тяжелым (SCORAD >40, $n = 8$).

ски значимых различий в экспрессии белка DNAJB6/MRJ в нейтрофилах не обнаружено, но проявилась тенденция к повышению этого показателя у больных АД с верифицированным золотистым стафилококком.

Измерение экспрессии белков теплового шока DNAJB6/MRJ в лимфоцитах

Выделенные на градиенте плотности Перколла лимфоциты периферической крови были окрашены на белок DNAJB6/MRJ, интенсивность флуоресценции проанализирована в общем гейте лимфоцитов без разделения на популяции и субпопуляции. У всех больных АД экспрессия белка DNAJB6/MRJ статистически значимо выше по сравнению с донорами. В остром периоде АД экспрессия DNAJB6/MRJ статистически значимо выше по сравнению с данными больных в подострой и хронической стадии заболевания (рис. 4). В острой стадии АД экспрессия белка DNAJB6/MRJ в лимфоцитах была максимальной у больных средней степенью тяжести и минимальной у больных с легким течением АД (рис. 5). Статистически значимые различия в экспрессии белка DNAJB6/MRJ в лимфоцитах показаны между группами доноров и больных АД, а также между больными АД с легким течением и АД средней тяжести.

У больных АД с верифицированной методом ПЦР бактериальной контаминацией кожи ($n = 56$) (в частности, *Staphylococcus aureus*) имелась выраженная тенденция к повышению уровня экспрессии белка DNAJB6/MRJ в лимфоцитах крови по сравнению с показателями больных АД, у которых не выявлено бактериальной контаминации кожи ($n = 32$) (рис. 6). Однако статистически значимых различий по этим показателям выявлено не было.

Таким образом, установлено повышение экспрессии белка теплового шока DNAJB6/MRJ семейства HSP40 в клетках крови больных АД по сравнению со здоровыми донорами. Известно, что при хроническом воспалении уровень экспрессии HSP повышается, что обусловлено их участием в распознавании патологически изменённых белков, которые присутствуют в тканях при воспалении. Однако до сих пор в открытой печати не было данных по экспрессии белка DNAJB6/MRJ в нейтрофилах или лимфоцитах крови больных АД, результаты показаны впервые. Наиболее выраженная экспрессия белка обнаружена у больных в острой стадии АД, а также при более тяжелых формах заболевания. Выявленные особенности в экспрессии этого белка у больных АД указывают на определенный уровень адаптации к патологическому состоянию по мере продолжения течения заболевания.

Выводы

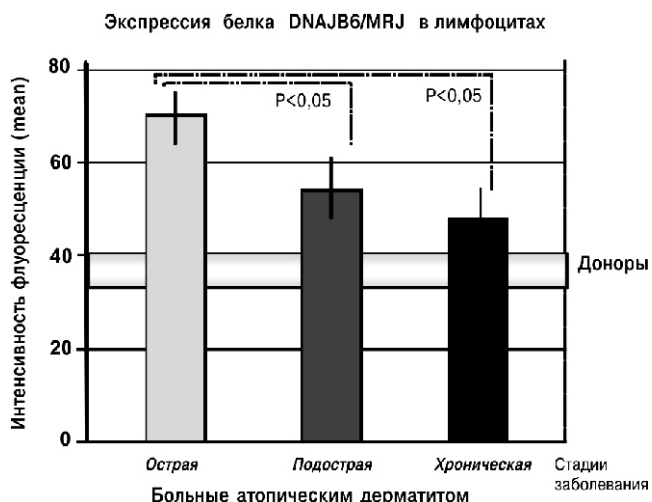


Рис. 4. Экспрессия белка DNAJB6/MRJ в лимфоцитах периферической крови больных atopическим дерматитом на разных стадиях заболевания.

Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJB6/MRJ в лимфоцитах крови больных atopическим дерматитом ($n = 88$) в острой ($n = 28$), подострой ($n = 38$) и хронической ($n = 22$) стадии заболевания. Все показатели больных статистически значимо выше ($p < 0,05$) показателей доноров ($n = 36$).

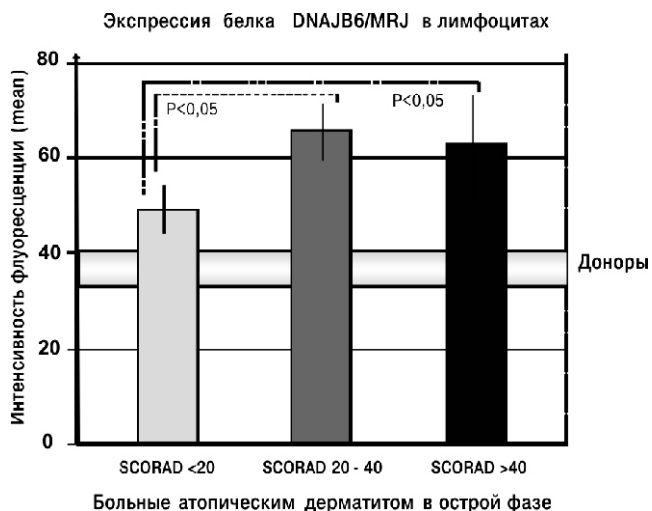


Рис. 5. Сравнение уровня экспрессии белка теплового шока DNAJB6/MRJ в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров и больных atopическим дерматитом в острой фазе заболевания в зависимости от тяжести состояния.

Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (mean) (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJB6/MRJ в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров ($n = 36$) и больных atopическим дерматитом ($n = 88$) легкого течения (SCORAD <20, $n = 24$), средней степени тяжести (SCORAD 20–40, $n = 56$) и тяжелого течения (SCORAD >40, $n = 8$).

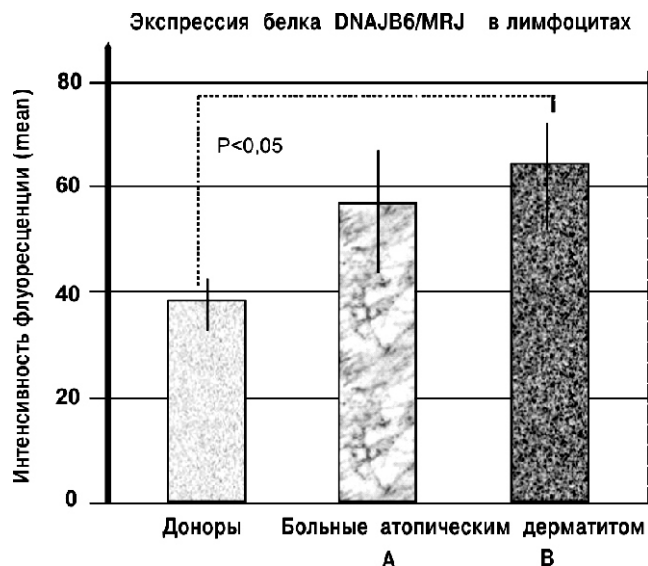


Рис. 6. Уровень экспрессии белка DNAB6/MRJ в лимфоцитах крови больных atopическим дерматитом в зависимости от бактериальной контаминации кожи.

Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJB6/MRJ в лимфоцитах здоровых доноров ($n = 36$) и больных atopическим дерматитом ($n = 88$) с верифицированной методом ПЦР бактериальной контаминацией кожи (В, $n = 56$) или без таковой (А, $n = 32$).

1. В нейтрофилах и лимфоцитах больных atopическим дерматитом повышена экспрессия внутриклеточного белка DNAJB6/MRJ семейства HSP40 по сравнению со здоровыми донорами.

2. Максимальный уровень экспрессии DNAJB6/MRJ регистрируется в острой фазе atopического дерматита и при наиболее тяжелом течении заболевания.

3. По мере пролонгирования стадии обострения уровень экспрессии белка DNAJB6/MRJ постепенно снижается.

References

- Elistratova I.V., Morozov S.G., Zakharova I.A. PAR-2 receptor expression on the peripheral blood neutrophils of atopic dermatitis patients and its association with heat shock proteins HSP90. *Russkiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney*. 2016; (1): 53-7. (in Russian)
- Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Grechko A.V., Morozov S.G. Mitochondrial chaperon DNAJC15/MCJ level measuring in the blood cells of patients with atopic dermatitis of moderate severity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; 60(2): 4-12. (in Russian)
- Elistratova I.V., Grechko A.V., Morozov S.G. Molecular chaperon DNAJA3/Tid1 expression in the peripheral blood lymphocytes obtained from patients with atopic dermatitis. *Patogenez*. 2015; (1): (in Russian)

4. HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee), Available at www.genenames.org/genefamilies/HSP#HSP40.

5. Feng P., Lin H., Chen W., Zuo Y. Predicting the types of J-proteins using clustered amino acids. *Biomed. Res. Int*. 2014; 2014: 935719.

6. Li J., Qian X., Sha B. Heat shock protein 40: Structural studies and their functional implications. *Protein Pept. Lett*. 2009; 16(6): 606-12.

7. Koutras C., Braun J. J protein mutations and resulting proteostasis collapse. *Front. Cell. Neurosci*. 2014; 8(8): 191-8.

8. Andrews J., Sykora L., Letostak T., Menezes M., Mitra A., Barik S. et al. Cellular stress stimulates nuclear localization signal (NLS) independent nuclear transport of MRJ. *Exp. Cell. Res*. 2012; 318(10): 1086-93.

9. Zhang Y., Yang Z., Cao Y., Zhang S., Li H., Ding Y., Liu X. The Hsp40 family chaperon protein DnaJB6 enhances Schlafen1 nuclear localization which is critical for promotion of cell-cycle arrest in T-cells. *Biochem. J*. 2008; 413(2): 239-50.

10. Dai Y., Xu J., Molkenin J. The DnaJ-related factor Mrj interacts with nuclear factor of activated T cells c3 and mediates transcriptional repression through class II histone deacetylase recruitment. *Mol. Cell. Biol*. 2005; 25(22): 9936-48.

11. Smith C., D'Mello S. Cell and context-dependent effects of the heat shock protein DNAJB6 on neuronal survival. *Mol. Neurobiol*. 2015; 52(2): 24-35.

12. Gotoh T., Terada K., Oyadomari S., Mori M. Hsp70-DNAJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP — induced apoptosis by inhibiting translocation of bax to mitochondria. *Cell Death Differentiation*. 2004; 11(4): 390-402.

13. Watson E., Geary-Joo C., Hughes M., Cross J. The Mrj co-chaperone mediates keratin turnover and prevents the formation of toxic inclusion bodies in trophoblast cells of the placenta. *Development*. 2007; 134(9): 1809-17.

14. Izawa I., Nishizawa M., Ohtakara K., Ohtsuka K., Inada H., Inagaki M. Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 family protein, as a keratin 8/18 filament regulatory protein. *J. Biol. Chem*. 2000; 275(44): 34521-7.

15. Dey S., Banerjee P., Saha P. Cell cycle specific expression and nucleolar localization of human J-domain containing co-chaperone Mrj. *Mol. Cell. Biochem*. 2009; 322(1-2): 137-42.

16. Lin Y., Peng N., Zhuang H., Zhang D., Wang Y., Hua Z. Heat shock proteins HSP70 and MRJ cooperatively regulate cell adhesion and migration through urokinase receptor. *BMC Cancer*. 2014; 14: 639-53.

17. Mitra A., Menezes M., Shevde L., Samant R. DNAJB6 induces degradation of beta-catenin and causes partial reversal of mesenchymal phenotype. *J. Biol. Chem*. 2010; 285(32): 24686-94.

18. Watson E., Mattar P., Schuurmans C., Cross J. Neural stem cell self-renewal requires the Mrj co-chaperone. *Dev. Dyn*. 2009; 238(10): 2564-74.

19. Yu H., Ziegelhoffer T., Craig E. Functionality of Class A and Class B J-protein co-chaperones with Hsp70. *FEBS Letters*. 2015; 589(19 Pt B): 2825-30.

20. Foster N., Lukowiak K., Henry T. Time-related expression profiles for heat shock protein gene transcripts (HSP40, HSP70) in the central nervous system of *Lymanaea stagnalis* exposed to thermal stress. *Commun. Integr. Biol*. 2015; 8(3): e1040954.

21. GenBank database, Available at <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>

22. White T., Bruns S., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand J., Sninsky J., White T., eds. PCR.

23. Buitrago M., Aguado J., Ballen A., Bernal-Martinez L., Prieto M., Garcia-Reyne A. et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease, *Clin. Microbiol. Infect.* 2013, 19(6): E271-E277.

Сведения об авторах:

Елистратова Ирина Владимировна, врач дерматовенеролог отделения дерматовенерологии ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России»

Иванченко Ольга Борисовна, канд. биол. наук, доцент каф. химии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого», институт «Торгово-экономический университет»

Гречко Андрей Вячеславович, доктор мед. наук, проф. РАН, директор ФГБНУ «Госпиталь для incurable больных — Научный лечебно-реабилитационный центр»

Тимофеева М.Р., Лукина С.А.

Сурфактантная система и водный баланс легких при моделировании нейродегенерации и очага патологической активности в черной субстанции

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, 426034, г.Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281

В работе проведен сравнительный анализ метаболизма сурфактанта и водного баланса легких при моделировании нейродегенерации и формировании очага патологической активности в черной субстанции мозга. **Методика.** Опыты выполнены на нелинейных крысах-самцах, в том числе контрольных, ложнопериорированных, с односторонним стереотаксическим введением нейротоксина 6-гидроксиамина (Sigma) в компактную часть черной субстанции и имплантацией нанопорошка металлического кобальта (Berlin) в ретикулярную часть структуры. Комплексные исследования включали определение фракций фосфолипидов сурфактанта тонкослойной хроматографией, общих фосфолипидов и холестерина в бронхоальвеолярных смывах и их поверхностно-активных свойств методом Вильгельми, активности фосфолипазы, интенсивности ПОЛ по содержанию ТБК-активных продуктов в легочной ткани, оценку водного баланса гравиметрическим методом. **Результаты.** Установлено, что интранигральное введение нейротоксина и имплантация кобальта в структуру мозга вызывали ухудшение поверхностной активности выстилающего комплекса альвеол на фоне дисбаланса фракционного состава липидов сурфактанта с разнонаправленными изменениями количества фосфолипидов и степени гидратации легких. Индуцирование очага патологической активности в черной субстанции сопровождалось повышением уровня альвеолярных фосфолипидов за счет лизофосфатидилхолина, сфингомиелина, фосфатидилэтанолamina, интенсификацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) в легочной ткани и органной гипергидратацией. Моделирование нейродегенерации, характеризующейся уменьшением общих фосфолипидов, фосфатидилхолина и накоплением лизофосфатидилхолина в условиях активации фосфолипазного гидролиза, повышением кровенаполнения легких. **Заключение.** Нарушения метаболизма липидов сурфактанта и водного баланса легких, наряду с изменениями ритмогенеза и режима вентиляции легких, могут обуславливать развитие дизрегуляторной пневмопатии при дисфункции черной субстанции мозга.

Ключевые слова: сурфактант, водный баланс легких, черная субстанция, нейродегенерация, очаг патологической активности

Для корреспонденции: Тимофеева Марина Рудольфовна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, e-mail: martim18@yandex.ru

Для цитирования: Тимофеева М.Р., Лукина С.А. Сурфактантная система и водный баланс легких при моделировании нейродегенерации и очага патологической активности в черной субстанции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 31–35.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.06.2015

Timofeeva M.R., Lukina S.A.

Surfactant system and water balance of the lungs in modeling of neurodegeneration and focus of pathological activity in the substantia nigra

Izhevsk State Medical Academy, 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034, Russia

The comparative analysis of surfactant metabolism and water balance of the lungs in modeling the formation and neurodegeneration focus of pathological activity in the substantia nigra of the brain. **Methods.** Experiments were performed on male rats — nonlinear, including the control, sham operated with unilateral stereotaxic administration of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (Sigma) in the substantia nigra compact part and the implantation of cobalt metal nanopowder (Berlin) in the reticular part of the structure. Complex investigations included determination of surfactant phospholipid fractions by thin layer chromatography, total phospholipids and cholesterol in the bronchoalveolar lavage and surface-active properties by the Wilhelmy method, phospholipase activity, lipid peroxidation intensity on the content of TBA-active products in the lung tissue, evaluation of water balance using the gravimetric method. **Results.** It has been established that the introduction of intranigral neurotoxin and implantation of cobalt in the structure of the brain called the deterioration of the surface activity of

the alveolar lining set against the backdrop of an imbalance of fractional composition of surfactant lipids with multidirectional changes in the amount of phospholipids and the degree of hydration of the lung. Induction focus of pathological activity in the substantia nigra was accompanied by an increase in alveolar phospholipids by lysophosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine, intensification of lipid peroxidation of the lung tissue and organ hyperhydration. Modeling neurodegeneration — reduction of total phospholipids, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine accumulation in terms of activation of phospholipase hydrolysis, increasing blood supply to the lungs. **Conclusion.** Metabolism of surfactant lipids and water balance in the lung, along with changes of rhythmogenesis and mode of ventilation, may lead to the development of dysregulation of pneumopathy with dysfunction of the substantia nigra of the brain.

Keywords: surfactant, water balance of the lungs, substantia nigra, neurodegeneration, the focus of pathological activity

For correspondence: Marina R. Timofeeva, Candidate of Medicine, Associate Professor at the Department of Pathophysiology work «Izhevsk State Medical Academy», 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034, Russian Federation, e-mail: martim18@yandex.ru

For citation: Timofeeva M.R., Lukina S.A. Surfactant system and water balance of the lungs in modeling of neurodegeneration and focus of pathological activity in the substantia nigra. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 31–35. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Timofeeva M.R. <http://orcid.org/0000-0002-6494-9245>

Lukina S.A. <http://orcid.org/0000-0002-3543-9617>

Received 25.06.2015

Введение

Согласно теории генераторных и системных механизмов нервных расстройств, дизрегуляторная патология органов и систем возникает как при выпадении контролирующих механизмов, так и при их патологическом изменении и усилении, являясь основой формирования нейропатологических синдромов [1]. Дизрегуляция nigrostriatalных структур мозга и их нейромедиаторных систем наиболее часто проявляется болезнью Паркинсона, в основе которой лежит прогрессирующая дегенерация дофаминсинтезирующих нейронов черной субстанции. Болезнь Паркинсона характеризуется комплексом двигательных и вегетативно-висцеральных расстройств, включающих, в том числе, изменения режима вентиляции легких и респираторного ритмогенеза. Однако эффективность работы системы внешнего дыхания зависит не только от газообменной, но и негазообменных функций легких. К важнейшим негазообменным функциям относят метаболизм липидов сурфактанта, обеспечивающего стабильность респираторного отдела и участие легких в контроле водного баланса [2]. Нарушение этих функций часто предшествует развернутой картине дыхательной недостаточности [3].

Цель исследования — проведение сравнительного анализа состояния сурфактантной системы и водного баланса легких при моделировании нейродегенерации и формировании очага патологической активности в черной субстанции мозга.

Методика

Экспериментальные исследования выполнены на нелинейных крысах-самцах массой 220—250 г с соблюдением правил работы с лабораторными животными (89/609/ЕЕС). У опытных крыс 1-й группы ($n = 9$), наркотизированных этиминалом натрия (50 мг/кг), воспроизводили нейродегенерацию черной субстанции мозга (SN) односторонним введением нейротоксина 6-гидроксидофамина (Sigma). Микроинъекцию 6 мкг 6-гидроксидофамина, растворенного в 3 мкл 0,05% аскорбиновой кислоты, осуществляли в компактную зону структуры по стереотаксическим координатам атласа мозга G. Paxinos [4]: $P = 5,3$; $L = 2,3$; $V = 7,6$. Дегенерация nigrostriatalных путей при введении 6-ОНДА проявляется повреждением и гибелью 77% дофаминсинтезирующих нейронов и снижением ферментативной активности тирозингидроксилазы функционирующих нейронов [5]. Действие нейротоксина оценивали через 1 мес. по развитию гипокинезии у животных в тесте «открытое поле». Контрольным крысам интранигрально вводили эквивалентный объем изотонического раствора натрия хлорида с аскорбиновой кислотой ($n = 9$). Животным 2-й группы ($n = 20$), которым имплантировали нанопорошок металлического кобальта (Cobalt met., Berlin) в ретикулярную зону черной субстанции мозга: $P = 5,8$; $L = 2$; $V = 8,1$, где локализованы ГАМКергические нейроны, формирующие эфферентные проекции структуры. Индуцирование очага па-

тологической активности при имплантации кобальта связано с нарушением анатомического строения нейронов, их мембранной возбудимости и медиаторной активности. Эти изменения проявляются деструкцией синаптических контактов, глиозом, накоплением в экстрацеллюлярной жидкости глутамата и формированием зеркального очага усиленного возбуждения в гомологичной структуре контралатерального полушария со стабильным уровнем синхронизированных пароксизмальных разрядов на 7-е — 10-е сут. от начала воздействия [1, 6, 7]. Контролем служили животные с погружением микроканюли ($n = 29$) в SN. После выполнения экспериментов проводили гистологический контроль локализации канюль и кобальта в структуре мозга. Получали бронхоальвеолярные смывы, биофизическим методом Вильгельми определяли поверхностную активность монослоя сурфактанта в цикле сжатия — растяжения пленки по минимальному и максимальному поверхностному натяжению с расчетом индекса стабильности альвеол по J.Clements [2]. Метаболизм липидов сурфактанта оценивали по содержанию фосфолипидов и холестерина в смывах [8], фракционному составу липидов [9]. Липиды экстрагировали смесью Блора с последующей её отгонкой для выделения общих фосфолипидов или реактивом Фолча для анализа их фракций. Фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии с денситометрическим сканированием хроматограмм (денситометр «Сорбфил», Россия). Исследовали активность фосфолипазы A_2 по количеству жирной кислоты, отщепившейся от фосфолипидов [10]. Водный баланс легких оценивали гравиметрическим методом: по содержанию гемоглобина в крови и гомогенатах легочной ткани, массе сердца, влажных и высушенных легких рассчитывали общую, экстравазальную жидкость и кровенаполнение легких, сухой остаток [11]. Об интенсивности ПОЛ судили по накоплению ТБК-активных продуктов (МДА) в легочной ткани [12].

Статистический анализ выполнен на основе программного обеспечения SPSS 17 for Windows. Характер распределения параметров оценивали критерием Шапиро—Уилка. Для сравнения групп применяли непараметрический U-критерий Манна—Уитни. Взаимосвязь между показателями устанавливали ранговым коэффициентом корреляции Спирмена (r_s). Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартиля (Median, Q_1 — Q_3). Статистически значимым считали уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что моделирование нейродегенерации и формирование очага патологиче-

ской активности в черной субстанции мозга сопровождались перестройкой метаболизма и противоположно направленными изменениями количества альвеолярных фосфолипидов (таблица). У животных через 1 мес. после введения нейротоксина в бронхоальвеолярных смывах статистически значимо снижались содержание общих фосфолипидов по сравнению с контролем (на 22%) и количество холестерина — на 78%. Уменьшение фосфолипидов в составе сурфактанта могло быть связано как со снижением синтетических процессов в альвеолоцитах II типа, так и с избыточной активацией процессов ферментативного гидролиза, о чем свидетельствуют статистически значимые: повышение активности фосфолипазы A_2 в опыте и обратная корреляция показателя с фосфолипидами ($r_s = 0,83$). Активация черной субстанции через 14 сут. после имплантации кобальта сопровождалась повышением продукции фосфолипидов: их доля в смывах возросла на 263% при уменьшении на 35% активности фосфолипазы A_2 (изменения статистически значимы), что отражает низкую интенсивность оборота альвеолярных липидов. Вместе с тем, оба вида воздействий приводили к значимым изменениям биофизических характеристик сурфактанта со снижением индекса стабильности альвеол. Ухудшение функций сурфактанта в условиях нейродегенерации структуры было связано с уменьшением в его составе на 40% фосфатидилхолина — основной фракции, определяющей поверхностно-активные свойства альвеолярной выстилки и увеличением на 19% лизофосфатидилхолина, обладающего детергентным действием на мембраны (рисунок). Аналогичная тенденция прослеживалась при имплантации кобальта в структуру — на 37% уменьшилась доля фосфатидилхолина и на 13% увеличилось количество лизосоединений; статистически значимо возросло абсолютное количество менее активных фракций — сфингомиелина и фосфатидилэтанолamina. Произошла существенная инверсия коэффициентов фосфатидилхолин/ лизофосфатидилхолин и фосфатидилхолин/сфингомиелин, значимо повысилась фракция фосфатидной кислоты. Дисбаланс альвеолярных фосфолипидов был обусловлен как активацией ферментов фосфолипазного гидролиза и накоплением лизофосфолипидов в условиях нейродегенерации, так и опосредован существенной интенсификацией процессов ПОЛ в экспериментальных группах, что подтверждается статистически значимой отрицательной связью уровня МДА с коэффициентом фосфатидилхолин/сфингомиелин ($r_s = 1,0$) при нейродегенерации и с индексом стабильности альвеол ($r_s = 0,62$) — в условиях активации черной субстанции.

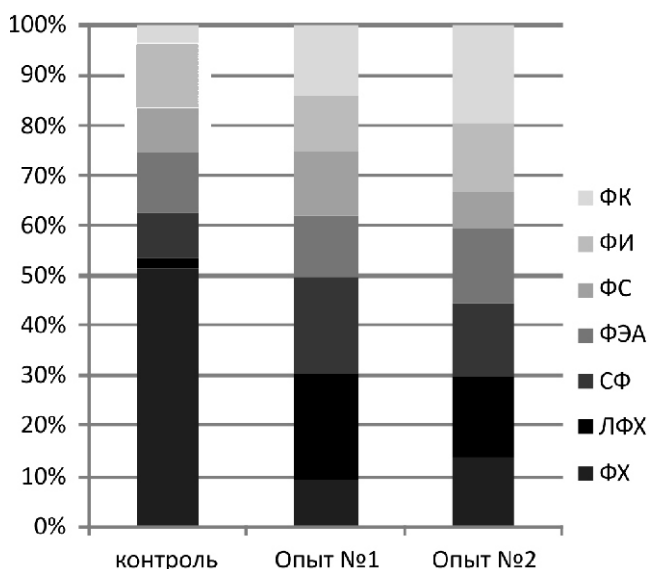
Сурфактант и водный баланс легких при дисфункции черной субстанции (SN)

Показатели	Моделирование нейродегенерации SN		Моделирование очага патологической активности в SN	
	Контроль (n = 9) Median (Q ₁ – Q ₃)	Опыт (n = 9) Median (Q ₁ – Q ₃)	Контроль (n = 29) Median (Q ₁ – Q ₃)	Опыт (n = 20) Median (Q ₁ – Q ₃)
Общие фосфолипиды, мкмоль/г	168,88 (149,7–183,7)	131,55 (101,9–144,2)*	149,51 (131,9–169,8)	512,94 (376,7–543,0)**
Фосфолипаза, Ед	31,56 (28,3–44,50)	52,56 (50,9–52,9)**	32,01 (29,1–39,6)	21,09 (18,5–21,7)**
Индекс стабильности, усл. ед.	0,71 (0,69–0,75)	0,57 (0,56–0,60)**	0,72 (0,68–0,75)	0,51 (0,43–0,53)**
Общая жидкость, %	105,41 (104,5–106,4)	106,25 (93,3–121,7)	101,25 (93,1–110,6)	115,57 (110,3–131,6)*
Кровенаполнение, %	5,90 (5,22–6,54)	12,22 (9,56–15,53)**	6,01 (5,89–7,07)	8,95 (7,34–11,10)*
Экстравакулярная жидкость, %	100,66 (99,0–103,3)	97,73 (85,4–109,8)	94,48 (89,1–109,6)	109,54 (102,7–122,5)*
Малоновый диальдегид, мкмоль/сух. ост.	0,20 (0,1–0,33)	1,47 (0,66–1,69)**	0,19 (0,13–0,22)	0,54 (0,35–0,69)**

Примечание. * p<0,05; ** p<0,01 — по сравнению с контролем

Изучение параметров водного баланса показало, что дисфункция черной субстанции сопровождалась существенным увеличением кровенаполнения легких. Однако, связь показателя кровенаполнения и индекса стабильности альвеол, косвенно отражающая зависимость биофизических свойств сурфактанта от условий гемодинамики, в опытах значимо уменьшалась относительно контроля ($r_s = 0,54$). При интранигральном введении нейротоксина возросшее легочное кровенаполнение сочеталось с низким содержанием альвеолярных фосфолипидов и их поверхностно-активной фракции — фосфатидилхолина. Выявленная диссоциация показателей, на наш взгляд, может быть следствием развития в легочной ткани нейродистрофического процесса, обусловленного дофаминовой дисфункцией вегетативных центров гипоталамуса, возникающей в условиях нейродегенерации [13] или дефицитом дофаминовой нейротрансмиссии в легочной ткани. В опытах с патологической активацией черной субстанции изменения в водном балансе характеризовались выраженной гипергидратацией легких с увеличением кровенаполнения и количества жидкости экстравакулярного сектора. В соответствии с теорией генераторных механизмов, деятельность генератора усиленного возбуждения сопровождается индуцированием вторичных очагов патологической активности в сопряженных структурах мозга [1]. Известно о роли лимбико-диэнцефальной дисрегуляции в патогенезе расстройств метаболизма сурфактанта и водного баланса легких [11, 14, 15]. По-видимому, количественные и качественные изменения альвеолярных липидов и гипергидратация легких явились результатом дисрегуляторных влияний черной субстанции с изменением гормональной и нейромедиаторной активности таких структур мозга, как гипоталамус, гиппокамп, амигдала, синее пятно, имеющих с черной субстанцией моносинаптические взаимосвязи.

Таким образом, моделирование нейродегенерации черной субстанции и формирование очага патологического возбуждения в структуре приводило к ухудшению свойств сурфактанта на фоне фракционного дисбаланса липидов в его составе с уменьшением фосфатидилхолина и накоплением лизофосфатидилхолина, и интенсификации перекисного окисления липидов легких. Изменение биофизических характеристик выстилающего комплекса альвеол при интранигральном введении нейротоксина сопровождалось уменьшением альвеолярных фосфолипидов и повышением органно-



Фракции фосфолипидов сурфактанта при дисфункции черной субстанции:

опыт № 1 — моделирование нейродегенерации;
опыт № 2 — моделирование очага патологической активности;
ФХ — фосфатидилхолин; ЛФХ — лизофосфатидилхолин; СФ — сфингомиелин; ФЭА — фосфатидилэтаноламин; ФС — фосфатидилсерин; ФИ — фосфатидилинозитол; ФК — фосфатидная кислота.

го кровенаполнения, в условиях имплантации кобальта в структуру — увеличением общих фосфолипидов и гипергидратацией легочной ткани. Выявленные нарушения сурфактантной системы и водного баланса, наряду с изменениями ритмогенеза и режима вентиляции легких, могут обуславливать развитие дизрегуляторной пневмопатии при дисфункции черной субстанции мозга.

References

1. Gusev E.I., Kryzhanovskiy G.N., eds. *Dizregulyatsionnaya pathology of the nervous system*. Moscow: Medicinskoe informatsionnoe agentstvo; 2009. (in Russian)
2. Berezovskiy V.A., Gorchakov V.Yu. *Surfactants lung*. Kiev: Nauk. Dumka; 1982. (in Russian)
3. Salim A., Martin M., Brown C., Inaba K., Browder T., Rhee P. et al. The presence of the adult respiratory distress syndrome does not worsen mortality or discharge disability in blunt trauma patients with severe traumatic brain injury. *Injury*. 2008; 39 (1): 30-5.
4. Paxinos G., Watson Ch. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press; 1998.
5. Khudoerko R.M., Voronkov D.N., Yamshchikova N.G. Immunohistochemical and morphological changes of neurons and glia in the brain structures of the nigrostriatal neurodegeneration in modeling of substantia nigra. *Vyull. eksperim. biol. i med.* 2012; 153 (6): 876-80. (in Russian)
6. Avakyan G.N., Badalyan O.L., Burd S.G., Avakyan G.G., Chukanova A.S., Stoyko M. I. et al. Experimental and clinical epileptology. *Epilepsy*. 2010; 4: 41-54. Available

at: <http://www.epilepsia.ru/article.php?what=97> (Accessed 14 March 2011) (in Russian)

7. Chang J.H., Yang X.F., Zempel J.M., Rothman S.M. The unilateral cobalt wire model of neocortical epilepsy: a method of producing subacute focal seizures in rodents. *Epilepsy Res.* 2004; 61(1-3): 153- 60.
8. Komarov F.I., Korovkin B.F., Men'shikov V.V. *Biochemical studies in the clinic*. Leningrad: Medicina; 1981. (in Russian)
9. Kondrakhin I.P., ed. *Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics*. Moscow: KoloS; 2004. (in Russian)
10. Tuzhilin S.A., Saluen'ya A.I. Method for determination of phospholipase A in serum. *Laboratory diagnostics*. 1975; 6: 334-5. (in Russian)
11. Tel' L.Z., Lysenkov S.P. *Central nervous mechanisms of pulmonary edema*. Alma-Ata: Kazakhstan; 1989. (in Russian)
12. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl4 intoxication and vitamin E deficiency. *Biochem. Med.* 1980; 23 (3): 302-11.
13. Politis M., Piccini P., Pavese N., Koh S.B., Brooks D.J. Evidence of dopamine dysfunction in the hypothalamus of patients with Parkinson's disease: an in vivo 11C-raclopride PET study. *Exp Neurol.* 2008; 214(1): 112-6.
14. Danilov G.E., Myagkov A.V., Bryndina I.G., Vasil'eva N.N. *The role of stress protective structures of the brain in the regulation of visceral functions*. Moscow: RAMN; 2004. (in Russian)
15. Lukina S.A., Timofeeva M.R., Volkova E.V. The role of GABA-ergic mediator system in realisation hippocampal influences on the metabolic lung's functions. *Vestnik Tverskogo gos. Universiteta. Seriya «Biologiya i ekologiya»*. 2013; 29(2): 167 -75. (in Russian)

Сведения об авторах:

Лукина Светлана Александровна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, e-mail: saluk@mail.ru

Дьякова М.Е.

Особенности пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких

ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4

Цель исследования — комплексное изучение ферментов пуринового метаболизма в сыворотке крови и иммунокомпетентных клетках у больных туберкулезом легких. **Методика.** У 29 больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ) и 76 — впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ) в сыворотке крови и иммунокомпетентных клетках изучали активность ферментов пуринового метаболизма — аденозиндезаминазы (АДА) и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2), дипептидилпептидазы IV (DPPIV — CD26), экто-5'-нуклеотидазы (5'-НК). **Результаты.** У больных ФКТ и ИТЛ выявлены изменения пуринового метаболизма, выраженность и патофизиологическая значимость которых зависят от клинической формы туберкулеза, то есть от активности и давности специфического процесса. Снижение активности АДА мононуклеаров сопровождалось уменьшением экспрессии CD26 у больных ФКТ и ростом активности данной ectoпептидазы у больных ИТЛ, то есть концентрации CD26 мононуклеаров и нейтрофилов связаны с формой туберкулеза легких. При обеих формах туберкулеза зарегистрировано увеличение уровня активности другого фермента пуринового метаболизма — 5'-НК. **Заключение.** В условиях ассоциирования АДА и CD26 при ИТЛ можно предположить усиление участия каждой из них в активации клеток, процессов пролиферации и продукции цитокинов. Низкий уровень CD26 иммунокомпетентных клеток при отсутствии связи их с активностью АДА характерен для больных ФКТ и отражает свойственную им недостаточность клеточного звена иммунитета. Можно предположить, что формирование комплексов АДА с ectoпептидазами (CD26 и 5'-НК) при впервые выявленном ИТЛ обеспечивает баланс внеклеточный CD26_АДА/аденозин и внутриклеточный 5'-НК/аденозин и тем самым адекватный метаболизм иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: туберкулез; аденозиндезаминаза; 5'-нуклеотидаза; CD26; мононуклеары; нейтрофилы

Для корреспонденции: Дьякова Марина Евгеньевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории патогенетических исследований, e-mail: marinadyakova@yandex.ru

Для цитирования: Дьякова М.Е. Особенности пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 61(3): 36—41.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.07.2015

Dyakova M.E.

Features purine metabolism in patients with pulmonary tuberculosis

Research Institute of Phthisiopulmonology, Saint-Petersburg, Russian Federation

The purpose — comprehensive study of the purine metabolic enzymes in serum and immune cells in patients with pulmonary tuberculosis for the understanding of the pathogenesis of a specific lung disease.

Methods. The enzymes of purine metabolism (adenosine deaminase (ADA) and its isoenzymes (ADA-1 and ADA-2), dipeptidylpeptidase IV (DPPIV — CD26), ecto-5'-nucleotidase (5'-NC) in the blood and immune cells was studied in 29 and 76 patients with fibro-cavernous (FCPT) and infiltrative (IPT) pulmonary tuberculosis correspondingly.

Results. In patients found changes in purine metabolism, the severity and pathophysiological significance of which depend of clinical forms of tuberculosis, that is, from the gravity specific of the process. Reduced activity of ADA mononuclear cells was accompanied by a decrease in the expression of CD26 in patients with FCPT and the growth of the IPT ecto-peptidase patients, that is, the concentration of CD26 mononuclear cells and neutrophils are associated with form of pulmonary tuberculosis. The increased levels of another enzyme purine metabolism — 5'-NC registered in both forms of pulmonary tuberculosis. **Conclusion.** In the context of the ADA and CD26 association with the IPT can assume increased participation of each of them in the activation of cell proliferation and cytokine production. Low levels of CD26 immune cells in the absence of their connection with the activity of ADA is typical for patients with FCPT and reflects their inherent failure of cellular immunity. We can assume that the formation of complexes with the ADA ecto-peptidases (CD26 and 5'-NC) for newly di-

agnosed IPT provides a balance CD26_ADA extracellular / intracellular adenosine and 5'-NC / adenosine and thereby adequate metabolism of immunocompetent cells.

Keywords: tuberculosis, adenosine deaminase, ecto-5'-nucleotidase, CD26, mononuclears, neutrophils

For citation: Dyakova M.E. Features purine metabolism in patients with pulmonary tuberculosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (3): 36—41. (in Russ).

For correspondence: Marina Y. Dyakova, Ph.D., Senior Research Worker, Laboratory of the Pathogenetic Researches St. Petersburg Research Institute of the Phthisio-Pulmonology of the Russia's Ministry of Health; ul. Polytechnicheskaya 32, St. Petersburg, 194064 Russia, e-mail: marinadyakova@yandex.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 31.07.2015

Введение

Ключевые ферменты пуринового метаболизма — аденозиндезаминаза (АДА) и экто-5'-нуклеотидаза (5'-НК) регулируют уровень аденозина, играющего важную роль в регуляции клеточного иммунитета [1]. В этой связи АДА рассматривается в качестве маркера напряженности иммунного ответа [2, 3]. Участие в нем принимают все три изофермента аденозиндезаминазы — АДА-1, АДА-2 и АДА — в комплексе с протеином (АДАср), идентифицированная как дипептидилпептидаза IV (DPPIV) и являющаяся высокоспецифичной сериновой протеиназой, присутствующей в качестве эктоэнзима на различных клетках [4]. Установлено, что DPPIV — активационный антиген CD26, способствующий регуляции продукции цитокинов за счет активации Т-лимфоцитов [5—7]. АДА регулирует уровень аденозина и дезоксиаденозина, конвертируя их в инозин и в дезоксиинозин соответственно. Если основная роль АДА-1 — деградация внутриклеточного аденозина и дезоксиаденозина и предохранение клеток от апоптоза [8], то АДА-2 и комплекса CD26-ADA — дезаминирование внеклеточного аденозина [9].

За образование аденозина из внеклеточных нуклеотидов ответственна экто-5'-НК, являющаяся важным антигеном иммунокомпетентных клеток, регулирующая их созревание и адгезию к эндотелию. Гидролиз фосфатидилинозитоловой связи сопровождается отделением 5'-НК от клетки и нарушением в лимфоцитах биосинтеза предшественников нуклеиновых кислот и процессов созревания [10].

Изменение экспрессии DPPIV и 5'-НК изучалось при различных злокачественных опухолях, иммуноопосредованных нарушениях, остеопорозах, ревматоидных артритах и других воспалительных и инфекционных заболеваниях [11, 12]. Во фтизиопульмонологии исследования ограничивались изучением активности АДА и ее изоферментов АДА-1 и АДА-2.

Цель работы — комплексное изучение ферментов пуринового метаболизма в сыворотке крови и иммунокомпетентных клетках у больных туберкулезом легких.

Методика

Обследовано 105 больных туберкулезом легких: 29 — с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ; 19 мужчин и 10 женщин) в возрасте 22,0—64,0 лет и 76 — с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ; 33 мужчины и 43 женщины) в возрасте 16,0—65,0 лет. Выбор больных обусловлен тем, что ИТЛ — острая форма туберкулеза легких, а ФКТ — хроническая форма туберкулеза, конечная стадия неблагоприятного исхода ИТЛ при его естественном развитии или в результате неэффективного лечения. Обследование пациентов проводили до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии. В референсную (контрольную) группу были включены 30 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Активность АДА и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2) в сыворотке крови и в лизатах клеток, получаемых путем повторного замораживания и оттаивания, определяли методом G.Giusti [13]. Уровни 5'-НК в сыворотке крови, CD26 (DPP IV) в сыворотке, мононуклеарах (мн) и нейтрофилах (н) крови — с использованием иммуноферментных наборов Elisa (Ecto NT5E, «USCN», Китай и Human sCD26 Platinum ELISA, «eBioscience», Австрия).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0. Метрические показатели представлялись в виде среднего и ошибки среднего ($\bar{X} \pm m$), порядковые в виде минимум-максимум. Статистическую значимость различий метрических показателей оценивали с использованием непараметрического

Показатели пуринового метаболизма в сыворотке крови у больных ФКТ и ИТЛ

Показатели	Группы		
	Референсная	Больные ФКТ	Больные ИТЛ
АДА, ед./л	14,1 ± 0,24 14,1 (10,7—18,3)	19,34 ± 1,65* 17,5 (7,2—48,2)	18,8 ± 0,5* 17,3 (7,8—55,5)
АДА-1, ед./л	3,27 ± 0,16 3,33 (1,0—5,8)	2,71 ± 0,46* 2,05 (0—10,3)	2,9 ± 0,1* 2,7 (0—8,8)
АДА-2, ед./л	10,97 ± 0,24 11,2 (7,6—16,3)	16,63 ± 0,5* 15,2 (5,4—40,1)	15,9 ± 0,47* 14,4 (5,9—51,3)
CD26, нг/мл	710,0 ± 59,6 692,6 (500,0—875,0)	539,68 ± 75,11 452,9 (118,6—1675,9)	616,2 ± 44,48 535,0 (182,0—2000,0)
5'-НК, нг/мл	0,23 ± 0,09 0,06 (0—0,7)	0,91 ± 0,17* 0,8 (0—3,5)	0,94 ± 0,15* 0,73 (0,01—2,4)

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с референсной группой.

U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, проверка значимости результатов ранговых коэффициентов корреляции Спирмена на основе статистики Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У больных ФКТ и ИТЛ по сравнению с референсной группой отмечено однонаправленное изменение показателей АДА в сыворотке крови: рост активности АДА за счет увеличения АДА-2 при снижении активности АДА-1 (табл. 1). И как следствие этого, выявлено нарушение соотношения изоферментов в общей активности АДА: снижение процентного содержания АДА-1 и увеличение АДА-2 (рис. 1).

В мононуклеарах больных обеих групп активность АДА была снижена за счет уменьшения активности АДА-1мн (рис. 2). При этом при ФКТ активность АДА-1мн определялась в 1,4 раза ниже, чем при ИТЛ. Активность АДА-2мн и доля изоферментов АДА-1мн и АДА-2мн в общей активности АДАмн у больных ФКТ и ИТЛ были в пределах референсных значений, то есть сохранялось динамическое рав-

новесие изоферментов аденозиндезаминазы в мононуклеарах при обеих формах туберкулеза легких.

В нейтрофилах активность АДА при обеих формах туберкулеза регистрировалась в пределах референсных значений. Это относится и к активности АДА-1н, АДА-2н и их доле в общей активности АДА нейтрофилов у больных ФКТ. Напротив, у больных ИТЛ выявлено разнонаправленное изменение активности изоферментов: снижение активности АДА-1н и %АДА-1н при росте АДА-2н и %АДА-2н. Причем, у больных ИТЛ в 1,8 раза чаще, чем у больных ФКТ регистрировалась активность АДА-2н > 0 и как следствие этого доля изофермента АДА-1 в общей активности АДА нейтрофилов была в 1,1 раза ниже, а АДА-2н, напротив, в 1,7 раза выше. То есть при ИТЛ в нейтрофилах было выявлено перераспределение изоферментов, в сторону роста АДА-2.

Уровень CD26 в сыворотке (растворимая форма эктопептидазы) у больных ФКТ и ИТЛ был в пределах референсных значений. При том, что экспрессия данной эктопептидазы в мононуклеарах и нейтрофилах у больных ФКТ и ИТЛ была разнонаправ-

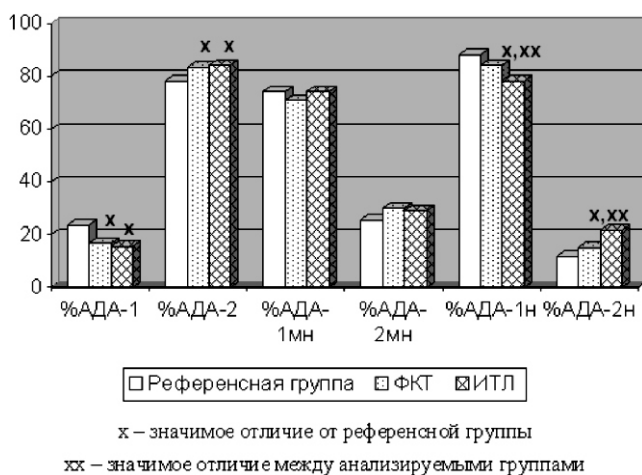


Рис. 1. Доля изоферментов в общей активности АДА в сыворотке и иммунокомпетентных клетках крови у больных ФКТ и ИТЛ.

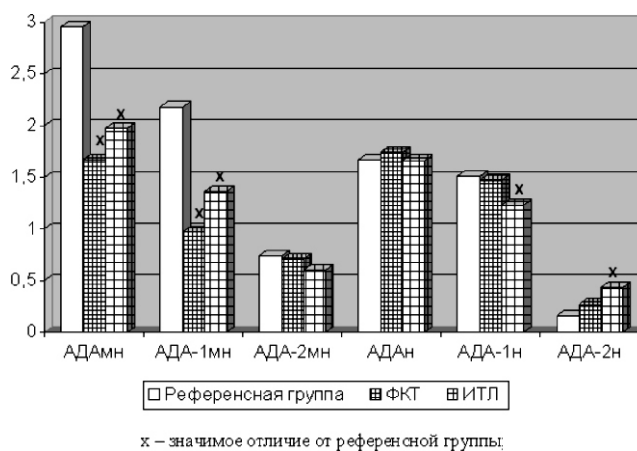


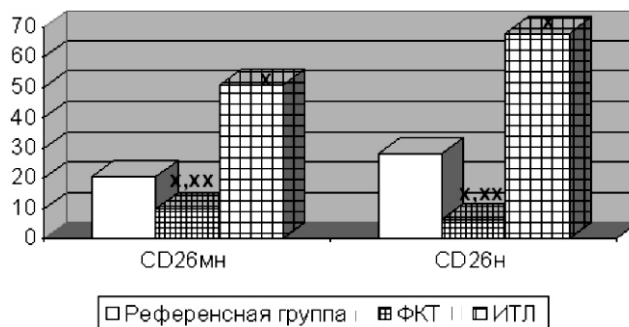
Рис. 2. Внутриклеточная активность аденозиндезаминазы в анализируемых группах.

ленной (рис. 3): снижение CD26 при ФКТ и рост — при ИТЛ. У больных ФКТ уровень CD26 в мононуклеарах и нейтрофилах регистрировался соответственно в 5,2 и 10,7 раза ниже, чем при ИТЛ ($p = 0,0004$ и $p = 0,00003$).

Уровень 5'-НК в сыворотке значимо превышал референсные значения при обеих формах туберкулеза легких.

Таким образом, активность АДА-1-мн, %АДА-1н, %АДА-2н, концентрация CD26 мононуклеаров и нейтрофилов зависели от формы туберкулеза. Так как в активированных клетках повышается процент клеток, экспрессирующих CD26 и АДА [14], то можно предположить, что иммунокомпетентные клетки при впервые выявленном ИТЛ активированы в большей степени, чем при хроническом течении специфического процесса.

От формы туберкулеза зависели и результаты корреляционного анализа (табл. 2): у больных ИТЛ отмечена согласованность показателей пуринового метаболизма, регулирующих уровень нуклеотидов, ответственных за функциональную активность фагоцитирующих клеток. Только при ИТЛ выявленные ассоциации между %АДА-1 сыворотки и CD26 мн, а также между %АДА-1мн и CD26 мн ($r = 0,24$; $p = 0,06$) наводят на мысль о возможности образования комплекса внеклеточного домена в мононуклеарах. И, возможно, именно образованием данного домена можно объяснить снижение активности внеклеточной АДА-1 (экто-АДА-1) при ИТЛ. Но у больных ФКТ, у которых не выявлено комплексообразования АДА-1 (сыворотки и/или мононуклеаров) с CD26, также зарегистрировано уменьшение активности АДА-1 сыворотки. CD26 — сенсор экто-АДА, экспортируемой из клетки или освобождаемой после гибели клетки [14]. И, возможно, при ФКТ именно после гибели (лизиса) клеток появилась экто-АДА-1, которая затем могла образовать комплекс с CD26 [15]. Интересно отметить зарегистрированные при ИТЛ отрицательные связи между



x — значимое отличие от референсной группы,
xx — значимое отличие между анализируемыми группами

Рис. 3. Уровень CD26 иммунокомпетентных клеток в анализируемых группах

CD26мн и АДА-2мн, %АДА-2мн ($r = 0,26$; $p = 0,04$; $r = 0,25$; $p = 0,05$ соответственно), которые можно прокомментировать как невозможность ассоциированности данных показателей, потому что АДА-2 может связываться с различными типами клеток через протеогликаны или более специфичные аденозиновые рецепторы [16].

При ИТЛ полученная отрицательная связь между уровнем CD26н и активностью АДАН, может рассматриваться как несбалансированность этих характеристик пуринового метаболизма в нейтрофилах. Но при этом регулирование уровня аденозина в нейтрофилах у больных ИТЛ, возможно, осуществляется 5'-НК, судя по корреляции между данной эктопептидазой и АДАН, то есть при ИТЛ сохранялось равновесие между поступлением аденозина и его дезаминированием. Напротив, при ФКТ выявленная положительная взаимосвязь между уровнем 5'-НК и DRP1V/CD26н, с одной стороны, указывает на синергизм эктопептидаз в регуляции концентрации аденозина в нейтрофилах, но с другой стороны, наводит на мысль о недостаточной активности 5'-НК, что и

Таблица 2

Результаты корреляционного анализа у больных анализируемых групп

Пары признаков		Группы больных	
		ФКТ	ИТЛ
АДА-1/АДА	CD26мн	—	$r = 0,27$; $p = 0,03$
АДА-2	АДА-2мн/АДАмн	—	$r = 0,34$; $p = 0,003$
АДАН	5'-НК	—	$r = 0,47$; $p = 0,03$
АДАН	CD26н	—	$r = 0,41$; $p = 0,03$
CD26	CD26мн	—	$r = 0,25$; $p = 0,046$
CD26мн	CD26н	—	$r = 0,71$; $p = 0,00...$
5'-НК	CD26н	$r = 0,55$; $p = 0,0045$	—

подтверждается отрицательной связью между АДА-1н/АДАн и 5'-НК ($r = 0,64$; $p = 0,008$). Появление растворимой формы может быть частично связано с протеолитическим расщеплением и/или секретией клеточной CD26 [12]. В свете этого, установленная у больных ИТЛ отрицательная взаимосвязь между CD26 сыворотки и мононуклеаров может свидетельствовать о возможности происхождения растворимой формы эктопептидазы вследствие секреции из мононуклеаров. Поскольку при ФКТ данная связь отсутствует при близком уровне CD26 сыворотки у больных обеих групп, можно предположить вероятность секреции растворимой формы эктопептидазы всеми клетками, на мембране которых экспрессируется CD26 при ФКТ [5]. Наконец, больных ИТЛ отличает наличие межклеточного взаимодействия между мононуклеарами и нейтрофилами, отражением чего является связь между уровнями CD26мн и CD26н.

АДА-2 экспрессируется моноцитами/макрофагами в ответ на инвазию патогенов, в места с высокой концентрацией аденозина и низким рН [15, 16]. И только при ИТЛ выявлена связь между %АДА-2мн и АДА-2 сыворотки, отражающая выход АДА-2 из мононуклеаров в ответ на инвазию *Mycobacterium tuberculosis* и повышение уровня внеклеточного аденозина. Это подтверждается слабой корреляцией между АДА-2 и числом моноцитов ($r = 0,28$; $p = 0,0008$). У больных ФКТ по отсутствию связей между показателями АДА сыворотки и мононуклеаров и по отрицательной корреляционной зависимости между АДА-2/АДА и числом моноцитов ($r = 0,52$; $p = 0,00074$) можно предположить, что рост активности внеклеточной АДА-2 происходит вследствие разрушения (лизиса) макрофагов.

Таким образом у больных ФКТ и ИТЛ выявлены изменения пуринового метаболизма, выраженность и патофизиологическая значимость которых зависят от клинической формы туберкулеза, то есть от степени активности и давности специфического поражения, развития фиброзных изменений, ограничивающих казеозные участки. Снижение активности АДА мононуклеаров сопровождалось уменьшением экспрессии CD26 у больных ФКТ и ростом данной эктопептидазы у больных ИТЛ, то есть концентрации CD26 мононуклеаров, а также и нейтрофилов связаны с формой туберкулеза легких. При обеих формах туберкулеза зарегистрировано увеличение уровня другого фермента пуринового метаболизма — 5'-НК.

В условиях ассоциирования АДА и CD26 при острой форме туберкулеза можно предположить усиление участия каждой из них в активации клеток, процессов пролиферации и продукции цитокинов. Низкий уровень CD26 иммунокомпетентных клеток

при отсутствии связи их с активностью АДА характерен для больных с хроническим течением специфического процесса и отражает функциональное истощение иммунокомпетентных клеток, недостаточность клеточного звена иммунитета. Можно предположить, что формирование комплексов АДА с эктопептидазами (CD26 и 5'-НК) при впервые выявленном ИТЛ обеспечивает баланс внеклеточный CD26 АДА/аденозин и внутриклеточный 5'-НК/аденозин и тем самым адекватный метаболизм иммунокомпетентных клеток. А отсутствие данных комплексов при хронической форме туберкулеза легких отражает дисбаланс между поступлением аденозина и его дезаминированием, что согласуется не только с остро выраженным специфическим процессом, но и с нарушениями метаболизма иммунокомпетентных клеток.

References

- Zanini D., Schmatz R., Pimentel V.C., Gutierrez J.M., Maldonado P.A., Thome G.R. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomed Pharmacother.* 2012; 66(1): 40-5.
- Knoring B.E., Titarenko O.T., Sakharova I.Ya., Dyakova M.E., Loginova G.P. Correlation of cytokine production and activity of adenosine deaminase in pulmonary tuberculosis. *Probl. Tuberk. i Bol. Legkikh.* 2000; 3: 38-1. (in Russian)
- Titarenko O.T., Dyakova M.E., Perova T.L., Ryasnyanskaya T.B. Activity of adenosine deaminase and its isoenzymes in patients with different forms of tuberculosis. *Probl. Tuberk. i Bol. Legkikh.* 2002; 3: 43-5. (in Russian)
- Cordero O.J., Salgado F.J., Fernandez-Alonso C.M., Herrera C., Lluís C., Franco R. et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J. of Leuk. Biol.* 2001; 70: 920-30.
- Gorrell M.D., Gysbers V., McCaughan W. CD 26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 2001; 54: 249-64.
- Weihofen W.A., Liu J., Reutter W., Saenger W., Fan H. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 43330-35.
- Pacheco R., Lluís C., Franco R. Role of CD26-adenosine deaminase interaction in T cell-mediated immunity. *PNAS.* 2005; 24 (2): 235-45.
- Franco R., Pacheco R., Gatell J.M., Gallart T., Lluís C. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit. Rev. Immunol.* 2007; 27: 495-509.
- Eckle T., Koeppen M., Eltzsching H.K. Role of extracellular adenosine in acute lung injury. *Physiology.* 2009; 24 (5): 298-306.
- Hunsucker S.A., Mitchell B.S., Spychala J. The 50-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* 2005; 107: 1-30.
- Schetinger M.R.C., Morch V.M., Bonan C.D., Wyse A.T.S. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors.* 2007; 31: 77-98.

12. Eric-Nikolic A., Matic I.Z., Dordevic M., Milovanovic Z., Markovic I., Dzodic R. et al. Serum DPPIV activity and CD26 expression on lymphocytes in patients with benign or malignant breast tumors. *Immunobiology*. 2011; 216: 942-46.

13. Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer H. ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press; 1974: 2. 1092-99.

14. Martin M., Huguet J., Centelles J.J., Franco R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. *J. Immunol.* 1995; 155: 4630 — 43.

15. Hashikawa T., Takedachi, Terakura M., Yamada S., Thompson L.F., Shimabukuro et al. Activation of adenosine receptor on gingival fibroblasts. *J.Dent Res.* 2006 August; 85(8): 739-44.

16. Zavialov And.V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov Ant.V., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J. of Leukocyte Biology*. 2010; 88 (2): 279-90.

17. Zavialov A.V., Engstrom A. Human ADA-2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase. *Biochem. J.* 2005; 391: 51-7.

Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Измestьев С.В.

Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», Россия, 672000, г.Чита, ул. Горького, д. 39 а

Цель исследования — изучение последствий дисфункции эндотелия, возникающих при экспериментальной гипергомоцистеинемии. **Методика.** Эксперимент выполнен на 42 белых беспородных крысах-самцах массой 150 г, одного возраста. Исследовано 2 группы животных по 21 в каждой. Гипергомоцистеинемии у опытных животных создавали путем внутрибрюшинного введения гомоцистеина в дозе 0,1 мкмоль на 1 г массы 1 раз в сут. в течение 14 сут. Крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. В сыворотке крови определяли концентрацию гомоцистеина методом ВЭЖХ, содержание IFN γ , TNF α , IL-17A с помощью системы мультиплексного анализа FlowCytomix 5 plex (BMS826FF) в комбинации с Simplex Kit (BMS8635FF) соответствующих аналитов для крыс (компания «Bender Medsystems», Австрия). Коагулогические показатели определяли в плазме крови, взятой из подключичной вены. Экспрессию тканевого фактора (TF) оценивали иммуногистохимическим методом. **Результаты.** У крыс с гипергомоцистеинемией регистрировали пятикратное увеличение уровня эндотелина, снижение концентрации нитратов и нитритов. В эндотелиоцитах сосудов миокарда выявлена экспрессия тканевого фактора, параллельно с этим, сокращение активированного частичного тромбопластинового и тромбинового времени, повышение содержания растворимого фибрин-мономерного комплекса, а также резкое увеличение концентрации фактора некроза опухолей и интерферона гамма. **Заключение.** Таким образом, экспериментальная ГГЦ сопровождается выраженной дисфункцией эндотелия, что проявляется в повышении тромбогенных свойств крови, повышением уровня эндотелина и цитокинов.

Ключевые слова: гомоцистеин, эндотелий, тканевой фактор, коагулограмма, цитокины

Для корреспонденции: Фефелова Елена Викторовна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧГМА, e-mail: fefelova.elena@mail.ru

Для цитирования: Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Измestьев С.В. Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 42—46.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.02.2015

Tsybikov N.N., Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Izmestiyev S.V.

Endothelial dysfunction in experimental hyperhomocysteinemia

Chita State Medical Academy, Chita, Russia, Gorkogo str. 39a, Chita, Russia, 672000

The purpose: to investigate the consequences of the endothelium dysfunction caused by the experimental hyperhomocysteinemia.

Methods. The experiment included the similar aged 42 white non-pedigree male rats with average weight of 150 grams. The rats were divided in two groups each of these having 21 species. Hyperhomocysteinemia was induced in experimental rats by intraperitoneal injection of 0,1 μ mol homocysteine per 1 gr of weight once a day during 14 days. The equal intraperitoneal dose of the physiological solution was injected to the rats of the control group. The level of homocysteine was determined in the blood serum with high-yield liquid chromatography (HYLC), the content of IFN γ , TNF α , IL-17A c was measured with the system of multiplex analysis FlowCytomix 5 plex (BMS826FF) combined with Simplex Kit (BMS8635FF) of appropriate analyts for «Bender Medsystems» rats (Austria). Coagulation indices were determined in the blood plasm of subclavian vein. TF expression of tissue factor was estimated with immune histochemical method. **Results.** Fivefold increase of endothelin level and decrease of nitrates and nitrites levels were found in rats with hyperhomocysteinemia. Expression of tissue factor, shortening of activated partial thromboplastin and thrombin times, increase of soluble fibrin monomeric complex level, significant increase of tumor necrosis factor and interferon gamma levels were identified in endothelial cells of myocardial vessels. **Conclusion.** Thus, experimental hyperhomocysteinemia (HHC)

proved to be accompanied by expressed endothelium dysfunction which is marked by thrombogenic activity of blood as well as endothelium and cytokine level increasing.

Keywords: homocysteine, endothelium, tissue factor, coagulogram, cytokines

For correspondence: Fefelova Elena, Department of Pathological physiology, Chita state medical academy of Russia, 672000, Russia, Chita, ul. Gorky 39a; e-mail: fefelova.elena@mail.ru

For citation: Tsybikov N.N., Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Izmestyev S.V. Endothelial dysfunction in experimental hyperhomocysteinemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 42–46. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Tsybikov N.N. <http://orcid.org/0000-0002-0975-2351>

Fefelova E.V. <http://orcid.org/0000-0002-0724-0352>

Tereshkov P.P. <http://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

Izmestyev S.V. <http://orcid.org/0000-0001-7550-1318>

Received 26.02.2015

Введение

Широкое распространение и «омоложение» ишемической болезни сердца (ИБС) на фоне возрастающей общей продолжительности жизни населения определяет ее большую практическую и социальную значимость [1].

В патогенезе ИБС у лиц пожилого и старческого возраста ведущая роль принадлежит атеросклеротическому поражению коронарных артерий, у молодых лиц наряду с ранними атеросклеротическими изменениями выделяют и вазорегуляторные нарушения, приводящие к спазму коронарных артерий, дисфункции свертывающей и противосвертывающей систем крови с последующими тромбозами и тромбоэмболиями сосудов сердца, одной из причин которых является увеличение уровня гомоцистеина [2].

Механизмы неблагоприятного действия гомоцистеина (ГЦ) на сосудистое русло и систему гемостаза в настоящее время изучены недостаточно.

Предполагается, что повреждающее действие ГЦ на эндотелиальные клетки (ЭК) связано с окислительным стрессом, инактивацией оксида азота, угнетением активности глутатионпероксидазы и образованием окисленных форм липопротеинов низкой плотности [3].

Кроме того, ГЦ уменьшает антитромботический потенциал ЭК и увеличивает проагрегантное состояние тромбоцитов [4].

Целью исследования было изучение последствий дисфункции эндотелия, возникающей при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

Методика

Эксперимент выполнен на 42 белых беспородных крысах-самцах массой 150 г, одного возраста. Всех животных разделили на 2 группы по 21 в каждой. Крыс содержали в условиях вивария. Все эксперименты проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей».

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) у опытных животных создавали путем внутрибрюшинного введения гомоцистеина в дозе 0,1 мкмоль на 1 г массы 1 раз в сутки, взяв за основу модель гипергомоцистеинемии Иванова А.В. и соавт. [5]. Крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Животные опытной группы получали гомоцистеин в течение 14 сут. Из эксперимента животных выводили передозировкой эфира.

Концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови и лизате клеток определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией [6]. Для получения мононуклеарной фракции клеток, кровь крыс фракционировали в 63%-ном растворе Перколл (GE Healthcare), центрифугируя при 400 г в течение 30 мин. Фракцию собирали и отмывали от Перколл в растворе PBS pH 7,4. Клетки подсчитывали на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC-500» (Beckman Coulter, USA) используя 1-ю панель моноклональных антител IOTest (Beck-

man Coulter) для крысы. Лизат клеток получали путем заморозки — оттаивания.

Определение концентрации цитокинов IFN γ , TNF α , IL-17A в плазме крови крыс проводили с помощью системы мультиплексного анализа FlowCytomix 5 plex (BMS826FF) в комбинации с Simplex Kit (BMS8635FF) соответствующих аналитов для крыс (компания «Bender Medsystems», Австрия). Полученные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США). Обработку цитометрических файлов осуществляли в программном обеспечении FlowCytomixPro 3.0 («Bender Medsystems», Австрия).

Коагулогические показатели определяли в крови, взятой из подключичной вены. Кровь стабилизировали 3,8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Исследование проводили на программируемом оптико-механическом коагулометре Минилаб 701 с использованием наборов для определения тромбин-теста (ТВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), растворимого фибрин мономерного комплекса (РФМК) производства НПО РЕНАМ, Россия.

Экспрессию тканевого фактора (ТФ) оценивали иммуногистохимическим методом. Исследование было выполнено с использованием парафиновых срезов миокарда экспериментальных животных биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом с крысиними моноклональными антителами к тканевому фактору производства Santa Cruz biotechnology (USA). Результат оценивали полуколичественно: как отрицательный, если окрашенных клеток определялось менее 10%, в остальных случаях, положительный результат оценивался количественно по шкале от 1 до 4 баллов. Шкала была построена следующим образом: 1 балл — 10—25% окрашенных клеток, 2 балла — 25—50% окрашенных клеток, 3 балла — 50—75% окрашенных клеток и 4 балла — более 75% окрашенных клеток, с расчетом критерия χ^2 (Хи-квадрат).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft). Данные представлены в виде медианы и межквартильных интервалов (25-го; 75-го перцентилей); сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Вилкоксона; сравнение независимых выборок проводили с помощью U-критерия Манна—Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Гипергомоцистеинемия диагностируют в том случае, если уровень гомоцистеина в крови превышает 15 мкмоль/л [3]. Концентрация гомоцистеина в плазме крови в пределах 15—30 мкмоль/л свидетельствует об умеренной гипергомоцистеинемии, от 30 до 100 мкмоль/л — о промежуточной, а более 100 мкмоль/л — о тяжелой [7]. Содержание гомоцистеина у здоровых животных колеблется в тех же пределах, что и у человека [8]. В нашем исследовании, на 14-е сут. ежедневного введения гомоцистеина была воспроизведена умеренная гипергомоцистеинемия: содержание гомоцистеина в контроле составило 7,8 (6,02; 8,96) мкмоль/л, а в опытных образцах — 28,6 (20,5; 32,4). При этом уровень гомоцистеина внутри клеток не изменялся: в контрольной группе он составил 0,02 (0,00; 0,17), а в опытных группах — 0,03 (0,00; 0,60) нмоль/1 клетку.

Эндотелиальная дисфункция (ЭД) — прежде всего, дисбаланс между продукцией вазодилатирующих, ангиопротективных, антипролиферативных факторов (оксида азота (NO), простаглицина, тканевого активатора плазминогена, С-типа натрийуретического пептида и пр.), с одной стороны, и вазоконстрикторных, протромботических, пролиферативных факторов (эндотелина, тромбосана А₂, ингибитора тканевого активатора плазминогена), с другой. Кроме этих показателей в качестве потенциальных маркеров ЭД рассматривается несколько субстанций, продукция которых может опосредованно отражать функцию эн-

Таблица 1

Содержание вазоактивных веществ в сыворотке крови крыс при ГГЦ, Ме (25; 75)

Показатель	Контрольная группа (n = 21)	Опытная группа (n = 21)
Эндотелин, фмоль/мл	2,83 (0,85; 3,52)	15,73 (12,25; 15,82) p = 0,005
Нитраты, мкмоль/л	101,00 (96,48; 110,50)	54,17 (34,09; 54,17) p = 0,005
Нитриты, мкмоль/л	87,50 (58,33; 95,83)	25,00 (23,01; 41,80) p = 0,005

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой

дотелия. Речь идет о таких показателях, как провоспалительные цитокины: интерлейкины (ИЛ)-1, ИЛ-6, ИЛ-8), фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), фактор Виллебранда, селектины, С-реактивный белок и пр. [9]. Нами зарегистрировано развитие дисфункции эндотелия в опытной группе, проявляющаяся увеличением уровня эндотелина более чем в 5 раз и статистически значимым снижением концентрации нитратов и нитритов (табл. 1).

Известно, что эндотелин — самый мощный вазоконстриктор из известных на сегодняшний день. Резкое увеличение его уровня при ГГЦ приводит к нарушению перфузии органов и тканей, с возможным ишемическим повреждением клеток. Более того, вазоконстрикторный эффект эндотелина усиливается на фоне снижения концентрации основного вазодилатора — оксида азота, оцениваемое по уменьшению содержания его метаболитов — нитратов и нитритов.

Установлено, что эндотелиальные клетки миокарда крыс с ГГЦ резко увеличивают экспрессию тканевого фактора (ТФ) (табл. 2). Эта реакция прямо указывает на выраженную дисфункцию эндотелия [10] и не может не сопровождаться угрозой развития тромбофилии. О возможном развитии последней свидетельствуют показатели коагулограммы у крыс с ГГЦ. У этих животных наблюдалось сокращение АЧТВ ($p = 0,008$), тромбинового времени (ТВ)

($p = 0,0076$) и возростала концентрация РФМК ($p = 0,007$). В тесте АЧТВ заведомо максимально активированы внешний и внутренний путь коагуляции. Дополнительная активация внешнего пути свертывания крови возможна лишь в одном случае — появлении ТФ в кровотоке, что и было нами продемонстрировано при иммуногистохимическом исследовании эндотелиальных клеток миокарда крыс с ГГЦ. Об этом же может свидетельствовать и сокращение ТВ, что, несомненно, связано с усилением генерации тромбина, инициируемой интенсиным образованием протромбиназы из-за чрезмерной активации внешнего пути коагуляции ТФ. Увеличение же концентрации РФМК указывает на наличие внутрисосудистого свертывания крови у крыс с ГГЦ.

Вероятно, усиление экспрессии ТФ на эндотелиоцитах может быть обусловлено гиперпродукцией $TNF\alpha$ и $INF\gamma$. Наиболее значительно в опытной группе увеличилось содержание фактора некроза опухоли ($TNF\alpha$) — в 14 раз, концентрация $INF\gamma$ возросла почти в 11 раз (табл. 3).

Таким образом, экспериментальная ГГЦ сопровождается выраженной дисфункцией эндотелия, что проявляется в повышении тромбогенных свойств крови. Причиной этого сдвига является экспрессия ТФ на эндотелиоцитах, что сопровождается сокращением АЧТВ, ТВ и повышением концентрации РФМК.

Таблица 2

Экспрессия тканевого фактора на эндотелиоцитах миокарда крыс при ГГЦ

Показатель	Контрольная группа (n = 21), % / \pm SD	Опытная группа (n = 21), % / \pm SD	Уровень статистической значимости
Экспрессия ТФ эндотелиоцитами (M \pm SD)	0,62 \pm 0,67	2,05 \pm 0,81	Коэффициент Вилкоксона $p = 0,00028$
Менее 10% окрашенных клеток	47,6%	—	χ^2 $p = 0,009$
10 — 25% окрашенных клеток	42,9%	28,6%	χ^2 $p = 0,0018$
25 — до 50% окрашенных клеток	9,5%	38,0%	χ^2 $p = 0,026$
50 — 75% окрашенных клеток	—	33,4%	χ^2 $p = 0,033$

Таблица 3

Содержание цитокинов в сыворотке крови крыс при ГГЦ, Ме (25; 75)

Показатель	Контрольная группа (n = 21)	Опытная группа (n = 21)
$TNF\alpha$, пг/мл	77,56 (0,00; 150,74)	1104,01 (860,05; 1350,81) $p = 0,003$
$INF\gamma$, пг/мл	17,99 (4,05; 25,90)	191,53 (124,59; 228,12) $p = 0,0005$

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой.

У животных с ГГЦ регистрируется высокий уровень эндотелина и цитокинов, что также отражает процесс повреждения эндотелия при ГГЦ.

References

1. Govorin A.V. Features of the development and progression of cardiovascular disorders in clinic of internal diseases. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2008; 2: 19-25.
2. Coboleva G.N., Fedulov V.K., Karpov Yu.A. Dysfunction of the endothelium of blood and its significance for prognosis in patients with cardiovascular diseases. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2010; 9 (2): 69-73.
3. Tsybikov N.N., Tsybikova N.M. The role of homocysteine in human pathology. *Usp ekhi sovremennoy biologii*. 2007; 127(5): 471-82.
4. Vinogradov V.L., Orel E.B., Vasil'ev S.A. Hyperhomocysteinemia as a factor in thrombotic risk (debate). *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2009; 3 (39): 13-20.
5. Ivanov A.V., Moskovtsev A.A., Martynova E.A., Savina G.D., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A. General aminosulfides in rat plasma after intraperitoneal and subcutaneous administration of homocysteine. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 4: 41-5.
6. Dutov A.A., Nikitin D.A., Fedotova A.A. Determination of homocysteine and cysteine in plasma / serum HPLC with UV detection method and solid phase extraction on a polymeric sorbent. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2010; T. 56, vyp. 5: 609-15.
7. Skvortsov Yu.I., Korol'kova A.S. Homocysteine as a risk factor for coronary heart disease (Review). *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2011; 7(3): 619-24.
8. Dayal S., Lentz S. Role of redox reactions in the vascular phenotype of hyperhomocysteinemic animals. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9 (11): 1899-909.
9. Smirnova V.Yu. *Diagnostic value of laboratory markers of endothelial damage in unstable angina*. avtoref. dis... kand. med. nauk. M., 2009.
10. Polyakova A.P. *Features of allelic polymorphism of genes associated with endothelial dysfunction in patients with early onset of venous thrombosis*. avtoref. dis... kand. med. nauk. Sankt-Peterburg, 2014.

Сведения об авторах:

Цыбиков Намжил Нанзатович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧГМА
Терешков Павел Петрович, канд. мед. наук, зав. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии
Изместьев Сергей Валерьевич, канд. мед. наук, ассистент каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧГМА

Роткина А.С.¹, Пронина И.В.¹, Лазарев В.Н.², Ахаев Д.Н.³, Баскова И.П.³

Дестабилаза-лизоцим-2, оригинальный рекомбинантный тромболитический препарат медицинской пиявки, ингибирует агрегацию тромбоцитов лошади

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

² — ФГБУ «Научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА России, 119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а

³ — ФГБНУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Биологический факультет, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оригинальный рекомбинантный тромболитический препарат Дестабилаза-Лизоцим-2 медицинской пиявки, gene *ds2*(mlDL-Ds2, более чем на 40% ингибирует АДФ-стимулированную PRP агрегацию тромбоцитов лошади. Отмечено ингибирование этим препаратом АДФ стимулированной агрегации отмытых тромбоцитов. **Цель исследования** — оценка способности нового оригинального рекомбинантного тромболитического препарата Дестабилаза-Лизоцим-2 медицинской пиявки ингибировать агрегацию тромбоцитов. **Методика.** Выделение рекомбинантного белка Дестабилазы-Лизоцима-2, ген которого (*ds2* (mlDL-Ds2)) клонировали в клетках *E.coli*, проводили в денатурирующих условиях с использованием металло-хелатной хроматографии с последующей ренатурацией полипептида путем быстрого разбавления в точном соответствии с методикой, описанной в работе Курдюмова А.С. и соавторов (Биоорган. химия (2016) Т.42, С.50—61). Кровь брали из яремной вены лошадей. Исследовали богатую тромбоцитами плазму (Platelet Rich Plasma, PRP) и суспензию отмытых тромбоцитов (Washed Platelets, WP) 18 лошадей. Функциональное состояние тромбоцитов оценивали по их агрегации в PRP и в суспензии WP с помощью двухканальных агрегометров Chrono-Log-700 и Chrono-Log 560, США. В качестве индукторов агрегации использовали АДФ, коллаген III типа и тромбин крови человека. **Результаты.** Впервые продемонстрирована способность вновь синтезированного (см. Курдюмов А.С. и др. (2016) Биоорган. химия, Т.42, С.50—61) тромболитического рекомбинантного фермента Дестабилазы-Лизоцима-2 ингибировать более чем на 40% АДФ-стимулированную PRP агрегацию тромбоцитов и АДФ-стимулированную агрегацию отмытых тромбоцитов крови лошадей. **Заключение.** Способность Дестабилазы-Лизоцима-2 ингибировать агрегацию тромбоцитов расширяет биологические свойства рекомбинантного тромболитического фермента, доклинические испытания которого завершились в конце 2015 г.

Ключевые слова: Дестабилаза-Лизоцим; агрегация тромбоцитов

Для корреспонденции: Баскова Изольда Парфирьевна, доктор биол. наук, проф., вед. науч. сотр. каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: salival1@yandex.ru

Для цитирования: Роткина А.С., Пронина И.В., Лазарев В.Н., Ахаев Д.Н., Баскова И.П. Дестабилаза-лизоцим-2, оригинальный рекомбинантный тромболитический препарат медицинской пиявки ингибирует агрегацию тромбоцитов лошади. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60 (3): 47—51.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Выражаем благодарность академику Кубатиеву А.А. за предоставленную возможность проведения настоящей работы на базе НИИ общей патологии и патофизиологии.

Поступила 24.08.2015

Rotkina A.S.¹, Pronina I.V.¹, Lazarev V.N.², Akhaev D.N.³, Baskova I.P.³

Destabilase-lysozyme-2 — original recombinant thrombolytic preparation of medicinal leech inhibits horse platelets aggregation

¹ — Federal state budgetary scientific institute «Scientific institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, ul. Baltiiskaya, 8

² — FGBU Russia Scientific — Clinical Centrum of Physical-Chemical Medicine FMBA 119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya ul., 1a

³ — FGBNU M.V. Lomonosov Moscow state university, 119991, Biological Faculty, Moscow, Leninskie gori, 1, building 12

The purpose. Identifying the capacity of the medicinal leech novel original recombinant thrombolytic preparation Destabilase-Lysozyme-2 to inhibit the blood platelet aggregation. **Methods.** Gene of destabilase-lysozyme. *ds2* (mlDL-Ds2), was cloned in *E.coli* cells. Recombinant protein was isolated in denaturing conditions using metal-chelate

chromatography followed by denaturation of the polypeptide by rapid dilution in exact accordance with the procedure described by Kurdyumov A.S. et al. (2016, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, v.42, s. 42—52). Blood was collected from the jugular vein of 18 horses. The functional status of platelets in the presence of different destabilase-lysozyme concentrations were evaluated for their aggregation in Platelet Rich Plasma (PRP) and in Washed Platelet suspension (WP) using aggregometers Chrono-Log-700 and Chrono-Log-560, USA560, CIIA. As used aggregation inducers of ADP, collagen type III and human thrombin. **Results.** First demonstrated the ability of newly synthesized (Kurdyumov A.S. et al. 2016, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, v42, s. 42—52) thrombolytic recombinant enzyme destabilase-lysozyme to inhibit more than 40% of ADP-stimulated PRP aggregation and ADP-stimulated aggregation of horse blood washed platelets. **Conclusion.** The ability of destabilase-lysozyme -2 to inhibit platelets aggregation extends biological properties of recombinant thrombolytic enzyme, pre-clinical trials which resulted in the end of 2015.

Keywords: Destabilase-lysozyme, platelets aggregation

For citation: Rotkina A.S., Pronina I.V., Lazarev V.N., Akhaev D.N., Baskova I.P. Destabilase-lysozyme-2 — original recombinant thrombolytic preparation of medicinal leech inhibits horse platelets aggregation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 47—51. (in Russ).

For correspondence: *Isolda P. Baskova*, Doctor of Biological Sciences, Professor, Leading Researcher. Biological Faculty of M.V.Lomonosov Moscow state university, Leninskie Gory, 1, Building 12, Moscow 119991, Russian Federation, e-mail: Saliva1@yandex.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Acknowledgments. We express our deep gratitude to Academician A.A. Kubatiev for the opportunity to conduct this work on the basis of Institute of General Pathology and Pathophysiology, and for his attention to this work.

Received 24.08.2015

Введение

Дестабилаза-Лизоцим-2 медицинской пиявки (mlDL-Ds2) — изопептидаза, единственный известный тромболитический препарат, действие которого направлено на разрушение ϵ -(γ -Glu)-Lys изопептидных связей в стабилизированном фактором XIIIa фибрине, составляющем основу тромба [1]. Фибринолитический механизм действия нативного фермента в составе секрета слюнных клеток медицинской пиявки, впервые был описан в 1985 г. [2]. Позднее была продемонстрирована способность рекомбинантной изопептидазы проявлять лизоцимную активность [3] и ингибировать индуцированную и спонтанную агрегацию тромбоцитов крови человека [4]. Однако используемые в перечисленных выше экспериментах способы получения рекомбинантной дестабилазы, отличались низким выходом целевого белка (около 5 мг на 1 л культуральной жидкости) и несовершенной ренатурацией, что ограничивало исследование ферментативных свойств дестабилазы и препятствовало началу доклинических исследований этого перспективного тромболитического агента. В связи с этим был разработан более эффективный способ наработки, выделения и ренатурации рекомбинантной формы дестабилазы [5]. В результате удалось достичь выхода белка не менее 30 мг в пересчете на литр исходной бактериальной культуры. Получение значительных количеств рекомбинантной дестабилазы позволило более полно охарактеризовать не только фибринолитические свойства

препарата в программе доклинических исследований (Государственный контракт от «01» ноября 2013 г. № 14.N08.11.0016), но и оценить ее способность блокировать агрегацию тромбоцитов плазмы крови млекопитающих. Известно, что именно тромбоциты участвуют в образовании артериальных тромбов, на борьбу с которыми направлено действие изучаемого нами тромболитического фермента. Эту задачу мы предполагали выполнить на тромбоцитах крови лошадей, как наиболее доступный для нас источник тромбоцитов. К тому же их используют в некоторых зарубежных лабораториях именно для изучения механизмов ингибирования агрегации тромбоцитов [6].

Цель исследования — оценка способности нового оригинального рекомбинантного тромболитического препарата Дестабилаза-Лизоцим-2 медицинской пиявки ингибировать агрегацию тромбоцитов.

Методика

Исследования были выполнены на богатой тромбоцитами плазме (Platelet-Rich Plasma, PRP) и суспензии отмытых тромбоцитов (Washed Platelets, WP) крови 18 лошадей. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с требованиями Всемирного Общества Защиты Животных (WSPA) и европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Кровь от лошадей различных пород, содержащихся в стандартных условиях Центрального Московского Ипподрома (ЦМИ), брали из ярёмной вены

с помощью двусторонней иглы 18Gx1 1/2' («Vacuette», Австрия) в вакуумные стерильные пробирки («Vacuette», Австрия). PRP получали по стандартной методике, для получения PRP использовали метод последовательных отмывок [7].

Рекомбинантную дестабилазу получали, как описано в [5]. Рабочие растворы фермента и буфера готовили из лиофильно высушенных препаратов путем добавления бидистиллированной воды. Концентрацию белка в рабочих растворах определяли по оптической плотности при длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop1000 (Thermo Scientific, США). Функциональное состояние тромбоцитов оценивали по их агрегации в PRP и в суспензии тромбоцитов с помощью двухканальных агрегометров (Chrono-Log 700 и Chrono-Log 560, США), используя традиционный турбодиметрический метод Борна [8]. Степень агрегации определяли как максимальное приращение светопропускания после добавления индуктора агрегации, и измеряли в процентах светопропускания. Тестированный рекомбинантный препарат дестабилазы — лизоцима-2 (Дест-Лиз-2), обладающий изопептидазной и лизоцимной активностью [9], использовали в конечных концентрациях — 0,00025 мг/мл, 0,0025 мг/мл, 0,025 мг/мл. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали АДФ (Chrono-Par, США) в конечных концентрациях 0,625—2,5 мкмоль/л, коллаген III типа (Sigma, США) в конечных концентрациях 10—30 мг/мл, тромбин (Chrono-Par, США) активностью 0,04—0,125 Ед/мл.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась методом Стьюдента и по U-критерию Манна—Уитни [10].

Результаты и обсуждение

1. Источник тромбоцитов — PRP

Степень ингибирования рассчитывали, определяя максимальное светопропускание в контроле (буфер) и в опыте. Принимали за 100% светопропускание в контроле и по отношению к нему рассчитывали процент светопропускания в опыте (рис. 1, А). Разница между контролем (100%) и опытом соответствует проценту ингибирования агрегации тромбоцитов, который обеспечивается обозначенной концентрацией Дест-Лиз-2.

На рис. 1 Б демонстрируется способность Дест-Лиз-2 при концентрации белка 0,0025 мг/мл подавлять АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. При увеличении концентрации белка в 10 раз степень ингибирования повышается незначительно (таблица). Однако при использовании коллагена III типа в качестве индуктора агрегации практически отсутствуют различия в эффективности действия тех же самых концентраций Дест-Лиз-2 (рис. 1 В).

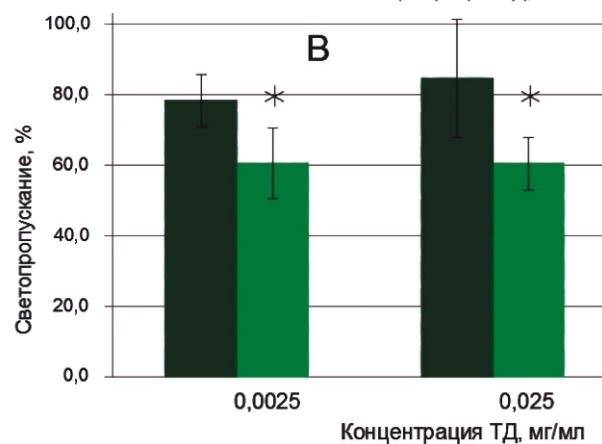
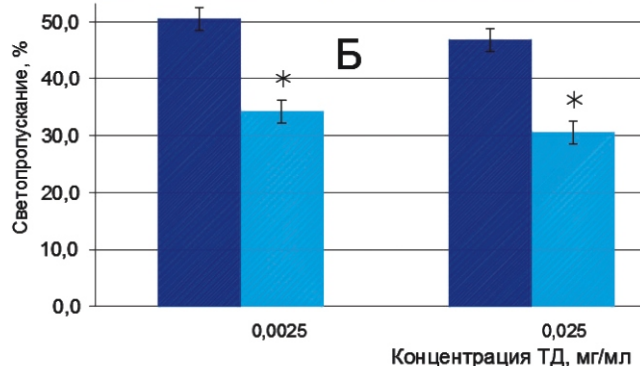
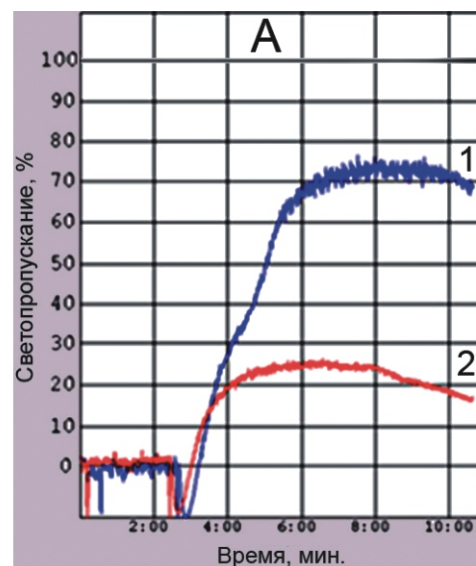


Рис. 1. А — кривые светопропускания, стимулированные АДФ, в зависимости от времени агрегации тромбоцитов в PRP в присутствии Дест-Лиз-2 (0,025 мг/мл) (2) по сравнению с буфером (1); Б — средние значения максимальных значений светопропускания при АДФ-индуцированной PRP агрегации тромбоцитов в присутствии Дест-Лиз-2 (правые столбики) по сравнению с буфером (левые столбики), $n = 14$ для каждой концентрации Дест-Лиз-2; В — то же самое для коллаген-индуцированной PRP агрегации тромбоцитов в присутствии Дест-Лиз-2.

Ингибирование агрегации тромбоцитов различными концентрациями Дест-Лиз-2 (% по отношению к буферу) в условиях PRP и WP при различных агонистах

Индуктор активации / источник тромбоцитов	Концентрация Дест-Лиз-2 (мг/мл)		
	0,00025	0,0025	0,025
ADP / PRP	—	32,4%	36%
Коллаген / PRP	—	23%	29,2%
ADP / WP	29,8%	48%	49,7%
Тромбин / WP	26,8%	15,3%	21,8%

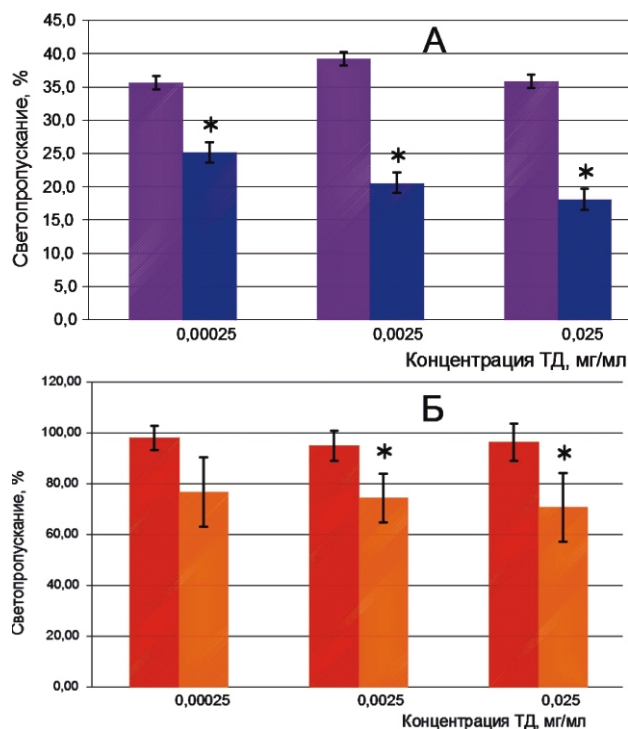


Рис. 2. А – средние значения светопропускания при АДФ-индуцированной агрегации отмытых тромбоцитов в присутствии Дест-Лиз-2 (правые столбики) по сравнению с буфером (левые столбики), $n = 4$, $n = 6$, $n = 7$ для каждой концентрации Дест-Лиз-2 соответственно от меньшей к большей; Б – то же самое для тромбин-индуцированной агрегации WP.

2. Отмытые тромбоциты (WP)

Степень ингибирования агрегации отмытых тромбоцитов мало отличается от таковой при использовании PRP. На рис. 2 представлены средние значения светопропускания при АДФ(А)- и тромбин (Б)-индуцированной агрегации WP в присутствии различных концентраций Дест-Лиз-2.

Полученные результаты представлены в таблице. Максимальное ингибирование агрегации тромбоцитов достигается при использовании АДФ в качестве индуктора, особенно в суспензии отмытых тромбоцитов.

Что касается механизма ингибирования агрегации тромбоцитов Дест-Лиз-2, мы склонны придерживаться мнения, высказанного нами ранее [4] в отношении ингибирования агрегации тромбоцитов нативной дестабилазой. Рекombинантный препарат, как и нативный, проявляет высокую адгезивную способность по отношению к различным поверхностям. Весьма вероятно, что рекombинантный препарат Дест-Лиз-2 защищает рецепторы, расположенные на поверхности клеточной мембраны тромбоцитов от воздействия индукторов различной степени аффинности по отношению к мембране тромбоцитов, ингибируя, таким образом, агрегацию тромбоцитов. Эта способность рекombинантного препарата Дест-Лиз-2, предназначенного для доклинических и клинических испытаний тромболитического фермента, получила подтверждение в экспериментах на тромбоцитах крови лошади.

Список литературы

1. Баскова И.П., Голубых В.Л., Левицкий С.А., Лазарев В.Н., Афанасьева Е.Ю., Завалова Л.Л., Арзамасцев Е.В. Тромболитическое действие бифункционального рекombинантного фермента дестабилазы-лизоцима из медицинской пиявки. *Всероссийская конференция «Тромбозы, кровоточивость, ДИС-синдром: современные подходы к диагностике и лечению»*. Москва; 2010; Прил.8: 5-6.
2. Баскова И.П., Никонов Г.И. Дестабилаза — фермент секрета слюнных желез медицинских пиявок гидролизует изопептидные связи в стабилизированном фибрине. *Биохимия*.1985; 50: 424-431.
3. Zavalova LL., Baskova IP., Lukyanov A.V. et al. Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1478: 69-67.
4. Baskova I., Zavalova L., Berezhnoy S. et al. Inhibition of induced and spontaneous platelet aggregation by destabilase from medicinal leech. *Platelets*. 2000; 11: 83-86.
5. Курдюмов А.С., Манувер В.А., Ахаев Д.Н., Баскова И.П., Лазарев В.Н. Рекombинантная дестабилаза-лизоцим-2 медицинской пиявки, получение и свойства. *Биоорганическая химия*. 2016, 42, 50-61.
6. Roscher K.A, Failing K., Moritz. A. Inhibition of platelet function with clopidogrel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses *Vet J*. 2015 , 203, 332-336.

7. Роткина А. С., Романова Е. П., Московцев А. А., Кубатиев А. А. Динамика изменений АДФ — и тромбин — индуцированной агрегационной активности тромбоцитов в присутствии избытка гомоцистеина *in vitro*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 4: 80-87.

8. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194: 927-929.

9. Завалова Л.Л., Лазарев В.Н., Левицкий С.А. и др. Полифункциональность рекомбинантного белка. *Биохимия*. 2010; 75: 1313-1324.

10. Сидоренко Е. В. *Методы математической обработки в психологии*. СПб.: ООО «Речь», 2007. Available at: <http://www.psychol-ok.ru/statistics/mann-whitney/>

References

1. Baskova I.P., Golubih V.L., Levickii S.A., Lazarev V.N. et al. *Thrombolytic action of bi-funktional enzyme destabilase — lysozyme from medicinal leech*. Russian conference «Thrombosis, Thrombophilias, DIC-syndrom: modern approaches for diagnostic and treatment.» Moscow; 2010; Pri-lozeniye. 8: 5-6.

2. Baskova I.P., Nikonov G.I. Destabilase — enzyme of the medicinal leech salivary gland secretion — hydrolysis isopeptide bonds in stabilyzed fibrin. *Biokhimiya*. 1985; 50: 424-31. (in Russian)

3. Zavalova L.L., Baskova I.P., Lukyanov V.N., et al. Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1478; 69-77.

4. Baskova I.P., Zavalova L.L., Berezhnoy S.A. et al. Inhibition of induced and spontaneous platelet aggregation by destabilase from medicinal leech. *Platelets*. 2000; 11; 83-6.

5. Kurdiymov A.C., Manuvera V.A., Akhaev D.N. et al. Recombinant destabilase — lysozyme-2 of the medicinal leech. Preparations anproperties. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2016; 42; 50-61. (in Russian)

6. Roscher K.A., Failing K.N., Moritz A.B. Inhibition of platelet function with clopidogel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses. *Vet. J*. 2015; 203; 332-6.

7. Rotkina A.S., Romanova E.P., Moskovcev A.A., Kubatiev A.A. Dynamic of change ADP and thrombin induced aggregation activity of thrombocytes in the presence of homocistein excess in vitro. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2012; 4; 80-7. (in Russian)

8. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194; 927-9.

9. Zavalova L.L., Lazarev V.N., Levickii S.A. et al. Poly-funktionality of recombinant protein. *Biokhimiya*. 2010; 75; 1313-24. (in Russian)

10. Sidorenko E.V. *The mathematical processing methods in psychology*. St. Petersburg: Piter; ООО «Rech», 2003. (in Russian)

Сведения об авторах:

Роткина Анна Сергеевна, науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: annanum@mail.ru

Пронина И.В., мл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП

Лазарев Василий Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. генной инженерии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА России, e-mail: lazar0@mail.ru

Ахаев Дмитрий Николаевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. прототипирования и испытаний биотехнологических разработок биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: ahaeff@mail.ru

Коннов В.А., Шаповалов К.Г.

Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с местной холодовой травмой при различном нутритивном статусе

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672000, г.Чита, ул. Горького 39-А

Цель исследования — установление относительного числа и степени лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных с отморожениями конечностей III—IV степени при недостаточности питания и эйтрофии. **Методика.** Проведено нерандомизированное проспективное контролируемое обследование 49 пациентов обоего пола, возрастом от 16 до 60 лет, с отморожениями конечностей III—IV степени. Объектом исследования являлась плазма крови. Пациенты были разделены на 2 группы по состоянию исходного трофического статуса согласно шкале Луфта В.М. и Костюченко А.Л. По оригинальной методике профессора Ю.А. Витковского (1999) подсчитывалось количество лимфоцитарно-тромбоцитарных коагратов на 100 клеток (в процентах), что является относительным числом лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА). При этом за коаграт принимался лимфоцит, адгезировавший на своей поверхности один или более тромбоцитов. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ), или степень ЛТА оценивали, как среднее арифметическое количество тромбоцитов, присоединившихся к одному лимфоциту. **Результаты.** В группе больных с эйтрофией (n = 19) выявлено статистически значимое увеличение относительного числа ЛТА против группы контроля (n = 20) и против группы пациентов с нутритивной недостаточностью (n = 20). Значимых различий в относительном числе ЛТА в группе с недостаточностью питания по сравнению с группой контроля не выявлено. В группе пострадавших с нормальным трофическим статусом установлено статистически значимое увеличение степени ЛТА против группы контроля и группы пациентов с недостаточностью питания. Выявлено значимое увеличение ЛТИ в группе с трофической недостаточностью в сравнении с группой контроля. **Заключение.** Таким образом, у пациентов с глубокими отморожениями конечностей ЛТИ возрастает независимо от преморбидного трофического статуса, а относительное число ЛТА увеличивается только у пострадавших с эйтрофией. У них же степень и процент ЛТА выше, чем у больных с мальнутрицией.

Ключевые слова: отморожение, местная холодовая травма, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия, недостаточность питания

Для корреспонденции: Коннов Валерий Анатольевич, ассистент каф. анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии, e-mail: vlrknv@mail.ru

Для цитирования: Коннов В.А., Шаповалов К.Г. Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с местной холодовой травмой при различном нутритивном статусе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60 (3): 52—56.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 28.01.15

Konnov V.A., Shapovalov K.G.

Lymphocyte-platelet interactions in patients with deep frostbites with various nutritional statuses

Chita State Medical Academy, 39A, Gorky Street, Chita, 672000, Russia

The purpose of the study was to determine the relative number and degree of lymphocyte-platelet adhesion in patients with frostbites of III—IV degree of extremities with malnutrition and eutrophia. **Methods.** Non-randomized prospective controlled study was performed in 49 patients of both sexes, aged from 16 to 60 years, with frostbites of III—IV degree of extremities. The object of the study was the blood plasma. Test subjects were divided into two groups according to the trophic status on the scale of Luft V.M and Kostyuchenko A.L. By the original method of the Professor Vitkovsky Yu.A. (1999) number of lymphocyte-platelet coaggregations was counted in 100 cells (percentage), which is relative number of the lymphocyte-platelet adhesion (LTA). In this case lymphocyte which adhered to its surface one or more platelets was named the coaggregation. Lymphocyte-platelet index (LTI) or the degree of LTA was determined as the arithmetic mean of the

number of platelets which have adhered to a single lymphocyte. **Results.** The relative number of LTA greater in patients with eutrophia ($n = 19$) vs. ($p < 0.001$) the control group ($n = 20$) and vs. ($p = 0.008$) patients with malnutrition ($n = 20$). The relative number of LTA is not different in patients with malnutrition vs. ($p = 0.085$) the control group. LTI greater in patients with eutrophia vs. the control group ($p < 0.001$), and vs. patients with malnutrition ($p = 0.020$). LTI greater in patients with malnutrition vs. the control group ($p = 0.006$). **Conclusion.** It was established that LTI increased irrespective of premorbid trophic status, and LTA percentage increased only in patients with eutrophia. In patients with malnutrition LTA degree and LTA percentage were detected less than in patients with normal nutritional status.

Keywords: frostbite; local cold injury; lymphocyte-to-platelet adherence; lymphocyte-platelet adhesion; malnutrition

For citation: Konnov V.A., Shapovalov K.G. Lymphocyte-platelet interactions in patients with deep frostbites with various nutritional statuses. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 52–56. (in Russ).

For correspondence: Valeriy A. Konnov, Chita State Medical Academy; 39A, Gorky Street, Chita, 672000, Russia, e-mail: vlrknv@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Konnov V.A. — <http://orcid.org/0000-0003-3540-178X>

Shapovalov K.G. — <http://orcid.org/0000-0002-3485-5176>

Received 28.01.15

Введение

Реализация механизмов защиты при криповреждении сосудистой стенки сопровождается повышением адгезивной активности кровяных пластинок к лимфоцитам. Увеличение интенсивности образования лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов прямо пропорционально массиву поврежденных холодом тканей [1]. Одновременно, под действием низких температур возникает спазм и парез сосудов с повреждением эндотелия, альтерацией клеток, обнажением коллагена. Число десквамированных эндотелиоцитов в раннем реактивном периоде местной холодной травмы увеличивается на порядок [2].

Между гемостатическими и воспалительными реакциями при альтерации ткани прослеживаются многочисленные взаимосвязи, в которых ключевым звеном выступают реципрокные отношения полиморфноядерных лейкоцитов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток [3]. Тромбоциты интенсифицируют фагоцитоз через высвобождаемые факторы и за счёт своей ретракции способствуют миграции лимфоцитов через повреждённую сосудистую стенку вглубь ткани [4]. Кровяные пластинки при этом инкретируют множество ростовых факторов, стимулирующих репарацию поражённого участка [4]. В результате развивается тромбоз сосудов и нарушения микроциркуляции, способствующие отграничению очага поражения и запуску саногенных механизмов [3].

У больных с отморожениями конечностей III—IV степени и преморбидной недостаточностью питания количество тромбоцитов в раннем реактивном периоде меньше, чем у пострадавших с эйтро-

фией. В то же время, в позднем реактивном периоде содержание кровяных пластинок у пациентов с различным нутритивным статусом не отличается [5]. При этом неизвестно влияние трофического дефицита на интенсивность лимфоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий у больных с местной холодной травмой.

Цель исследования: установить относительное число и степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных с отморожениями конечностей III—IV степени при недостаточности питания и эйтрофии.

Методика

Нерандомизированное проспективное контролируемое исследование выполнено в «Лаборатории физиологии и патологии иммунитета и гемостаза» НИИ медицинской экологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» (ЧГМА) 49 пациентам обоего пола с местной холодной травмой, поступивших в ГУЗ «Городская клиническая больница №1» г. Читы в 2009—2012 гг. Объектом исследования являлась плазма крови. Работа признана допустимой и рекомендованной к выполнению локальным этическим комитетом при ГБОУ ВПО ЧГМА от 26.11.2010 г.

Возраст пострадавших составлял от 16 до 60 лет. Критерии включения в исследование: отморожение III—IV степени конечностей; госпитализация в дореактивный, ранний и поздний реактивные периоды; форма отморожения от действия сухого мороза, контактные отморожения, возникающие при субкритиче-

ской температуре тканей, форма отморожения по типу траншейной и иммерсионной стопы. Диагноз устанавливался на основании жалоб, анамнеза и локального статуса. Верификация глубокого отморожения не исключала наличия участков поверхностного поражения I—II степени. У всех больных в состав терапии с момента поступления согласно протоколу ведения входили антикоагулянты прямого действия в профилактической дозе.

Критерии исключения из исследования: возраст моложе 16 лет и старше 60 лет, хронический вид местной холодовой травмы, сепсис, печёночная дисфункция. Печёночная недостаточность различной этиологии сопровождается нарушениями регуляции синтеза белков и, сама по себе, является причиной трофического дефицита. При сепсисе синдром гиперметаболизма-гиперкатаболизма является инклюзивным патогенетическим звеном [6] и приводит к госпитальной белково-энергетической недостаточности [7]. Тяжёлый сепсис характеризуется системным повреждением эндотелия [3], и оценка лимфоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий становится некорректной.

Пациенты разделялись на 2 группы по состоянию исходного трофического статуса. Оценка питания проводилась при поступлении по сумме баллов по шкале Луфта В.М. и Костюченко А.Л. [8]. В 1-ю группу вошли 20 пострадавших с недостаточностью питания, сумма баллов у которых не превышала 27 баллов. Группу 2-ю составили 19 больных с эйтрофией (28—30 баллов). Контрольная группа включала 20 здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту.

Относительное число лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) в процентах и степень ЛТА, или лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ) рассчитывались по оригинальной методике профессора Ю.А. Витковского [9]. Забор крови испытуемого проводился из вены предплечья или локтевого сгиба без применения турникетной компрессии объёмом 5,0 мл в пробирку Monovette производства Sarstedt AG (Germany), содержащую 3,2% раствор цитрата натрия. Забор крови осуществлялся с 08-00 до 09-00 ч (до приёма пищи).

Для получения общего пула лимфоцитов кровь наслаивалась на градиент урографин-фикол с плотностью 1,077 и центрифугировалась при 1500 об./мин в течение 40 мин. Седиментированное интерфазное кольцо, содержащее лимфоциты и кровяные пластинки снималось пастеровской пипеткой (дозатором). Полученная клеточная взвесь промывалась фосфатно-солевым буфером pH 7,4 и центрифугировалась при 1500 об./мин в течение 4 мин. Надосадочная жидкость сливалась. Осадок ресу-

спендировали и микроскопировали в камере Горяева. Подсчитывали количество лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток (в процентах), что является относительным числом ЛТА. При этом за коагрегат принимался лимфоцит, адгезировавший на своей поверхности 1 или более тромбоцитов. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (или степень ЛТА) оценивался, как среднее арифметическое количество тромбоцитов, присоединившихся к одному лимфоциту.

Результаты исследования обработаны с помощью программ Biostat 2009 Professional 5.8.4 и Microsoft Excel 2007. При сравнении групп использовался критерий Манна—Уитни с указанием точного значения статистической значимости (p). Данные представлены доверительным интервалом.

Результаты и обсуждение

В группе больных с эйтрофией ($n = 19$) выявлено статистически значимое увеличение (рис. 1) относительного числа ЛТА против группы контроля ($n = 20$) и группы пациентов с нутритивной недостаточностью ($n = 20$). Наряду с этим, не было выявлено статистически значимых различий в относительном числе ЛТА в группе с недостаточностью питания в сравнении с относительным числом ЛТА группы контроля (рис. 1).

В группе пострадавших с нормальным трофическим статусом установлено значимое увеличение степени ЛТА (рис. 2) против группы сравнения и группы пациентов с недостаточностью питания. Выявлено существенное увеличение ЛТИ в группе с трофической недостаточностью в сравнении с группой контроля (рис. 2).

Таким образом, у больных с местной холодовой травмой лишь при отсутствии трофической недостаточности возрастает относительное количество лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов. Вместе с тем, степень ЛТА остаётся увеличенной в сравнении со здоровыми людьми как у пациентов с эйтрофией, так и при недостаточности питания. Несмотря на это, ЛТИ, а, следовательно, и интенсивность лимфоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий выше при нормальном трофическом статусе и большем количестве тромбоцитов [5] в раннем реактивном периоде.

Известно, что дисцитокинемия модулирует феномен ЛТА у различных групп пациентов [10—13]. В нашем случае преморбидная трофическая недостаточность не триггирована гиперкатаболизмом, как частью генерализованного воспалительного ответа, следовательно, отсутствует системное влияние медиаторов воспаления. Этим возможно объяснить незначи-

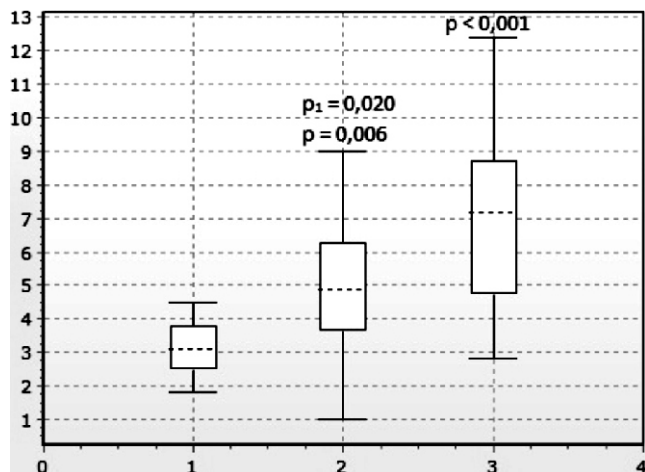


Рис. 1. Относительное число ЛТА (%) в крови пациентов с эйтрофией и недостаточностью питания при отморожении конечностей III–IV степени (минимальное значение, 25-й процентиль, медиана, 75-й процентиль и максимальное значение). 1 – группа контроля (n = 20); 2 – группа № 1 (пациенты с недостаточностью питания, n = 20); 3 – группа № 2 (пациенты с эйтрофией, n = 19); p – статистическая значимость различий с контролем; p₁ – статистическая значимость различий между группами № 1 и № 2.

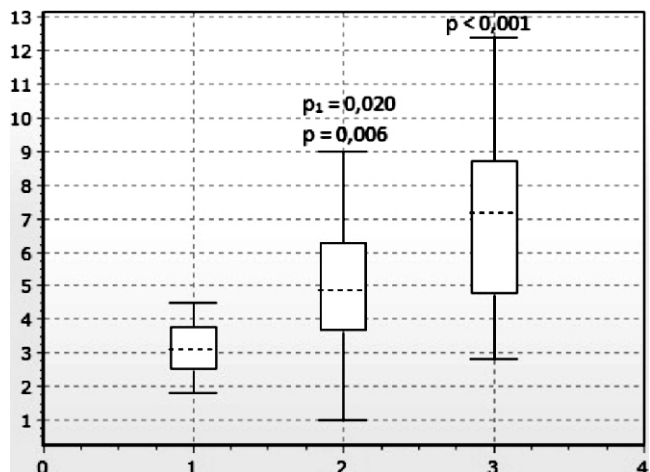


Рис. 2. Степень ЛТА в крови пациентов с эйтрофией и недостаточностью питания при отморожении конечностей III–IV степени (минимальное значение, 25-й процентиль, медиана, 75-й процентиль и максимальное значение). 1 – группа контроля (n = 20); 2 – группа № 1 (пациенты с недостаточностью питания, n = 20); 3 – группа № 2 (пациенты с эйтрофией, n = 19); p – статистическая значимость различий с контролем; p₁ – статистическая значимость различий между группами № 1 и № 2.

тельный рост относительного числа и меньшую степень ЛТА у пострадавших с мальнутрицией.

В то время, у больных стенокардией, получающих антикоагулянтную терапию по традиционной схеме, в циркулирующей крови снижается относительное число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, вероятно, за счёт повышенного перемещения активированных лимфоцитов и кровяных пластинок через сосудистую стенку [14]. Вместе с тем, при назначении таким пациентам небольших доз аспирина, ингибирующих тромбоцитарную циклооксигеназу, уменьшается синтез тромбоксана A₂ (ТХА₂), агрегационное действие которого проявляется при повреждённой сосудистой стенке [3]. В результате снижается контакт коагрегатов с эндотелием, и процент ЛТА в плазме не отличается от нормальных показателей [14].

Согласно нашим наблюдениям, недостаточность питания у пациентов с местной холодовой травмой III–IV степени детектируется увеличением содержания в крови одного из птеридинов — неоптерина [15]. Известно, что модуляция неоптерином внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса активирует транслокацию транскрипционного фактора NF-κB внутрь клеточного ядра с последующей экспрессией протромботических медиаторов [16].

Возможно экстраполировать преобладание циклооксигеназного пути в тромбоцитах с последующей гиперагрегацией у больных со стенокардией, не получающих небольшие дозы аспирина, на генерацию

ТХА₂, основного эффектора агрегации кровяных пластинок, индуцированного неоптерином у истощённых больных с глубоким отморожением. В обоих случаях имеет место повреждение сосудистой стенки, значительный контакт лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов с коллагеном, повышенная миграция их в ткани, и, следовательно, уменьшение относительного числа ЛТА в циркулирующей крови.

Выводы

1. В крови больных с глубоким отморожением конечностей увеличивается степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии независимо от преморбидного нутритивного статуса.
2. Лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс в плазме пациентов с местной холодовой травмой III–IV степени при мальнутриции меньше, чем у пострадавших с эйтрофией.
3. У больных с глубоким отморожением конечностей относительное число лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии возрастает в крови только при нормальном трофическом статусе.

References

1. Shapovalov K.G., Tomina E.A., Mikhailichenko M.I., Vitkovsky Yu.A. The role of lymphocyte-platelet adhesions, cytokines and endothelial dysfunction in pathogenesis of cold-induced damage. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2009; 1: 39-40. (in Russian)

2. Shapovalov K.G., Tomina E.A., Mikhailichenko M.I., Sizonenko V.A., Vitkovsky Yu.A. Damage of endothelial cells and cytokine levels in the blood of patients at different periods of local cold injury. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2008;1: 35-7. (in Russian)
3. Kuznik B.I. Cellular and molecular mechanisms of regulation of the hemostatic system in health and disease. [*Kletochnyye i molekulyarnyye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii*]. Chita; 2010. (in Russian)
4. Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.N. Pathogenetic significance of lymphocyte-to-platelet adherence. *Medit-sinskaya immunologiya*. 2006; 8(5-6): 745-53. (in Russian)
5. Konnov V.A., Shapovalov K.G. Parameters of vascular-platelet hemostasis and plasma-coagulation hemostasis. *Skoraya meditsinskaya pomoshch'*. 2011; 3: 34-8. (in Russian)
6. Modern conception of nutritional support in critically ill. 5 key issues. *Intensivnaya terapiya*. 2005; 1. Available at: <http://icj.ru/journal/number-1-2005/14-sovremennaya-koncepciya-nutritivnoy-podderzhki-pri-kriticheskikh-sostoyaniyah-5-klyuchevyh-problem.html> (Accessed June 9, 2014). (in Russian)
7. Luft V.M., Bagnenko S.F., Shcherbin Yu.A., eds. Clinical nutrition patients in intensive care: Practical Guide. [*Klinicheskoe pitanie bol'nykh v intensivnoy meditsine: prakticheskoe rukovodstvo*]. Saint Petersburg; 2010. (in Russian)
8. Parenteral nutrition in intensive care and surgery: guidelines of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation on August 29, 2006 № 4630. [Parenteral'noe pitanie v intensivnoy terapii i khirurgii: metodicheskie rekomendatsii Ministerstvava zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya Rossiyskoy Federatsii ot 29 avgusta 2006 g. № 4630]. Moscow; 2006. (in Russian)
9. Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.N. Phenomenon of lymphocyte-thrombocyte rosette formation. *Immunologiya*. 1999; 4: 35-7. (in Russian)
10. Gergesova E.E., Vitkovsky Yu.A., Solpov A.N. Platelet aggregation, lymphocyte-platelet adhesion in different AB0 blood groups in patients with influenza A (H1N1) / 2009. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2011; 1: 4-9. (in Russian)
11. Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A. Lymphocyte-platelet adhesion and pro-inflammatory cytokines contents in patients with erysipelas. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 27(1): 57-9. (in Russian)
12. Epifanceva N.V., Vitkovsky Yu.A. The link between lymphocyte-platelet adhesion and cytokines in children with pertussis infection. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2011; 2: 98-103. (in Russian)
13. Knyazeva A.S., Strambovskaia N.N. Aggregation activity of platelets and formation of lymphocyte-platelet aggregates at carriers of cytokine genetic polymorphism of patients with chronic ischemia of brain. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2014; 1: 32-38. (in Russian)
14. Romanyuk S.V., Vitkovsky Yu.A., Solpov A.N. Lymphocyte-platelet adhesion in patients with angina and acute coronary syndrome. *Sovremennyye nauchnyye issledovaniya i innovatsii*. 2012; 11. Available at: <http://web.snauka.ru/issues/2012/11/18607> (Accessed June 9, 2014). (in Russian)
15. Konnov V.A., Shapovalov K.G. The level of mediators of the immune response in blood of patients with local cold injury and premorbid malnutrition. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2014; 11(5): 34-9. (in Russian)
16. Pacileo M., Cirillo P., De Rosa S., Ucci G., Pettilo G., Musto D'Amore S. *et al.* The role of neopterin in cardiovascular disease. *Monaldi Arch. Chest Dis*. 2007; 2(68): 68-73.

Сведения об авторах:

Шаповалов Константин Геннадьевич, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии

Невидимова Т.И., Мастерова Е.И., Савочкина Д.Н., Бохан Н.А.

Цитокинопосредованные изменения болевой чувствительности в оценке предрасположенности к формированию зависимости от психоактивных веществ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья», 634014, г.Томск, ул. Алеутская, д. 4

Цель исследования: оценить вне- и внутриклеточную продукцию цитокинов клетками крови и взаимосвязь уровня цитокинов с болевой чувствительностью на разных этапах формирования зависимости. **Методика.** С помощью классического и мультиплексного иммуноферментного анализа, проточной цитометрии, тензоалгометрии, визуально-аналоговой шкалы исследована взаимосвязь продукции цитокинов с болевой чувствительностью у 34 лиц с зависимостью от психоактивных веществ (ПАВ), 12 эпизодических потребителей ПАВ и 20 контрольных лиц. **Результаты.** Цитокиновый профиль взаимосвязан с клиническими параметрами и болевой чувствительностью у зависимых от ПАВ лиц, в наибольшей степени это характерно для ИЛ-6 и ИЛ-1 β . Продукция ИЛ-10 повышается при эпизодическом и систематическом потреблении ПАВ. Эпизодическое потребление ПАВ связано с активацией внутриклеточного синтеза ИЛ-6. Оба параметра предположительно влияют на эмоциональную оценку боли. **Заключение.** Для оценки предрасположенности к формированию зависимости от ПАВ наиболее информативен баланс вне- и внутриклеточной продукции ИЛ-6 и ИЛ-10 в совокупности с результатами алгометрии.

Ключевые слова: цитокины; алгометрия; зависимость

Для корреспонденции: Невидимова Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, e-mail: nevidimova@yandex.ru

Для цитирования: Невидимова Т.И., Мастерова Е.И., Савочкина Д.Н., Бохан Н.А. Цитокинопосредованные изменения болевой чувствительности в оценке предрасположенности к формированию зависимости от психоактивных веществ. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 57–60.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00183).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.05.2016

Nevidimova T.I., Masterova E.I., Savochkina D.N., Bokhan N.A.

Cytokine mediated changes of pain sensitivity in predisposition to substance dependence

Mental Health Research Institute, 4, ul. Aleutskaya, Tomsk, 634014, Russia

The purpose of study was evaluation of extra- and intracellular cytokine production in blood cultures and cytokine-pain relationship at different stages of addiction. **Methods.** Classic and multiplex enzyme immunoassay, flow cytometry, algometry, visual analogue scale were used in 34 abusers, 12 users and 20 control subjects. **Results.** Cytokine profile correlated with clinical parameters and pain sensitivity in abusers (mostly IL-6 and IL-1 β). IL-10 production is increased in episodic and systematic users. Activation of intracellular IL-6 synthesis was found in users. Both parameters are expected to affect the emotional evaluation of pain. **Conclusion.** To assess the predisposition to substance dependence most informative are balance of extra- and intracellular production of IL-6 and IL-10 and algometry.

Keywords: cytokines; algometry; addiction.

For citation: Nevidimova T.I., Masterova E.I., Savochkina D.N., Bokhan N.A. Cytokine mediated changes of pain sensitivity in predisposition to substance dependence. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (3): 57–60. (in Russ).

For correspondence: Tatyana I. Nevidimova, Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher, Mental Health Research Institute; 4, ul. Aleutskaya, Tomsk, 634014, Russian Federation, e-mail: nevidimova@yandex.ru

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

Funding. The study was supported by Russian Science Foundation grant 14-15-00183.

Information about authors:

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

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

Введение

Среди иммунобиологических компонентов зависимости от психоактивных веществ (ПАВ) в литературе последних лет обсуждаются механизмы нейровоспаления [1, 2]. В частности, опиоиды могут индуцировать гипералгезию посредством воздействия на глиальную продукцию цитокинов. Этот механизм может участвовать в формировании толерантности к ПАВ и зависимости от них. Предрасположенность к аддиктивному поведению сопряжена с возрастанием потребности в сенсорной стимуляции, стремлении к поиску новых ощущений, нередко связанных с риском. Цитокины способны влиять на структуры мозга, связанные с регуляцией мотивации и поведения, в том числе поведения зависимого [3, 4]. Предполагается их участие в регуляции ноцицепции и влияния на систему награды, поскольку существует общность нейроиммунных механизмов болевых синдромов и зависимости [5].

Цель исследования: оценка вне- и внутриклеточной продукции цитокинов клетками крови и взаимосвязь уровня цитокинов с болевой чувствительностью на разных этапах формирования зависимости.

Методика

Обследовано 66 лиц мужского пола (средний возраст 20 лет): 20 условно здоровых лиц (контрольная группа лиц, употребляющих психоактивные вещества (ПАВ) случайно, либо совсем их не употребляющие), 12 эпизодических потребителей ПАВ (условная группа риска — лица, употребляющие никотин и употребляющие алкоголь чаще 1 раза в неделю и/или имеющие единичные наркотические эпизоды), 34 наркологических пациента — лиц с психическими и поведенческими расстройствами вследствие употребления психоактивных веществ — F1x.2 по МКБ-10 (зависимые от ПАВ). Большую часть зависимых от ПАВ (более 70%) составили лица с синдромом зависимости от опиоидов. Клиническими базами исследований явились клиника НИИ психического здоровья, ОГБУЗ «Томский областной наркологический диспансер», наркологические диспансеры городов Сибирского федерального округа (Кемерово, Юрга). Набор условно здоровых лиц и лиц группы риска проводили в учреждениях образования г.Томска. Исследование проводили с соблюдением принципов Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации. На участие в исследовании от каждого взрослого пациента и добровольца было получено письменное информированное согласие, от подростков — согласие родителей или опекунов.

Изучена продукция цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10, ИНФ- γ , ФНО- α) иммунокомпетентными

клетками. С помощью стандартного иммуноферментного анализа и мультиплексной технологии исследованы супернатанты индуцированных липополисахаридом (Sigma) культур цельной крови, и пробы, полученные с помощью наборов «Цитокин-стимул-бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово), содержащих смесь поликлональных активаторов (липополисахарида, конканавалина А, фитогемагглютинина) для митогенной стимуляции клеток цельной крови. На мультиплексном анализаторе Luminex 200 (США) использовали наборы реагентов Human Cyto/Chemokine (Merck Millipore). Внутриклеточное содержание ИЛ-6 оценивали в мононуклеарах культур цельной крови интактных и стимулированных LPS. Исследование проводили на проточном цитофлюориметре FACS Calibur (BD, США) с использованием набора реагентов BD Cytotfix/Cytoperm Plus. Для предотвращения выхода цитокина из клетки применяли брэфелдин А. Результаты выражали в относительном количестве (%) CD14+ моноцитов, продуцирующих ИЛ-6.

С помощью тензоалгометрии оценивали пороги болевой чувствительности: минимальное болевое ощущение, которое субъект в состоянии распознать (нижний болевой порог) и порог переносимости боли (верхний болевой порог) [3]. Результаты выражали в условных единицах. Эмоциональное отношение к боли определяли с помощью визуально-аналоговой шкалы (ВАШ). При исследовании эмоционального отношения к боли начальная точка (0) отображает отсутствие боли, а конечная (10) — невыносимые болевые ощущения. Испытуемому предлагалось отобразить интенсивность боли в момент обследования в виде отметки на определенном отрезке шкалы. Результаты исследования болевой чувствительности выражались в условных единицах. Статистическая обработка осуществлялась с использованием критерия Манна—Уитни, коэффициента ранговой корреляции Спирмена, кластерного анализа.

Результаты и обсуждение

У лиц с зависимостью от ПАВ в период абстинентного синдрома выявлено статистически значимое снижение верхнего болевого порога по сравнению с контролем: медианы составили 11,0 и 13,0 ед., соответственно. Периоды постабстинентного состояния и вынужденной ремиссии сопровождалась статистически значимым повышением нижнего болевого порога до 9,8 и 11,2 ед., что превышало контрольный уровень (медиана 7,9 ед.)

Таким образом, изменения болевой чувствительности у зависимых от ПАВ лиц сопряжены с динамикой болезни: в период абстиненции наблюдается ее

возрастание, постабстинентное состояние и вынужденная ремиссия сопровождаются снижением болевой чувствительности. Формирование зависимости от ПАВ сопровождается снижением выработки интерферона-гамма, ростом продукции про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-10). Продукция ИЛ-10 повышается уже на этапе эпизодического употребления ПАВ (табл. 1), равно как и внутриклеточный синтез ИЛ-6. Обнаружено статистически значимое повышение в стимулированных культурах содержания CD14⁺ моноцитов с внутриклеточной продукцией ИЛ-6 у эпизодических потребителей ПАВ по сравнению с зависимыми от ПАВ пациентами [42,0 (23,0; 49,0) и 20,0 (13,0; 36,0)%; ($p = 0,046$); в контроле 26,0 (17,0; 44,0)%].

Поскольку на этом этапе не удалось выявить сопряженности результатов алгометрии с продукцией цитокинов, проводился сравнительный анализ клинико-anamnestических показателей в группах, различающихся возрастом обследованных (табл. 2) и уровнями продукции ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-1 β . Наиболее интересной возрастной особенностью было снижение переносимости боли у подростков, зависимых от ПАВ, на фоне максимальной продукции ИЛ-6.

С помощью кластерного анализа были сформированы и изучены группы зависимых от ПАВ лиц мужского пола с высоким (выше контрольного) [327,4 (215,1; 892,0) пг/мл и 214,6 (200,0; 221,0) пг/мл, $p < 0,05$] и средним (равным контрольному) [219,4 (217,7; 239,9) пг/мл и 214,6 (200,0; 221,0) пг/мл, $p < 0,05$] уровнем продукции данного цитокина. Оценка болевой чувствительности выявила у зависимых потребителей ПАВ с высоким уровнем продукции ИЛ-1 β возрастание нижнего и верхнего болевого порога по сравнению с зависимыми от ПАВ лицами со средним уровнем продукции ИЛ-1 β . Обнаружены тенденция к возрастанию толерантности к ПАВ и снижение возраста манифестации абстинентного синдрома у зависимых от опиоидов лиц со средним уровнем продукции ИЛ-1 β по сравнению с зависимыми от опиоидов с высоким уровнем продукции ИЛ-1 β . Выявленные особенности могут свидетельствовать о том, что для лиц с нетяжелым течением опиоидной зависимости характерно увеличение уровня продукции ИЛ-1 β , сочетающееся со снижением болевой чувствительности. При возрастании тяжести синдрома зависимости от опиоидов наблюдается отсутствие изменений уровня продукции ИЛ-1 β и болевой чув-

Таблица 1

Спонтанная и стимулированная продукция цитокинов в обследованных группах [Median (LQ; UQ)]

Показатели	Контрольная группа (n = 20)	Эпизодические потребители ПАВ (n = 12)	Зависимые от ПАВ лица (n = 34)
ИЛ10 спонт., пкг/мл	6,40 (5,98; 8,00)	5,98 (3,75; 6,81)	5,98 (3,75; 6,81)
ИЛ10 стим., пкг/мл	307,82 (282,63; 461,40)	711,54 (423,55; 984,62) *	485,82 (377,45; 712,89) *
INF γ спонт., пкг/мл	1,21 (0,42; 2,68)	0,69 (0,13; 8,49)	0,69 (0,13; 2,44)
INF γ стим., пкг/мл	1726,36 (955,64; 2932,75)	1582,10 (414,96; 2159,75)	447,37 ** (186,34; 548,24)

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой; * — $p < 0,05$ при сравнении с эпизодическими потребителями ПАВ.

Таблица 2

Влияние возраста на продукцию цитокинов и результаты алгометрии [Median (LQ, UQ)]

Показатели		Контрольная группа (n = 20)	Эпизодические потребители ПАВ (n = 12)	Зависимые от ПАВ лица (n = 34)
ФНО- α , пг/мл	1	647,14 (318,2; 744,3)	854,3 (687,1; 1011,9)	439,4 (199,5; 688,6)
	2	765,4 (566,3; 865,1)	565,8 (528,2; 858,9)	392,4 (60,0; 700,3)
ИЛ-6, пг/мл	1	2372,9 (1931,4; 2766,3)	2345,1 (2073,8; 2622,6)	3564,4 (3127,8; 3620,0)* ^x
	2	2391,8 (1826,7; 3226,3)	2086,6 (1121,7; 3602,0)	3138,7 (2441,2; 3851,7)*
ИЛ-1 β , пг/мл	1	265,1 (212,6; 446,5)	363,5 (211,9; 514,9)	585,3 (223,1; 1200,0)
	2	216,3 (199,9; 221,4)	216,1 (120,8; 2739,4)	221,8 (217,7; 751,6)*
Нижний болевой порог, усл.ед.	1	10,0 (7,5; 13,0)	10,0 (8,0; 13,0)	12,0 (10,0; 13,0)
	2	5,0 (3,0; 14,0)	10,0 (9,0; 12,0)	10,0 (8,0; 13,0)*
Верхний болевой порог, усл.ед.	1	16,0 (14,0; 17,5)	16,0 (15,0; 16,0)	15,0 (14,0; 16,0)*
	2	15,0 (12,0; 17,0)	14,5 (13,5; 18,0)	15,0 (15,0; 17,0)
Эмоциональная оценка боли, усл.ед.	1	4,0 (2,5; 6,0)	4,3 (3,2; 5,8)	6,0 (4,0; 8,0)*
	2	5,0 (4,5; 6,5)	6,0 (5,0; 8,0)	6,0 (4,0; 7,0)

Примечание. 1 — лица подросткового возраста (14—19 лет); 2 — лица юношеского возраста (20—24 года); * — $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой; ^x — $p < 0,05$ при сравнении с эпизодическими потребителями ПАВ соответствующего возраста.

ствительности при наличии сдвигов продукции ФНО- α и ИЛ-6.

Были выделены группы зависимых от ПАВ лиц с низким (ниже контрольного) [434,1 (291,1; 525,4) пг/мл и 700,0 (503,9; 950,0) пг/мл, $p < 0,05$] и средним (равным контрольному) [(904,5 (688,6; 971,0) пг/мл и 700,0 (503,9; 950,0) пг/мл] уровнями продукции ФНО- α [Median (LQ, UQ)]. При оценке болевой чувствительности у зависимых от ПАВ лиц с низким уровнем продукции ФНО- α отмечено снижение нижнего и верхнего болевого порога по сравнению с зависимыми потребителями ПАВ со средним уровнем продукции ФНО- α . Снижение болевой чувствительности у зависимых от ПАВ лиц со средним уровнем продукции ФНО- α указывает на то, что данный цитокин не оказывает влияние на изменения ноцицепции у зависимых потребителей ПАВ.

Оценка вклада ИЛ-6 в закономерности психонейроиммунологического реагирования у зависимых от ПАВ лиц проводилась в группах с высоким (выше контрольного) [3531, 6 (3180,8; 3813,9) пг/мл и 2413,7 (1931,0; 3249,0) пг/мл, $p < 0,05$] и средним (равным контрольному) [2590, 5 (2349,8; 3035,5) пг/мл и 2413,7 (1931,0; 3249,0) пг/мл] уровнями продукции данного цитокина [Median (LQ, UQ)]. Исследование болевой чувствительности позволило выявить у зависимых от ПАВ лиц с высоким уровнем продукции ИЛ-6 возрастание нижнего болевого порога и эмоциональной оценки болевой чувствительности по сравнению с зависимыми потребителями ПАВ со средним уровнем продукции ИЛ-6.

Таким образом, цитокиновый профиль взаимосвязан с клинико-сенсорными параметрами у зависимых от ПАВ лиц, в наибольшей степени это влияние отмечено для ИЛ-6 и ИЛ-1 β . При этом ИЛ-6 у зависимых потребителей ПАВ и ИЛ-1 β у лиц с синдро-

мом зависимости от опиоидов влияют на уровни продукции других цитокинов и болевую чувствительность. Следующим шагом была оценка внутриклеточного содержания ИЛ-6. Лишь в контроле обнаруживается обратная связь между содержанием внутриклеточного ИЛ-6 в спонтанных и стимулированных культурах и эмоциональной оценкой боли (коэффициент корреляции Спирмена $R_s = 0,6$), в группе эпизодических потребителей эта связь слабая ($R_s = 0,3$), а в группе зависимых от ПАВ лиц такая связь не обнаруживается. Эпизодическое потребление психоактивных веществ сопровождается повышением продукции ИЛ-10, причем спонтанная продукция этого цитокина прямо коррелирует с эмоциональной оценкой боли. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего анализа предрасположенности к зависимости от психоактивных веществ.

References

1. Beumer W. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J Leukocyte Biology*. 2012; 92: 959-75.
2. Wang X., Hutchinson M.R., Watkins L.R., Yin H. Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *PNAS*. 2012; 109 (16): 6325-30.
3. Bokhan N.A., Masterova E.I., Nevidimova T.I. *Psychoneuroimmunological patterns of addiction*. [Psihoneuroimmunologicheskie patterny zavisimosti] Tomsk: Ivan Fedorov, 2016. (In Russian)
4. Nevidimova T.I., Batukhtina E.I., Vetlugina T.P., Savochkina D.N., Nikitina V.B., Bokhan N.A. Association between cytokine production, level of hormones and sensory reactions in the formation of substance dependence in males. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 159 (6): 744-8. (In Russian)
5. Evseev V.A., Davydova T.V., Vetrilje L.A., Grekova N.A., Fomina V.G. Common neuroimmune mechanisms of addiction, alcoholism, epilepsy, neurogenic pain syndromes. *Vestnik RAMN*. 2006; 7: 38-43. (In Russian)

Сведения об авторах:

Мастерова Елена Ивановна, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. отд-ния аддиктивных состояний, руководитель сектора психофизиологии сенсорных систем, e-mail: actro@yandex.ru

Савочкина Дарья Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, e-mail: kokodasha@yandex.ru

Бохан Николай Александрович, доктор мед. наук, проф., член-кор. РАН, засл. деятель науки РФ, директор, e-mail: redo@mail.tomsknet.ru

Гордиенко А.И., Белоглазов В.А., Кубышкин А.В.

Дисбаланс показателей гуморального антиэндотоксинового иммунитета и низкоинтенсивное воспаление при сахарном диабете 1 и 2 типа

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

Цель исследования — определение содержания сывороточных антиэндотоксिनотических антител разных классов у больных сахарным диабетом 1 и 2 типа с анализом взаимосвязей между уровнями антител и концентрацией С-реактивного белка в крови. **Методика.** Проведено лабораторное обследование больных сахарным диабетом 1 типа (n = 51) и 2 типа (n = 60). Диагноз «сахарный диабет 1 или 2 типа» был поставлен в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения. В контрольную группу вошло 49 здоровых лиц, у которых в анамнезе не было каких-либо хронических заболеваний, а на момент обследования отсутствовали клинические проявления острой инфекционной патологии. По полу и возрасту группа контроля соответствовала группам больных сахарным диабетом. У всех обследованных методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию С-реактивного белка в крови и уровни сывороточных антиэндотоксिनотических антител классов А, М и G. **Результаты.** С помощью кластерного анализа установлено, что у 40,8% больных сахарным диабетом 1 типа повышенная концентрация С-реактивного белка в крови ассоциирована с существенным снижением уровней сывороточных антиэндотоксिनотических антител классов А, М и G. У 56,7% больных сахарным диабетом 2 типа с повышенной концентрацией С-реактивного белка в уровне сывороточных антиэндотоксिनотических антител классов А и М статистически значимых отличий от нормы не выявлено, а уровни антиэндотоксिनотических антител класса G были статистически значимо повышены. Вместе с тем, активизация воспаления с дальнейшим возрастанием содержания С-реактивного белка в крови у больных сахарным диабетом 2 типа сопровождается значительным увеличением уровней сывороточных антиэндотоксिनотических антител классов А и G, а также тенденцией к снижению уровней антиэндотоксिनотических антител класса М. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о наличии взаимосвязей между низкоинтенсивным воспалением и иммунным ответом на эндотоксины энтеробактерий при сахарном диабете 1 и 2 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет, воспаление, эндотоксин, антиэндотоксिनотические антитела, С-реактивный белок

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

Для цитирования: Гордиенко А.И., Белоглазов В.А., Кубышкин А.В. Дисбаланс показателей гуморального антиэндотоксिनотического иммунитета и низкоинтенсивное воспаление при сахарном диабете 1 и 2 типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 61–67.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.04.2016

Gordienko A.I., Beloglazov V.A., Kubyshkin A.V.

Changes of humoral anti-endotoxin immunity and low-intensity inflammation in diabetes mellitus type 1 and 2

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

The purpose. Investigate the levels of different classes serum anti-endotoxin antibodies in patients with diabetes mellitus type 1 and 2 and to hold the cluster analysis of the relationship between the individual levels of such antibodies and the concentration of C-reactive protein in the blood. **Methods.** We examined 51 patients with diabetes mellitus type 1 and 60 patients with diabetes mellitus type 2. The diagnosis of diabetes mellitus type 1 or type 2 has been delivered in accordance with the criteria of the World Health Organization. The control group included 49 healthy people who have not a history of any chronic disease, and the clinical manifestations of acute diseases were absent at the time of the survey. By sex and age, the control group of healthy people matched to a group of patients with diabetes type 1 and type 2. The concentration of C-reactive protein in the blood and the levels of serum anti-endotoxin antibodies of different classes (A, M and G) was determined by ELISA. **Results.** Using cluster analysis revealed that 40.8% of patients with type 1 diabetes increased concentration of C-reactive protein in the blood is associated with a significant reduction of levels of serum anti-endotoxin antibodies.

ies classes A, M and G. In 56.7% of patients with type 2 diabetes the high concentration of C-reactive protein in the blood levels of serum anti-endotoxin antibody classes A and M were not significantly different from the normal values, but the levels of serum anti-endotoxin antibodies of class G were significantly increased. The activation of inflammation with a further increase of C-reactive protein in the blood of patients with type 2 diabetes mellitus accompanied by a significant increase in levels of serum anti-endotoxin antibodies classes A and G, and also a tendency to reduce of levels anti-endotoxin antibodies class M. **Conclusion.** The results suggest about the relationship between low-intensity inflammation and immune response to enterobacterial endotoxins in patients with diabetes mellitus type 1 and 2.

Keywords: diabetes mellitus; inflammation; endotoxin; anti-endotoxin antibodies; C-reactive protein

For citation: Gordienko A.I., Beloglazov V.A., Kubyshkin A.V. Changes of humoral anti-endotoxin immunity and low-intensity inflammation in diabetes mellitus type 1 and 2. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 61–67. (in Russ).

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

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Gordienko A.I, 0000-0002-1475-6138

Beloglazov V.A., <http://orcid.org/0000-0001-9640-754X>

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

Received 01.04.2016

Введение

Сердечно-сосудистые осложнения при сахарном диабете (СД) являются основной причиной инвалидизации и летальности [1]. При этом дисфункцию эндотелия и быстрое прогрессирование атеросклеротических изменений связывают с хроническими низкоинтенсивными воспалительными процессами (ХНВП) в интима сосудов [2]. Одним из экзогенных факторов, способных поддерживать ХНВП при многих патологических процессах, может быть эндотоксин (ЭТ) кишечного происхождения [3–5]. По данным литературы, у значительной части (до 80%) больных СД диагностируется широкий спектр гастроэнтерологических расстройств [6], вследствие нарушения целостности кишечного барьера и избыточного попадания ЭТ в порталный и системный кровотоки [7].

В нейтрализации биологической активности ЭТ, его клиренсе и предотвращении развития эндотоксиновой агрессии (ЭА) важную роль играют иммунные механизмы, реализуемые при участии антиэндотоксиновых антител (анти-ЭТ-АТ) [5, 8–10]. Можно предположить, что у больных СД ослабленный гуморальный иммунный ответ на кишечный ЭТ может косвенно способствовать поддержанию ХНВП, протекающих при участии кишечного ЭТ.

Цель работы — оценка содержания сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов у больных СД 1 и 2 типа с последующим кластерным анализом (КА) взаимосвязей между индивидуальными уровнями таких антител и концентрацией С-реактивного белка (СРБ) в крови.

Методика

В 1-ю группу включено 26 женщин и 25 мужчин с клиническим диагнозом «сахарный диабет типа 1» (СД-1), требующий введения инсулина. Диагноз СД-1 был верифицирован в соответствии с критериями ВОЗ [11]. У больных отмечались следующие осложнения: непролиферативная диабетическая ретинопатия, диабетический артериоз нижних конечностей, хроническая артериальная недостаточность (0–1-я степень), диабетическая полинейропатия, диабетическая нефроангиопатия (микроальбуминурическая или протеинурическая стадия).

Группу 2-ю составили 32 женщины и 28 мужчин с клиническим диагнозом «сахарный диабет 2-го типа» (СД-2); диагноз был поставлен в соответствии с критериями ВОЗ [11]. Все обследованные женщины находились в состоянии менопаузы. У больных отмечались следующие осложнения: непролиферативная диабетическая ретинопатия, диабетический артериоз нижних конечностей, хроническая артериальная недостаточность (0–1-я степень), диабетическая полинейропатия, диабетическая нефроангиопатия (микроальбуминурическая или протеинурическая стадия), дисметаболическая кардиомиопатия, симптоматическая артериальная гипертензия, сердечная недостаточность 1-й степени. Больные обеих групп находились на стационарном лечении в эндокринологическом отделении КРУ «КБ им. Н.А. Семашко» (г.Симферополь).

В контрольную группу вошло 49 здоровых лиц, у которых в анамнезе не было каких-либо хронических заболеваний, а на момент проведения обследования отсутствовали клинические проявления острой инфекционной патологии. По полу и возрасту контрольная группа соответствовала группам больных СД-1 и СД-2.

Сыворотку периферической крови получали общепринятым способом и хранили при 25°C. Уровни сывороточных антиэндотоксиновых антител (анти-ЭТ-АТ) классов А, М и G определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [12] с использованием в качестве антигена липополисахарида *Escherichia coli* K235 (Sigma Chem. Co., USA). Концентрацию СРБ в крови определяли методом ИФА (hsCRP ELISA, DRG International Inc., USA); содержание в крови общих иммуноглобулинов разных классов оценивали микротурбидиметрическим методом [13].

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., USA).

При проведении кластерного анализа (КА) применяли агломеративно-иерархический алгоритм Варда (Ward's method) и метрику City-block (Manhattan) в качестве матрицы расстояний, а также итерационный метод k-средних Мак-Кина [14, 15].

Результаты и обсуждение

Установлено, что у больных СД-1 по группе в целом на фоне практически нормального содержания сывороточного анти-ЭТ-IgA уровни сывороточных анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG были статистически значимо ниже (на 42,4 и 26,8% соответственно), чем у здоровых людей (табл. 1). Вместе с тем, концентрация общего IgA и общего IgM в крови больных СД-1 была значимо выше (на 18,2 и 16,7% соответственно) контрольного уровня, тогда как концентрация общего IgG в среднем статистически значимо не отличалась от контроля (табл. 2).

У больных СД-2 по группе в целом (табл. 1) при практически нормальном содержании сывороточных анти-ЭТ-IgM средние уровни сывороточных анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG были статистически значимо выше, чем у здоровых (на 98,9 и 45,5% соответственно). Концентрация общего IgA в крови больных СД-2 в среднем не отличалась от величины этого показателя у здоровых лиц, тогда как содержание общего IgM и общего IgG по сравнению с нормой было статистически значимо снижено на 16,7 и 7,6% соответственно (табл. 2). Вместе с тем концентрация СРБ в крови у больных СД-1 и СД-2 по группам в целом была статистически значимо повышена по сравнению с нормальным значением этого показателя в среднем (на 45,7 и 75,0% соответственно) (табл. 2).

Таблица 1

Средние уровни сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов у больных СД и здоровых людей (M ± m)

Группа	Анти-ЭТ-АТ, усл. ед.		
	Анти-ЭТ-IgA	Анти-ЭТ-IgM	Анти-ЭТ-IgG
Больные сахарным диабетом 1 типа (n = 51)	0,225 ± 0,018 p0>0,5 p1<0,001	0,152 ± 0,014 p0<0,001 p1<0,01	0,356 ± 0,025 p0<0,015 p1<0,01
Больные сахарным диабетом 2 типа (n = 60)	0,531 ± 0,033 p0<0,001	0,240 ± 0,019 p0>0,05	0,707 ± 0,035 p0<0,001
Здоровые люди (n = 49)	0,279 ± 0,032	0,264 ± 0,026	0,486 ± 0,048

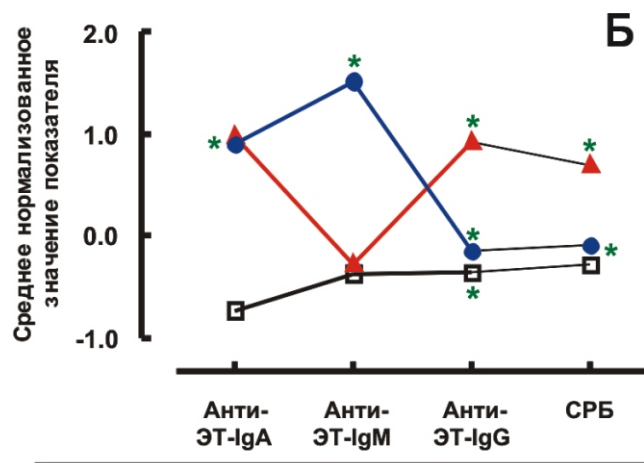
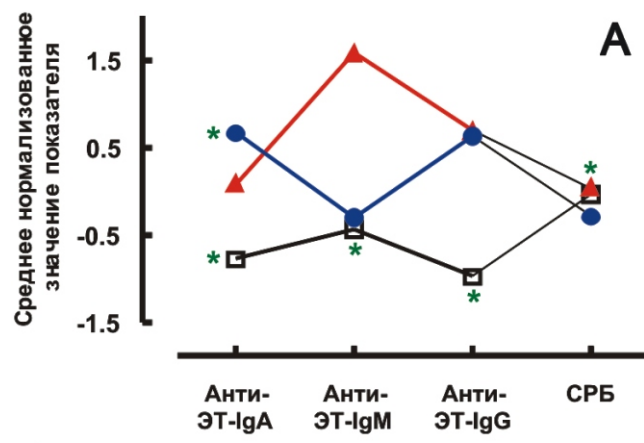
Примечание. Здесь и в табл. 2 достоверность различий обозначена следующим образом: p0 — по сравнению с группой здоровых людей; p1 — между группами больных СД-1 и СД-2.

Таблица 2

Концентрация С-реактивного белка и содержание общих иммуноглобулинов разных классов в крови больных СД и здоровых людей (M ± m)

Группа	Общие иммуноглобулины, г/л			С-реактивный белок, мг/л
	IgA	IgM	IgG	
Больные сахарным диабетом 1 типа (n = 51)	2,63 ± 0,11 p<0,01 p1>0,05	2,11 ± 0,13 p0<0,05 p1<0,01	11,20 ± 0,31 p0>0,05 p1<0,05	2,21 ± 0,18 p0<0,001 p1<0,05
Больные сахарным диабетом 2 типа (n = 60)	2,42 ± 0,09 p0>0,05	1,44 ± 0,12 p0<0,05	9,74 ± 0,35 p0<0,05	2,66 ± 0,13 p0<0,05
Здоровые люди (n = 49)	2,21 ± 0,10	1,81 ± 0,10	10,66 ± 0,13	1,52 ± 0,13

КА показал, что обследованная выборка больных СД-1 сформирована тремя кластерами, которые были условно обозначены как СД-1.1 (20 больных — 40,8%), СД-1.2 (9 больных — 18,4%) и СД-1.3 (20 больных — 40,8%). В пределах каждого из выделенных кластеров прослеживаются различные соотношения между концентрацией СРБ в крови и средними уровнями сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов (рисунок, табл. 3). У больных СД-1.1 и бо-



Взаимосвязи между концентрацией С-реактивного белка в крови и уровнями сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов у больных сахарным диабетом 1 типа (А) и 2 типа (Б), отнесенных к разным кластерам (итерационный метод к-средних Мак-Кина):

* — отклонения от нормы статистически значимы. СД1.1, СД1.2 и СД1.3 — больные сахарным диабетом 1 типа, отнесенные соответственно к 1, 2 и 3 кластерам; СД2.1, СД2.2 и СД2.3 — больные сахарным диабетом 2 типа, отнесенные соответственно к 1, 2 и 3 кластерам; СРБ — С-реактивный белок.

льных СД-1.2 концентрация СРБ в крови значимо превышала нормальные значения для этого показателя на 41,7 и 50,8% соответственно, тогда как у больных СД-1.3 содержание СРБ в крови в среднем статистически значимо не отличалось от величины этого показателя у здоровых. При этом у больных СД-1.1 уровни анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG были существенно ниже значений этих показателей у здоровых людей (на 55,0; 58,4 и 53,7% соответственно). У больных СД-1.2 уровни анти-ЭТ-АТ всех 3-х классов статистически значимо не отличались от соответствующих нормальных значений, а у больных СД-1.3 на фоне практически нормального содержания анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG уровни анти-ЭТ-IgM были статистически значимо снижены (на 53,4% по сравнению с контролем).

С помощью КА установлено, что обследованная выборка больных СД-2 также неоднородна и состоит из трех кластеров, которые условно были обозначены как СД-2.1 (34 больных — 56,7%), СД-2.2 (15 больных — 25,0%) и СД-2.3 (11 больных — 18,3%). Так же, как и для больных СД-1, у больных СД-2 в пределах каждого из выделенных кластеров прослеживаются различные соотношения между концентрацией СРБ в крови и средними уровнями сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов (рисунок и табл. 4).

У больных СД-2.1, СД-2.2 и СД-2.3 концентрация СРБ в крови была повышена почти в 2 раза по сравнению с его содержанием в крови здоровых людей, что свидетельствует о ХНВП, протекающих на фоне основного заболевания. Вместе с тем, вариации между средней концентрацией СРБ в крови больных СД-2.1, СД-2.2 и СД-2.3 не превышали 30%. Наиболее высокая концентрация СРБ в крови была обнаружена у больных СД-2.2, где данный показатель был в среднем в 2,16 раза выше соответствующего нормального значения и на 26,7% превышал среднее содержание СРБ в крови больных СД-2.1, тогда как по сравнению с больными СД-2.3 различия в концентрации СРБ были статистически незначимы. При этом у больных СД-2.2 при практически нормальном содержании анти-ЭТ-IgM уровни сывороточных анти-ЭТ-IgA существенно превышали нормальное значение для этого показателя в 3,96 раза, а анти-ЭТ-IgG — на 89,4%.

Больные СД-2.1 и СД-2.3 по средней концентрации СРБ в крови между собой статистически значимо не отличались. В тоже время, у больных СД-2.1 на фоне практически нормальных уровней сывороточных анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgM уровень анти-ЭТ-IgG был статистически значимо повышен на 26,7%. У больных СД-2.3 отклонение от нормы показателей, характеризующих гуморальное звено им-

мунитета, затрагивало сывороточные анти-ЭТ-АТ всех 3-х классов: у пациентов СД-2.3 уровни анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG были значимо выше соответствующих нормальных значений в среднем в 2,86 раза (на 69,7% и на 37,0%).

Известно, что концентрация ЭТ в крови портальной вены в физиологических условиях колеблется в пределах от 0,01 до 1 нг/мл, причем после приема пищи регистрируется ее существенное транзиторное

повышение. Хотя основная часть попадающего в портальный кровоток ЭТ элиминируется резидентными макрофагами печени без развития воспалительной реакции, за счет наличия портокавальных анастомозов около 6% портальной крови минует печеночный барьер и сбрасывается непосредственно в системный кровоток [16, 17]. Вследствие такой постоянной антигенной стимуляции в крови здоровых людей всегда присутствуют анти-ЭТ-АТ разных классов, причем

Средние уровни сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов и концентрация СРБ в крови больных СД-1, отнесенных к разным кластерам ($M \pm m$)

Таблица 3

Показатель	Кластеры больных сахарным диабетом 1 типа			Здоровые люди
	СД-1.1	СД-1.2	СД-1.3	
Анти-ЭТ-IgA, усл. ед.	0,126 ± 0,014 p0<0,01 p2<0,01 p3<0,001	0,235 ± 0,033 p0>0,05 p1<0,01 p3>0,05	0,311 ± 0,029 p0<0,05 p1<0,001 p2>0,05	0,279 ± 0,032
Анти-ЭТ-IgM, усл. ед.	0,110 ± 0,013 p0<0,001 p2<0,001 p3>0,05	0,305 ± 0,038 p0>0,05 p1<0,001 p3<0,001	0,123 ± 0,010 p0<0,01 p1>0,05 p2<0,001	0,264 ± 0,026
Анти-ЭТ-IgG, усл. ед.	0,225 ± 0,019 p0<0,001 p2<0,001 p3<0,001	0,449 ± 0,031 p0>0,05 p1<0,001 p3>0,05	0,441 ± 0,016 p0>0,05 p1<0,001 p2>0,05	0,486 ± 0,048
С-реактивный белок, мг/л	2,15 ± 0,29 p0<0,05 p2>0,05 p3>0,05	2,29 ± 0,23 p0<0,05 p1>0,05 p3>0,05	1,68 ± 0,18 p0>0,05 p1>0,05 p2<0,05	1,52 ± 0,14

Примечание. Статистическая значимость различий обозначена следующим образом: p0 — по сравнению с группой здоровых людей; p1 — по сравнению с кластером «СД-1.1»; p2 — по сравнению с кластером «СД-1.2»; p3 — по сравнению с кластером «СД-1.3».

Средние уровни сывороточных анти-ЭТ-АТ разных классов и концентрация СРБ в крови больных СД-2, отнесенных к разным кластерам ($M \pm m$)

Таблица 4

Показатель	Кластеры больных сахарным диабетом 2 типа			Здоровые люди
	СД-2.1	СД-2.2	СД-2.3	
Анти-ЭТ-IgA, усл. ед.	0,307 ± 0,025 p0>0,05 p2<0,001 p3<0,001	0,825 ± 0,048 p0<0,001 p1<0,001 p3>0,05	0,798 ± 0,063 p0<0,001 p1<0,001 p2>0,05	0,279 ± 0,032
Анти-ЭТ-IgM, усл. ед.	0,192 ± 0,014 p0>0,05 p2>0,05 p3<0,001	0,206 ± 0,022 p0>0,05 p1>0,05 p3<0,001	0,448 ± 0,040 p0<0,01 p1<0,001 p2<0,001	0,264 ± 0,026
Анти-ЭТ-IgG, усл. ед.	0,616 ± 0,035 p0<0,01 p2<0,001 p3>0,05	0,921 ± 0,045 p0<0,001 p1<0,001 p3<0,01	0,666 ± 0,068 p0<0,05 p1>0,05 p2<0,01	0,486 ± 0,048
С-реактивный белок, мг/л	2,40 ± 0,10 p0<0,001 p2<0,05 p3>0,05	3,28 ± 0,34 p0<0,001 p1<0,05 p3>0,05	2,56 ± 0,18 p0<0,01 p1>0,05 p2>0,05	1,52 ± 0,14

Примечание. Статистическая значимость различий обозначена следующим образом: p0 — по сравнению с группой здоровых людей, p1 — по сравнению с кластером «СД-2.1», p2 — по сравнению с кластером «СД-2.2», p3 — по сравнению с кластером «СД-2.3».

их индивидуальные уровни в физиологических условиях относительно стабильны и определяются адаптивным иммунным ответом на данный облигатный антиген [9, 10].

У больных СД-1 и СД-2 выявлены статистически значимые отклонения от нормы уровней сывороточных анти-ЭТ-АТ определенных классов (табл. 1), которые не совпадают с направленностью изменений концентрации общих иммуноглобулинов такого же класса (табл. 2). По данным литературы, СД приводит к существенным изменениям качественного и количественного состава микрофлоры дистальных отделов ЖКТ [18]. На фоне гастроэнтерологических расстройств, типичных для клинического течения СД, это ведет к увеличению количества ЭТ, попадающего из просвета кишечника в системный кровоток. В ряде исследований показано, что у людей с избыточной массой тела, а также у больных СД концентрация ЭТ в крови существенно выше, чем у лиц, не страдающих ожирением и СД [19, 20].

Поступление ЭТ в организм в количестве, превышающем адаптивные возможности гуморальных и клеточных ЭТ-связывающих систем, или их функциональная недостаточность, классифицируется как эндотоксиновая (ЭА). Роль ЭА кишечного происхождения как универсального фактора патогенеза, в настоящее время верифицирована при многих неинфекционных заболеваниях человека [5, 10]. В частности, инициированное ЭТ изменение цитокинового профиля в сторону преобладания провоспалительных цитокинов при определенных условиях может поддерживать ХНВП, лежащие в основе быстрой прогрессии атеросклеротических изменений сосудов и развития сердечно-сосудистой патологии [3, 4, 21].

Увеличение концентрации СРБ в диапазоне от 2 до 10 мг/л рассматривается как независимый предиктор повышенного кардиоваскулярного риска, обусловленного ХНВП [22]. При этом ЭТ является одним из мощных активаторов синтеза СРБ. Экспериментально показано, что через 24 ч после внутривенного введения здоровым волонтерам небольших количеств ЭТ (2 нг/кг массы тела) концентрация СРБ в крови возрастает более чем в 50 раз по отношению к исходному базовому уровню [23].

У больных СД-1 и СД-2 концентрация СРБ в крови была статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Ранее нами было показано, что у здоровых волонтеров с повышенной базовой концентрацией СРБ в крови (среднее значение $2,24 \pm 0,26$ мг/л) наблюдается статистически значимо уменьшение уровней сывороточных анти-ЭТ-АТ классов А, М и G [24]. Поскольку анти-ЭТ-АТ принимают активное участие в нейтрализации биологической активности и клиренсе ЭТ [8—10, 21], сни-

женный адаптивный иммунный ответ на ЭТ энтеробактерий может рассматриваться как один из факторов, способствующих реализации провоспалительного потенциала ЭТ.

С помощью КА установлено, что примерно у половины больных СД-1 (40,8%) повышенная концентрация СРБ в крови также ассоциирована с существенным снижением уровней сывороточных анти-ЭТ-АТ всех трех классов. В тоже время у тех больных СД-1, у которых концентрация СРБ в крови не отличалась от нормы, уровень сывороточных анти-ЭТ-IgM был существенно ниже, чем у здоровых людей, тогда как содержание анти-ЭТ-IgA и анти-ЭТ-IgG не отличалось от нормальных значений.

Необходимо особо подчеркнуть, что иммунный ответ на ЭТ энтеробактерий не следует рассматривать в рамках классических представлений о фазах иммунного ответа, наблюдаемых при первичном контакте иммунной системы с новым для нее антигеном. ЭТ является облигатным антигеном нормального антигенного окружения человека. По-видимому, индивидуальные уровни анти-ЭТ-АТ разных классов характеризуют динамическое равновесие между несколькими одновременно протекающими процессами: поступлением ЭТ во внутреннюю среду организма, адаптивным иммунным ответом на этот антиген и клиренсом ЭТ в составе иммунных комплексов, образующихся при участии анти-ЭТ-АТ. С учетом этого можно предположить, что снижение уровня анти-ЭТ-IgM у указанной выше подгруппы больных СД-1 может быть обусловлено их активным потреблением в реакциях образования иммунных комплексов с ЭТ, что и предотвращает развитие ХНВП, инициируемых ЭТ.

У значительной части (56,7%) больных СД-2 с повышенной концентрацией СРБ в крови уровни сывороточных анти-ЭТ-АТ классов А и М статистически значимо не отличались от нормальных значений соответствующих показателей, в то время как уровни анти-ЭТ-IgG у них были статистически значимо повышены. Можно предположить, что повышение уровней сывороточных анти-ЭТ-IgG у больных СД-2 указанной подгруппы отражает активную компенсаторную реакцию адаптивной иммунной системы на избыточное поступление ЭТ в системный кровоток, однако по какой-то пока невыясненной причине это не обеспечивает полной нейтрализации провоспалительного потенциала ЭТ. Вместе с тем дальнейшая активизация ХНВП, которую отражает рост содержания СРБ в крови, у больных СД-2 сопровождается значительным возрастанием уровней сывороточных анти-ЭТ-АТ классов А и G, на фоне тенденции к снижению уровней анти-ЭТ-IgM.

Таким образом, у больных СД 1 и 2 типа содержание анти-ЭТ-АТ некоторых классов в крови существенно отличается от нормальных значений, что, по всей видимости, обусловлено адаптивным иммунным ответом на ЭТ на фоне его избыточного поступления во внутреннюю среду организма. В тоже время характер выявленных взаимосвязей между отклонениями указанных показателей и повышенной концентрацией СРБ в крови косвенно указывает на существенную роль антитело-зависимых иммунных механизмов нейтрализации и клиренса ЭТ в предотвращении хронического низкоинтенсивного воспаления при СД 1 и 2 типа. На основании полученных результатов можно предположить, что уже начатый поиск средств и лечебных процедур снижения концентрации ЭТ в общей гемодиализации [25, 26] и последующее обоснование показаний к их применению у больных СД будут способствовать уменьшению уровня хронического воспаления и риска развития сердечно-сосудистых осложнений.

References

- Mangiapane H. Cardiovascular disease and diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 771: 219-28.
- Rosenfeld M.E. Inflammation and atherosclerosis: direct versus indirect mechanisms. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013; 13(2): 154-60.
- Konev Yu.V., Lazebnik L.V. Endotoxin (LPS) in the pathogenesis of atherosclerosis. *Eksp. i klin. gastroenterol.* 2011; 11: 15-26. (in Russian)
- Stoll L.L., Denning G.M., Weintraub N.L. Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24(12): 2227-36.
- Yakovlev M.Yu. Endotoxin Aggression as a Premorbid State or Universal Pathogenesis Factor of Human and Animal Diseases. *Uspekhi sov. biol.* 2003; 123(1): 31-40. (in Russian)
- Demicheva T.P. Gastrointestinal aspects of diabetes. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal.* 2012; 5: 51-3. (in Russian)
- Balzan S., de Almeida Quadros C., de Cleva R., Zilberstein B., Ceconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 22(4): 464-71.
- Cross A.S. Anti-endotoxin vaccines: back to the future. *Virulence.* 2014; 5(1): 219-25.
- Muller-Loennies S., Brade L., Brade H. Neutralizing and cross-reactive antibodies against enterobacterial lipopolysaccharide. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007; 297(5): 321-40.
- Yakovlev M.Yu. Elements of the Endotoxin Theory of Human Physiology and Pathology. *Fiziologiya cheloveka.* 2003; 4: 154-64. (in Russian)
- Dedov I.I., ed. *Diabetes: diagnosis, treatment, prevention. [Sakharnyy diabet diagnostika, lechenie, profilaktika].* M.: MIA; 2011. (in Russian)
- Gordienko A.I. New approach to an increase of specificity in determination of antibodies to lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *Ukr. biokhim. zhurn.* 2004; 76(6): 130-35. (in Russian)
- Gordienko An.I., Beloglazov V.A., Gordienko Al.I. Microturbidimetry method for the determination of human IgG, IgM, IgA. *Imunologiya ta alergologiya.* 2000; 1: 12-5. (in Russian)
- Zhizhin K.S. *Medical statistics. [Meditsinskaya statistika]* Rostov n/D: Feniks; 2007. (in Russian)
- Rebrova O.Yu. *Statistical analysis of medical data. The use of the application package STATISTICA [Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh]* M.: MediaSfera; 2002. (in Russian)
- Neves A.L., Coelho J., Couto L., Leite-Moreira A., Roncon-Albuquerque R. Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *Mol. Endocrinol.* 2013; 51(2): 51-64.
- Wolter J., Liehr H., Grun M. Hepatic clearance of endotoxins: differences in arterial and portal venous infusion. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1978; 23(2): 145-52.
- Everard A., Cani P.D. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2013; 27(1): 73-83.
- Okorokov P.L., Anikhovskaya I.A., Volkov I.E., Yakovlev M.Yu. Intestinal Endotoxin Like a Trigger of Type 1 Diabetes. *Fiziologiya cheloveka.* 2011; 37(2): 138-41. (in Russian)
- Al-Attas O.S., Al-Daghri N.M., Al-Rubeaan K. Changes in endotoxin levels in T2DM subjects on anti-diabetic therapies. *Cardiovasc. Diabetol.* 2009; 8(20): 1-10
- Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Yakovlev M.Yu. Endotoxin Theory of Atherosclerosis. *Fiziologiya cheloveka.* 2015; 41(1): 106-15. (in Russian)
- Pfutzner A., Forst T. High-sensitivity C-reactive protein as cardiovascular risk marker in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Technol. Ther.* 2006; 8(1): 28-36.
- Noveck R., Stroes E.S., Flaim J.D., Baker B.F. Effects of an antisense oligonucleotide inhibitor of C-reactive protein synthesis on the endotoxin challenge response in healthy human male volunteers. *J. Am. Heart. Assoc.* 2014; 103(4): 1-11.
- Gordienko A.I. Correlation between basal concentration of C-reactive protein in the blood, levels of serum anti-endotoxin antibodies and endotoxin-binding capacity of monocytes and granulocytes in healthy people. *Ukr. biokhim. zhurn.* 2013; 85(4): 61-6. (in Russian)
- Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Mayskiy I.A., Markelova M.M., Salakhov I.M., Yaovlev M.Yu. The search direction means for reducing endotoxin concentration in the general haemocirculation. *Patogenez.* 2014; 12(4): 25-30. (in Russian)
- Chernikhova E.A., Anikhovskaya I.A., Gataulin Yu.K., Zakirova D.S., Ivanov V.B., Savel'ev A.A. et al. Enterosorption as an important means of eliminating chronic endotoxin aggression. *Fiziologiya cheloveka.* 2007; 33(3): 135-6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Кубышкин Анатолий Владимирович, доктор мед. наук, проф., зам. директора по научной работе

Белоглазов Владимир Алексеевич, доктор мед. наук, проф., зав. кафедрой внутренней медицины № 2

Повещенко А.Ф.^{1,5}, Казаков О.В.¹, Орлов Н.Б.¹, Повещенко О.В.^{1,5}, Ким И.И.¹,
Бондаренко Н.А.¹, Соловьева И.Г.², Стрункин Д.Н.³, Кабаков А.В.¹, Райтер Т.В.¹,
Лыков А.П.¹, Богачев С.С.⁴, Покушалов Е.А.⁶, Коненков В.И.¹

Цитокины лимфы как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», 630060, г.Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2

² — ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России, 630091, г.Новосибирск, Красный просп., д. 52

³ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, г.Новосибирск, ул. Ядринцовская, д. 14

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), 630090, г.Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, д. 10

⁵ — ФГБОУ ВПО НГПУ, 630126, г.Новосибирск, ул. Вилюйская, д. 28

⁶ — Новосибирский «Научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина», 630055, г.Новосибирск, ул. Речуновская, д. 15

Цель работы — изучение уровней цитокинов в лимфе, вовлеченных в патогенез рака молочной железы (РМЖ). **Методика.** Рак молочной железы индуцировали введением *n*-метил-*N*-нитрозомочевины крысам Wistar. Часть животных подвергалась только оперативному вмешательству или же только полихимиотерапии (ПХТ) (циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил). У части животных сочетали оба вида терапии, а также в отдельной группе к ПХТ добавляли препарат панаген, представляющий собой фрагментированные молекулы ДНК. Для исследования концентрации цитокинов в лимфе использовали тест-систему Bio-Plex Pro Rat Cytokines 24-Plex Assay (Bio-Rad, США). **Результаты.** У крыс с РМЖ содержание большинства исследованных цитокинов, таких, как IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17A, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF- α , MCP-1 статистически значимо было выше, чем у интактных животных. Оперативное удаление опухоли приводило к статистически значимому снижению содержания в лимфе провоспалительных цитокинов. Сравнительное исследование показателей содержания цитокинов в лимфе после удаления опухоли с интактными животными показало, что содержание цитокинов, таких, как IL-10, IL-18, GRO/KC, RANTES было значимо выше в группе контрольных животных. Проведение ПХТ приводило к статистически значимому снижению содержания IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES в лимфе крыс с РМЖ. Сравнительное исследование содержания цитокинов в лимфе прооперированных животных после проведения полихимиотерапии и введения препарата панаген показало, что большинство показателей содержания цитокинов, таких, как IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-18, GRO/KC, IFN γ , MIP-3 α в лимфе было выше после введения препарата панаген. **Заключение.** При проведении сравнительного исследования цитокинового профиля лимфы крыс Wistar установлено, что содержание цитокинов зависело от проводимой терапии у животных с индуцированным раком молочной железы. Уровни цитокинов лимфы могут служить диагностическим критерием опухолевого роста, а также прогностическим критерием эффективности проводимой терапии и риска метастазирования РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы; цитокины лимфы; полихимиотерапия; панаген; крысы Wistar

Для корреспонденции: Повещенко Александр Федорович, зав. лаб. физиологии протективной системы, ФГБНУ НИИКЭЛ, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Для цитирования: Повещенко А.Ф., Казаков О.В., Орлов Н.Б., Повещенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Соловьева И.Г., Стрункин Д.Н., Кабаков А.В., Райтер Т.В., Лыков А.П., Богачев С.С., Покушалов Е.А., Коненков В.И. Цитокины лимфы как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 68–75.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.11.2015

Poveshchenko A.F.^{1,5}, Kazakov O.V.¹, Orlov N.B.¹, Poveshchenko O.V.^{1,5}, Kim I.I.¹,
 Bondarenko N.A.¹, Solovieva I.G.², Strunkin D.N.³, Kabakov A.V.¹, Rayter T.V.¹, Lykov A.P.¹,
 Bogachev S.S.⁴, Pokushalov E.A.⁶, Kononkov V.I.¹

Lymph cytokines as markers oncogenesis and effective treatment of experimental breast cancer Wistar rat

¹ — FGBNU «Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology», 630060, ul. Timakova 2, Novosibirsk, Russia

² — Medical University NSMU Russian Ministry of Health, 630091, Krasny Prospekt, 52, Novosibirsk, Russia

³ — FGBNU «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology», 630099, ul. Yadrintsevskaya 14, Novosibirsk, Russia

⁴ — Federalnoe State Institution of Science Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS), 630090, p-t Ak.Lavrenteva 10, Novosibirsk, Russia

⁵ — FGBOU VPO NGPU, 630126, ul. Viluiskaya, 28, Novosibirsk, Russia

⁶ — Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology im. Akademika E.N.Meshalkina, 630055, ul.Rechkunovskaya 15, Novosibirsk, Russia

The purpose of this paper is to examine the levels of cytokines in the lymph involved in the pathogenesis of breast cancer. Methods. Breast cancer was induced by introducing n-methyl-N-nitrosourea rats Wistar breed. Some of the animals subjected to surgery alone or chemotherapy alone (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil). Some animals combine both types of therapy, as well as a separate group to the administration of chemotherapy added Panagene drug presenting a fragmented DNA. To investigate the concentration of cytokines used in lymph test system Bio-Plex Pro Rat Cytokines 24-Plex Assay (Bio-Rad, USA). Results. In rats with breast cancer content of most studied cytokines such as, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17A, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF- α , MCP-1 was significantly higher than in intact animals. Surgical removal of the tumor resulted in a significant decrease in the content in the lymph as a pro-inflammatory cytokine. Comparative performance study cytokine content in the lymph after tumor removal from intact animals showed that the content of cytokines such as IL-10, IL-18, GRO / KC, RANTES were significantly higher in the control animals group. Conducting chemotherapy has led to a significant decrease in the content of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES in rat breast cancer lymph. Comparative study of cytokine content in the lymph operated animals after the administration of chemotherapy and Panagene revealed that most of the content indicators cytokines such as IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-18, GRO / KC, IFN γ , MIP-3 α in the lymph was higher after administration of the drug Panagene. Conclusion. In a comparative study cytokine profile lymph Wistar rats found that cytokine content depended on the therapy in animals with induced breast cancer. Lymph cytokine levels may serve as a diagnostic criterion for tumor growth, as well as the predictor of the effectiveness of the therapy and the risk of metastasis of breast cancer.

Keywords: breast cancer, cytokines, chemotherapy, Panagene, Wistar rats

For citation: Poveshchenko A.F., Kazakov O.V., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Bondarenko N.A., Solovieva I.G., Strunkin D.N., Kabakov A.V., Reiter T.V., Lykov A.P., Bogachev S.S., Pokushalov E.A., Kononkov V.I. Lymph cytokines as markers oncogenesis and effective treatment of experimental breast cancer Wistar rat. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 68–75. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Poveshchenko A.F., <http://orcid.org/0000-0002-4433-7110>

Kazakov O.V., <http://orcid.org/0000-0003-3947-4038>

Orlov N.B., <http://orcid.org/0000-0002-3437-7151>

Poveshchenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-9956-0056>

Kim I.I., <http://orcid.org/0000-0002-7380-2763>

Bondarenko N.A., <http://orcid.org/0000-0002-8443-656X>

Solovieva I.G., <http://orcid.org/0000-0001-6360-0853>

Strunkin D.N., <http://orcid.org/0000-0003-4357-7443>

Kabakov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4741-6674>

Raiter T.V., <http://orcid.org/0000-0003-0883-9516>

Lykov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-4897-8676>

Bogachev S.S., <http://orcid.org/0000-0001-9557-6712>

Pokushalov E.A., <http://orcid.org/0000-0002-9494-4234>

Kononkov V.I., <http://orcid.org/0000-0001-7385-6270>

Received 11.11.2015

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) сохраняет лидирующую позицию среди онкологической патологии у женщин во всем мире [1—3]. Одним из патогенетических механизмов возникновения и прогрессии опухолевого роста являются белковые медиаторы — цитокины, хемокины и ростовые факторы. Цитокины секретируются как лимфоидными, так и опухолевыми клетками [2—7], оказывают влияние на множество различных клеток-мишеней, а цитокиновая сеть является важнейшим регуляторным механизмом межклеточных взаимодействий. С одной стороны, цитокины проявляют себя как факторы усиления опухолевой прогрессии, активируя ангиогенез и миграцию опухолевых клеток, изменяют функцию клеток-мишеней, вовлеченных в механизм уклонения опухолевых клеток от системы иммунного надзора [8]. С другой стороны, цитокины могут являться основными медиаторами противоопухолевого иммунитета. Концентрация и баланс уровней цитокинов и их антагонистов способствуют усилению или ингибированию роста рака молочной железы [9]. Изменения относительной концентрации некоторых цитокинов, таких, как IL-1, IL-6, IL-11, IL-19, TGF- β , могут прямо и опосредовано стимулировать рак молочной железы [9]. Опухолевый рост относится к патологии, при которой имеется повреждение, воспаление, распад, разрушение тканей. Воспаление проявляется повышенным содержанием в сыворотке крови провоспалительных цитокинов и хемокинов и является характерным для опухолевого роста и метастазирования. Значение воспалительного ответа в патогенезе опухолевого роста подтверждается ассоциацией между концентрацией некоторых провоспалительных цитокинов и хемокинов с характером прогрессии и тяжестью заболевания. Цитокины могут обладать прогностической значимостью и являться мишенью для терапевтических воздействий, что обуславливает важность их изучения при онкогенезе. Цитокины также могут влиять на эффективность лечения рака, усугублять токсическое воздействие химиотерапии и оказывать действие на метаболизм лекарственных препаратов. В настоящее время важная роль системы цитокинов как факторов внутренней среды организма в нормальных условиях и на разных этапах онкогенеза, как прогностических факторов при развитии социально значимых болезней, не вызывает сомнений. Изучение уровня продукции цитокинов в сыворотке крови при опухолях имеет большое значение для прогнозирования выживаемости, оценки риска развития рецидивов и смертности онкологических больных.

Цитокины как факторы лимфатической и лимфоидной систем играют важную роль в патогенезе социально значимых патологий к которым относится рак.

Если работы по изучению цитокинового профиля крови при онкологических заболеваниях существуют, то цитокиновый профиль лимфы остается практически не изученным. Особую актуальность приобретает изучение цитокинового профиля лимфы при опухолевом росте, поскольку лимфатическая система играет важную роль в патогенезе и распространение опухолевого процесса и метастазирование происходит преимущественно лимфогенно.

Несмотря на очевидную взаимосвязь цитокинов с патогенезом роста и метастазирования опухолей, их очевидное диагностическое и прогностическое значение, комплексные исследования разных функциональных групп цитокинов, сравнительная оценка цитокинов в сыворотке крови и лимфе до сих пор не проводилась. Проблема участия цитокинов в опухолевом росте и при применении различных способов лечения требует дальнейшего изучения.

Цель исследования — определение количественных характеристик и качественных особенностей цитокинового профиля лимфы выделенной из грудного лимфатического протока на различных этапах онкогенеза РМЖ, проведение сравнительного исследования цитокинов лимфы крыс Wistar после проведения операции, полихимиотерапии, полихимиотерапии в сочетании с курсом терапии препаратом панаген.

Методика

Эксперименты проведены в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Забой осуществляли одновременно в утренние часы.

Исследования проводили на половозрелых (возраст 3 мес.) крысах-самках Wistar массой 250—300 г в количестве 9—10 животных в каждой группе:

- 1-я группа — интактные крысы;
- 2-я — крысы с РМЖ (опухоленосители);
- 3-я — РМЖ после проведения полихимиотерапии (ПХТ);
- 4-я — крысы после хирургического удаления РМЖ (оперированные животные);
- 5-я — удаление раковой опухоли и ПХТ;
- 6-я — после удаления опухоли в сочетании с ПХТ и введением препарата панаген (фрагментированная ДНК).

Опухоль индуцировали инъекцией N-метил-N-нитрозомочевины (МНМ) в область молоч-

ной железы крысам-самкам пятикратно (1 инъекция в неделю) (Sigma-Aldrich, США), в результате чего через 6 мес. развивается РМЖ (аденокарцинома) [1, 10]. Оперативное вмешательство осуществляли через 6 мес. от момента индукции РМЖ. Для ПХТ использовали схему ЦМФ (циклофосфан — в дозе 100 мг/м² с 1 по 14 день; метотрексат — в дозе 40 мг/м² в 1 и 8 дни; 5-фторурацил — в дозе 600 мг/м² в 1 и 8) (Sigma-Aldrich, США) [1]. Курс терапии фрагментированной ДНК (5мг/кг) проводили внутрибрюшинным введением однократно в течение 14 сут. через 3 ч после введения циклофосфана. В экспериментах использовали субстанцию препарата панаген с содержанием фрагментированной ДНК 1,7 мг/мл (ЛСР № 004429/08 от 09.06.08), выделенный из плаценты человека. Животных из эксперимента выводили через 6 мес. под наркозом (40 мг/кг нембутана внутрибрюшинно; Sigma-Aldrich, США). Лимфу забирали из грудного лимфатического протока [11]. Концентрации 24 цитокинов в лимфе оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Assay System (Bio-Rad, США) с использованием коммерческой тест-системы, (определяемый динамический диапазон 2—32000 пкг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы производителя Bio-Plex Pro Rat Cytokone 24-Plex Assay (Bio-Rad, США). Результаты представлены средним значением и среднеквадратическим отклонением ($M \pm \sigma$); медианой (Me), нижним и верхним квартилями (Q1; Q3). При статистической обработке значения цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода (<2 пкг/мл), принимали за 1 пкг/мл. Статистическая значимость различий рассчитывалась по U-критерию Манна—Уитни. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования содержания цитокинов в лимфе грудного лимфатического протока животных представлены в таблице. У крыс с РМЖ содержание большинства исследованных цитокинов, таких, как, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17A, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF- α , MCP-1 статистически значимо было выше, чем у интактных животных. IFN- γ также был выше у крыс с РМЖ, но его показатели были статистически незначимы по сравнению с контрольной группой. Уровень таких провоспалительных цитокинов как IL-1 β , IL-6 и TNF- α статистически значимо увеличивался при РМЖ в 7,5, в 4,5 и 3,9 раза соответственно. Индуцирование РМЖ приводило к значимому повышению уровня ряда хемокинов, таких, как MIP-1 α ,

MIP-3 α , RANTES, MCP-1 в 2,2, в 2,8, в 1,9 и в 1,4 раза соответственно, и снижению продукции GRO/KC в 2 раза. Индуцирование РМЖ приводило к статистически значимому снижению продукции противовоспалительного цитокина IL-10 в 3,1 раза ($p = 0,0088$), что может способствовать иммуносупрессии и ослаблению противоопухолевой защиты. Можно предположить, что указанные цитокины, в том числе провоспалительные и хемокины, продуцируются прежде всего опухолевыми клетками, а также инфильтрирующими опухоль лимфоидными клетками. Некоторые из этих цитокинов действуют как аутокринные или паракринные факторы роста для опухолевой ткани. По мнению многих исследователей провоспалительные цитокины внутри опухоли и ее микроокружения связаны с прогрессированием РМЖ [4, 5]. Высокое содержание этих биологически активных факторов у животных с РМЖ позволяет отнести их к маркерам опухолевого роста. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, касающихся цитокинов сыворотки крови [3—5].

Оперативное удаление опухоли приводило к статистически значимому снижению содержания в лимфе провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-18) в 9,5, в 5,6, в 1,75 и в 2,9 раза соответственно.

Обнаружено статистически значимое снижение концентрации в лимфе как хемокинов (MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES) в 2,1, в 4 и в 3,7 раза соответственно, так и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-13) в 4,6 и более чем в 13 раз, а также IL-7 в 4,9 раза по сравнению с РМЖ. Количество IL-10 в лимфе после операции осталось на уровне как при РМЖ. Сравнительное исследование показателей содержания цитокинов в лимфе после удаления опухоли с интактными животными показало, что содержание цитокинов, таких, как IL-10, IL-18, GRO/KC, RANTES было значимо выше в группе контрольных животных. Основным источником IL-10 в опухолевом микроокружении являются макрофаги, которые увеличивают экспрессию IL-10 в ответ на сигналы от гибнущих раковых клеток. Удаление первичного опухолевого очага, очевидно, ослабляло сигнальные пути, и продукция IL-10 была невысока. Содержание IL-6, IL-17A в группе прооперированных животных было существенно выше по сравнению с контролем в 2,2 и 2,1 раза соответственно, что позволяет считать их не только провоспалительными маркерами, но и маркерами метастазирования. Кроме того у прооперированных животных показатели концентрации TNF- α , MCP-1 в лимфе выше по сравнению с контролем в 3,3 и в 1,9 раза соответственно, но различия статистически незначимы.

Содержание цитокинов в лимфе крыс опухоленосителей РМЖ
по сравнению с контролем и после проведения различных видов лечения РМЖ

Содержание цитокина (пг/мл)	Группа животных					
	Контрольная группа (интактные животные) М ± σ Ме; (LQ-HQ)	РМЖ М ± σ Ме; (LQ-HQ)	Животные после операции удаления РМЖ М ± σ Ме; (LQ-HQ)	Животные с РМЖ после ПХТ М ± σ Ме; (LQ-HQ)	Животные после операции удаления РМЖ и ПХТ М ± σ Ме; (LQ-HQ)	Животные после операции удаления РМЖ и полихимиотерапии и введения пананагена М ± σ Ме; (LQ-HQ)
IL-1α	45,6 ± 23,4 48,8; (16,7-70,9)	50,3 ± 20,0 46,7; (46,7-75,4)	21,4 ± 7,5 20,3; (13,3-20,3) ®	42,9 ± 12,5 43,4; (27,3-43,4)	35,4 ± 12,4 29,2; (23,6-37,6) ☐	53,3 ± 38,6 33,8; (16,2-64,4)
IL-1β	54,4 ± 29,3 42,8; (35,7-43,1)	393,6 ± 157,1 402,2; (294,3-466,6) **	41,2 ± 13,9 41,4; (26,4-45,2) #	62,0 ± 22,9 48,6; (46,9-49,7) •	55,3 ± 19,4 53,1; (40,6-70,0)	93,9 ± 69,1 44,7; (35,7-142,6)
IL-2	108,3 ± 31,5 82,3; (82,3-136,9)	362,2 ± 109,4 401,4; (226,2-402,6) **	64,6 ± 22,4 73,3; (46,8-85,3) #®	250,4 ± 92,5 226,3; (146,8-366,0)	122,5 ± 21,6 106,7; (104,2-147,7) ☐	180,6 ± 35,0 209,8; (136,9-209,8) &
IL-4	40,6 ± 2,6 39,5; (37,8-43,1)	111,6 ± 75,4 67,2; (66,5-82,3) **	24,0 ± 10,8 18,2; (16,7-26,8) #	39,8 ± 11,8 42,2; (40,2-51,1) •	26,6 ± 7,2 31,4; (18,4-32,8) ♦	81,4 ± 62,1 64,4; (14,4-116,3)
IL-5	166,5 ± 95,4 118,9; (104,5-170,2)	175,4 ± 85,9 128,3; (107,7-205,2)	100,2 ± 23,0 93,9; (79,7-128,3)	108,3 ± 49,4 83,1; (76,2-161,5)	37,2 ± 11,6 33,2; (28,3-34,2) ♦	164,4 ± 34,1 165,2; (163,8-176,8) ×
IL-6	312,9 ± 91,0 310,5; (200,3-330,5)	1413,2 ± 646,0 1400,4; (667,7-1777,8) **	711,0 ± 215,8 843,1; (487,7-850,1) *	546,7 ± 195,8 392,4; (371,5-626,5) •	342,5 ± 80,2 337,9; (246,4-442,7)	835,5 ± 307,6 980,1; (578,0-1027,7) &×
IL-7	121,4 ± 89,0 128,2; (10,1-228,2)	429,7 ± 57,8 435,3; (421,0-442,1) **	86,1 ± 36,5 110,2; (58,8-116,8) # ®	182,2 ± 67,1 126,3; (126,3-266,1) •	59,5 ± 38,8 59,1; (11,5-62,0) ☐	138,6 ± 34,4 122,7; (119,5-179,8) ×
IL-10	1712,1 ± 405,4 1466,0; (1466,0-2207,1)	541,0 ± 231,3 499,7; (364,5-522,8) **	498,8 ± 213,8 411,4; (402,9-727,1) *®	146,7 ± 33,8 129,1; (119,4-178,6) •	115,6 ± 30,1 101,6; (96,2-102,1) ♦☐	895,9 ± 593,5 661,3; (296,8-1274,1) ×
IL-12	63,6 ± 22,9 75,9; (40,0-80,0)	140,1 ± 47,5 131,7; (90,0-189,7) **	80,4 ± 12,6 80,0; (70,0-80,0) # ®	121,8 ± 13,4 126,0; (121,0-132,0)	72,5 ± 10,4 72,6; (69,5-80,7)	91,6 ± 37,0 101,6; (79,9-128,4)
IL-13	79,9 ± 104,1 12,7; (10,0-26,5)	330,4 ± 304,8 112,1; (59,5-610,1) **	25,3 ± 13,4 18,5; (16,6-19,9) #	109,1 ± 76,3 88,0; (47,0-98,0)	17,5 ± 3,8 15,3; (14,1-21,6)	316,9 ± 234,8 433,1; (26,5-511,6) &×
IL-17 A	63,7 ± 30,3 49,8; (33,1-69,9)	242,3 ± 119,7 243,3; (143,7-341,4)	133,5 ± 48,9 137,5; (102,1-142,9) *	67,1 ± 20,3 71,4; (46,3-90,3) •	59,5 ± 19,2 71,2; (62,7-73,8)	280,3 ± 135,9 189,4; (169,8-400,1) &×
IL-18	5704,1 ± 1932,2 4741,0; (4590,9-5276,7)	3195,9 ± 1439,1 2468,7; (2269,0-3345,7)	1087,6 ± 73,4 1130,1; (1071,5-1151,3) *#	1863,4 ± 659,9 1851,2; (1090,4-1861,4)	1322,6 ± 979,3 1022,5; (290,2-2016,9) ♦	6633,7 ± 2006,2 7159,9; (5953,3-8878,4) ×
EPO	1102,3 ± 501,0 848,0; (665,3-1167,7)	797,5 ± 877,7 306,0; (50,7-594,2)	623,9 ± 206,3 566,5; (554,6-626,8) ®	114,3 ± 65,0 84,3; (64,2-85,1)	281,0 ± 193,4 227,4; (66,3-317,1) ♦☐	442,1 ± 361,3 350,0; (41,4-746,4)
G-CSF	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
GM-CSF	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
GRO/KC	28,5 ± 7,3 24,6; (23,4-33,3)	14,0 ± 3,6 11,9; (11,1-17,1)	15,5 ± 5,8 11,2; (10,7-21,8) *	7,2 ± 4,6 10,0; (3,0-11,0)	44,3 ± 34,9 24,6; (10,6-87,4)	94,9 ± 35,4 99,4; (90,6-135,2) ×
IFNγ	60,8 ± 18,3 54,2; (53,9-66,9)	106,5 ± 40,9 120,7; (80,9-140,6)	86,6 ± 53,9 84,2; (24,1-91,2)	63,8 ± 25,7 77,2; (33,9-88,3)	28,2 ± 13,5 20,4; (19,2-42,1) ♦	133,9 ± 66,9 104,8; (88,1-120,3) &×
M-CSF	132,0 ± 71,9 149,9; (48,6-186,8)	133,7 ± 42,4 153,8; (87,0-157,1)	112,5 ± 48,4 117,5; (72,1-162,9)	127,3 ± 88,8 59,6; (57,7-228,3)	90,0 ± 44,6 101,0; (54,7-114,5)	109,6 ± 38,2 97,7; (92,9-114,5)
MIP-1 α	1458,1 ± 358,0 1555,9; (1406,3-1594,4)	3230,1 ± 475,0 3528,2; (3143,0-3549,6)	1412,2 ± 794,5 1200,3; (754,9-2282,2) #	1355,2 ± 764,0 1737,4; (700,1-2119,0) •	902,2 ± 669,4 700,7; (194,9-1318,4)	2660,3 ± 1690,8 2387,2; (866,7-2873,5)
MIP-3 α	96,2 ± 32,5 120,1; (60,7-121,6)	274,5 ± 63,2 307,5; (250,1-333,3)	67,3 ± 23,8 72,1; (38,1-92,1) #	108,8 ± 60,7 71,4; (61,5-142,6) •	57,8 ± 21,4 55,6; (54,3-78,5) ☐	210,9 ± 93,0 144,1; (128,6-314,1) &×
RANTES	356,4 ± 125,7 276,5; (276,5-513,6)	678,3 ± 224,6 601,5; (536,9-650,1)	180,4 ± 40,0 195,0; (191,6-207,2) *#	205,2 ± 39,1 221,5; (157,5-231,6) •	422,2 ± 128,7 467,3; (367,5-520,1) ☐	552,9 ± 176,5 580,7; (452,6-680,4)
TNFα	22,9 ± 2,1 22,4; (20,7-24,1)	80,2 ± 19,8 87,0; (80,1-90,4)	74,6 ± 40,5 61,7; (40,3-83,3)	74,9 ± 49,9 50,4; (38,9-127,9)	43,1 ± 12,8 44,3; (31,4-46,9) ♦	67,8 ± 36,3 49,1; (42,6-80,6) &
VEGF	60,7 ± 38,4 68,9; (14,8-46,4)	51,1 ± 29,7 60,8; (18,6-67,1)	57,6 ± 13,9 67,4; (41,1-68,8)	54,0 ± 17,6 58,6; (54,8-66,7)	34,1 ± 9,0 33,1; (32,6-43,5)	44,7 ± 14,6 42,4; (42,3-45,2)
MCP-1	611,3 ± 115,1 624,1; (477,8-747,3)	903,7 ± 186,5 777,9; (767,8-935,6)	1212,0 ± 1662,1 847,0; (579,1-1558,7)	658,2 ± 255,6 767,8; (381,9-847,0)	629,2 ± 125,6 552,8; (531,5-612,6) ☐	657,3 ± 186,1 620,3; (581,2-851,3)

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей лимфы контрольных (интактных) (** — при $p < 0,05$), от лимфы крыс с РМЖ. Контрольных (интактных) (* — при $p < 0,05$), от лимфы крыс после операции удаления РМЖ. Контрольных (интактных) (♦ — при $p < 0,05$), от лимфы крыс после операции удаления РМЖ и проведения полихимиотерапии. Контрольных (интактных) (& — при $p < 0,05$), от лимфы крыс после операции удаления РМЖ и проведения полихимиотерапии и введения панагена. РМЖ (# — при $p < 0,05$), лимфы оперированных животных. РМЖ (• — при $p < 0,05$), лимфы РМЖ после химиотерапии. Животных после операции удаления РМЖ (⊖ — при $p < 0,05$), лимфы животных после операции удаления РМЖ и проведения химиотерапии. Животных после операции удаления РМЖ в сочетании с полихимиотерапией (× — при $p < 0,05$), по сравнению с животными после операции удаления РМЖ и проведения полихимиотерапии и введения панагена. Животных после операции удаления РМЖ (® — при $p < 0,05$), по сравнению с животными с РМЖ и проведения полихимиотерапии.

Доказано, что удаление первичных опухолей (без удаления региональных лимфоузлов и последующей химиотерапии) может приводить к ускорению метастазирования, что связано со многими факторами, в том числе со стимулированием ангиогенеза и лимфангиогенеза.

Проведение ПХТ приводило к значимому снижению содержания IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES в лимфе крыс с РМЖ в 6,3, в 2,8, в 2,5, в 2,3, в 3,7, в 2,2, в 2,5 и в 3,3 раза соответственно.

При исследовании концентрации цитокинов в лимфе крыс после удаления опухоли по сравнению с животными после удаления РМЖ и ПХТ не было обнаружено статистически значимых различий в содержании большинства цитокинов. Тем не менее, содержание IL7, IL-10, EPO, MIP-3 α , MCP-1, в лимфе было значимо выше в группе оперированных животных по сравнению с показателями группы с сочетанной терапией. В данном случае имеют место изменения продукции маркеров метастазирования, таких, как MIP-3 α , MCP-1, но отсутствуют изменения IL-1 β , IL-6, MIP-1 α , VEGF. В то же время уровень продукции таких цитокинов и хемокинов, как IL-1 α , IL-2, IL-12, RANTES выше при сочетании ПХТ и оперативного лечения.

Сравнительное исследование содержания цитокинов в лимфе прооперированных животных после проведения полихимиотерапии и введения препарата панаген показало, что большинство показателей содержания цитокинов, таких, как IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-18, GRO/KC, IFN γ , MIP-3 α в лимфе было выше после введения препарата панаген. Стимулирующее влияние препарата панаген на лимфоидные клетки выражается в увеличении продукции целого ряда цитокинов. Концентрация IL-6, IL-13, IL-17A, MIP-3 α , IFN γ , после введения панагена была выше по сравнению с интактными животными. Это совпадает с представлениями о том, что цитостатики в сочетании с препаратом ДНК (панаген) возможно обеспечивают противоопухолевый эффект и стимулирует лимфоидные клетки иммунной системы [12].

Опухолевые клетки способны продуцировать различные цитокиновые молекулы и имеют к ним рецеп-

торы, что позволяет осуществлять аутокринную регуляцию собственной жизнедеятельности [7, 13, 14]. Показано, что один и тот же цитокин может проявлять различные эффекты на разных стадиях опухолевого процесса [4]. Результаты некоторых исследований показали, что содержание всех изученных цитокинов в опухолевой ткани было существенно выше, чем в неизменной ткани. Так, IL-6, IL-8, IL-10 могут продуцироваться опухолевыми клетками и служить факторами роста и прогрессии опухоли, что совпадает с ранее полученными нами и также другими авторами результатами [3, 4].

Наиболее перспективными в качестве маркеров опухолевого роста и прогностических факторов при злокачественных новообразованиях являются цитокины IL-1 β , TNF α , IL-6 и IL-4. Известно, что провоспалительные цитокины IL-6, TNF- α и IL-1 β , которые вырабатываются как лимфоцитами, так и опухолевыми клетками, проявляют себя как факторы усиления опухолевой прогрессии, активирующие ангиогенез и миграцию опухолевых клеток, а TNF- α , являясь индуктором апоптоза, может вызывать усиление гибели лимфоцитов, и миграции в этот орган опухолевых клеток [4, 5]. Для ряда солидных опухолей человека показана корреляция уровня данных цитокинов с агрессивностью течения онкологических заболеваний, метастатическим потенциалом, риском развития рецидивов и продолжительностью жизни больных [15]. С увеличением тяжести опухолевой прогрессии повышается способность клеток крови к продукции цитокинов, обладающих мощным проопухолевым влиянием, то есть активируются механизмы положительной обратной связи.

Цитокины играют важную роль в патогенезе опухолевого роста и метастазирования, детерминируя течение заболевания, тяжесть заболевания, осложнения. Учитывая плейотропность цитокинов и их патогенетическую значимость необходимо исследование широкого спектра цитокинов на разных этапах опухолевого роста, с применением разных видов лечения с учетом сравнительного исследования цитокинов лимфы и крови. Использование мультиплексного анализа позволяет более полно охарактеризовать цитокиновый профиль лимфы. Обсуждая полученные результаты мы анализируем функциональные группы цитокинов:

про- (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-18), и противовоспалительные (IL-4, IL-10) цитокины, иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-18), ростовые факторы (EPO, G-CSF, M-CSF, VEGF, IL-13), хемокины (GRO/KC, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, MCP-1). Как видно из таблицы, концентрации таких ростовых факторов в лимфе G-CSF, M-CSF не превышали нижнюю границу чувствительности метода и были <1 пкг/мл, что является особенностью лимфы, так как в сыворотке крови подобный феномен нами не обнаружен [3]. Исследование показало, что продуцентами цитокинов являются не только клетки крови и лимфы, но и опухоль, — обнаружено увеличение секреции цитокинов всех функциональных групп. Усиление продукции отдельных групп цитокинов ассоциировано с опухолевым ростом или метастазированием либо обратным развитием опухоли (патоморфозом). В нашем исследовании обнаружено увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в лимфе у животных с РМЖ. Провоспалительные цитокины и хемокины могут способствовать метастазированию опухоли и стимулировать ангиогенез как прямо, так и опосредованно через другие биологически активные вещества.

Заключение

При проведении сравнительного исследования цитокинового профиля лимфы крыс Wistar установлено, что количественное содержание цитокинов при РМЖ зависит от типа проводимой терапии по поводу заболевания. РМЖ стимулирует продукцию как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, основными продуцентами которых являются иммунокомпетентные клетки, клетки опухолевого микроокружения и самой опухоли. Продукция цитокинов может изменяться в процессе прогрессирования, подавления развития опухоли или метастазирования. Уровни цитокинов лимфы могут служить диагностическим критерием опухолевого роста, а также прогностическим критерием эффективности проводимой терапии и риска метастазирования РМЖ.

Список литературы

1. Волкова М.С. Лимфатический регион молочной железы в норме, при индуцированной опухоли, химиотерапии и фитокоррекции: дис. кандидата мед.наук. Новосибирск; 2014. 241 с.
2. Канцерогенез, цитокины и иммунитет: патогенетическая взаимосвязь в динамике развития неоплазий / Под общ. ред. В.М. Попкова, Н.П. Чесноковой, В.Ю. Барсукова. Саратов: Изд-во СГМУ, 2014. -379 с.
3. Повешенко А.Ф., Казаков О.В., Орлов Н.Б., Повешенко О.В., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Мил-

лер Т.В., Соловьева И.Г., Стрункин Д.Н., Кабаков А.В., Райтер Т.В., Лыков А.П., Рогачев В.А., Богачев С.С., Коненков В.И. Цитокины сыворотки крови как маркеры онкогенеза и эффективности терапии при экспериментальной опухоли молочной железы крыс Wistar. *Фундаментальные исследования*. 2015; 1: 1664-70.

4. Соснина А.В., Великая Н.В., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск; 2013.

5. Стахеева М.Н., Слонимская Е.М., Кухарев Я.В., Гарбуков Е.Ю., Горева Е.П., Сенников С.В., Козлов В.А., Чердынцева Н.В. Взаимосвязь уровня продукции IL-1 β клетками крови у больных раком молочной железы с различным исходом. *Цитокины и воспаление*. 2010; 9(3): 72-3.

6. Boon T., van den Eynde B. Tumour immunology. *Current Opinion in Immunology*. 2003; 15(2): 129-30.

7. Wilson J. and Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*. 2002; 12(2): 113-20.

8. Purohit A., Newman S. P., and Reed M. J. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2002; 4(2): 65-9.

9. Nicolini A., Carpi A., and Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006; 17(5): 325-37.

10. Джиоев, Ф.К. Исследование факторов, влияющих на процесс канцерогенеза, и поиск антиканцерогенных соединений: автореферат дис. д-ра мед. наук. Ленинград; 1984. 42 с.

11. Кузнецов А.В. Новый способ забора лимфы у животных. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1993; (9): 329-31.

12. Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. *Cellular Immunology*. 2010; 266: 46-1.

13. Waugh D.J., Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14: 6735-41.

14. Wang T.B., Deng M.H., Qiu W.S., Dong W.G. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 1794-97.

15. Sivaparvathi M., R. Sawaya R., Wang S.W. Overexpression cytokines during the progression of human gliomas. *Clin. Exp. Metastasis*. 1995; 13(1): 49-6.

References

1. Volkova M.S. *Lymphatic breast region is normal, when the induced tumor, chemotherapy and phytoremediation: dis. med candidate*. Novosibirsk; 2014. (in Russian)
2. *Kantserogenez, cytokines and immunity: pathogenetic relations in the dynamics of the development of neoplasia / Pod Society*. Ed. VM Popkov, NP Chesnokova, VY Barsukova.- Saratov: Izd SSMU, 2014. (in Russian)
3. Poveshchenko A.F., Kazakov O.V., Orlov N.B., Poveshchenko O.V., Kim I.I., Bondarenko N.A., Miller T.V., Solovieva I.G., Strunkin D.N., Kabakov A.V., Reiter T.V., Lykov A.P., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Konenkov V.I.

Cytokines serum as markers of carcinogenesis and the effectiveness of therapy in breast Wistar rats of experimental tumors. *Basic research*. 2015 (1): 1664-70. (in Russian)

4. Sosnina A.V., Great N.V., Autenshlyus A.I. *Role of cytokines in the pathogenesis of malignancies*. Novosibirsk; 2013. (in Russian)

5. Stakheyeva M.N., Slonim E.M., Kuharev Y.V., Garbuk E.J., Gorev H.E., Sennikov S.V., Kozlov V.A., Cherdynseva N.V. The relationship level of IL-1 β production of blood cells in patients with breast cancer with a different outcome. *Cytokines and inflammation*. 2010; 9 (3): 72-3. (in Russian)

6. Boon T., van den Eynde B. Tumour immunology. *Current Opinion in Immunology*. 2003; 15 (2): 129-30.

7. Wilson J., Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*. 2002; 12 (2): 113-20.

8. Purohit A., Newman S.P., Reed M.J. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2002; 4 (2): 65-9.

9. Nicolini A., Carpi A., and Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006; 17 (5): 325-37.

10. Dzhioev, F.K. A study of factors influencing the process of carcinogenesis, and the search for anti-carcinogenic compounds: abstract dis. Dr. med. Sciences. Leningrad; 1984. (in Russian)

11. Kuznetsov A.V. A new way of lymph intake in animals. *Bulleten Experimentalnoy Biologii Meditsin*. 1993; (9): 329-31. (in Russian)

12. Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolov V.P., Popova N.A., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdiv M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. *Cellular Immunology*. 2010; 266: 46-1.

13. Waugh D.J., Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14: 6735-41.

14. Wang T.B., Deng M.H., Qiu W.S., Dong W.G. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 1794-97.

15. Sivaparvathi M., Sawaya R., Wang S.W. Overexpression cytokines during the progression of human gliomas. *Clin. Exp. Metastasis*. 1995; 13 (1): 49-6.

Сведения об авторах:

Повещенко Александр Федорович, доктор мед. наук, зав. лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Казаков Олег Васильевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: Kazakoff_oleg@mail.ru

Орлов Николай Борисович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. иммуногенетики НИИКЭЛ, e-mail: nbo@ngs.ru

Повещенко Ольга Владимировна, доктор мед. наук, зав. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: PoveshchenkoOV@yandex.ru

Ким Ирина Иннокентьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: kii5@yandex.ru

Бондаренко Наталья Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: bond802888@yandex.ru

Соловьева Ирина Геннадьевна, доктор мед. наук, и. о. зав. каф. клинической психологии ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России, e-mail: irraso@mail.ru

Стрункин Дмитрий Николаевич, канд. мед. наук, науч. сотр. ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, ул. Ядринцовская 14, Новосибирск, e-mail: strunkind@mail.ru

Кабаков Алексей Васильевич, аспирант лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: Doctor03-85@ngs.ru

Райтер Татьяна Владимировна, аспирант лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: reitert@mail.ru

Лыков Александр Петрович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: arlykov2@mail.ru

Богачев Сергей Станиславович, доктор биол. наук, зав. лаб. индуцированных клеточных процессов ФГБУН «Институт цитологии и генетики» (ИЦиГ СО РАН), e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru

Покушалов Евгений Анатольевич, доктор мед. наук, проф., заместитель директора по научно-экспериментальной работе, руководитель центра интервенционной кардиологии Новосибирского Научно-исследовательского института патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина

Коненков Владимир Иосифович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, зав. лаб. иммуногенетики, директор по науке НИИКЭЛ, e-mail: vikonenkov@gmail.com

Карзакова Л.М., Автономова О.И., Кудряшов С.И., Комелягина Н.А., Ухтерова Н.Д.

Роль циркулирующих цитокинов и тиреоидных гормонов в развитии нефротического варианта гломерулонефрита

ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» Министерство образования и науки России, 428015, г.Чебоксары, Московский пр., д. 15

Цель исследования — изучение особенностей продукции про- и противовоспалительных цитокинов, а также показателей тиреоидного статуса у пациентов с нефротическим вариантом гломерулонефрита (ГН). **Методика.** Обследовано 78 больных первичным ГН, в том числе 30 пациентов с нефротическим синдромом (НС) и 48 больных ГН, не имевших признаков НС. Лабораторные исследования включали определение концентрации основных циркулирующих в крови цитокинов — IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ и рецепторного антагониста IL-1 β — Ra-IL-1 β методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в системе бидетерминантного определения антигена с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента с использованием стандартных наборов («Цитокин», С-Петербург) в соответствии с прилагаемой к набору методикой. Исследование основных показателей тиреоидного статуса — тироксина свободного (Т₄ св.), трийодтиронина (Т₃ св.), тиреотропного гормона (ТТГ), антител к тиреопероксидазе (анти-ТПО) — осуществлено методом ИФА с использованием стандартных наборов и методик НПО «Диагностические системы» (Н-Новгород). Исследования проводили дважды — до начала стационарного лечения (1-е—2-е сут.) и после завершения стационарного этапа лечения (12-е—14-е сут.). **Результаты.** У 90% больных нефротическим вариантом ГН выявлены признаки гипотиреоза на фоне повышения продукции провоспалительных цитокинов — IL-1 β и IL-4, связанного с активностью гуморального звена адаптивного иммунитета. Снижение клубочковой, эритропоэтической, концентрационной функции почек, а также протеинурия у больных нефротическим вариантом ГН ассоциированы с уменьшением содержания в крови Т₄ св. и повышением уровней циркулирующих в крови цитокинов — IL-1 β и IL-4. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных ГН с высоким уровнем продукции IL-1 β и IL-4 развивается гипотиреоз, обуславливающий формирование НС.

Ключевые слова: гломерулонефрит; нефротический синдром; цитокины; гипотиреоз; синдром нетиреоидных заболеваний

Для корреспонденции: Карзакова Луиза Михайловна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. госпитальной терапии № 2 с курсом клинической иммунологии, e-mail: luizak58@mail.ru

Для цитирования: Карзакова Л.М., Автономова О.И., Кудряшов С.И., Комелягина Н.А., Ухтерова Н.Д. Роль циркулирующих цитокинов и тиреоидных гормонов в развитии нефротического варианта гломерулонефрита. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 76—82.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.03.2016

Karzakova L.M., Avtomomova O.I., Kudryashov S.I., Komelyagina N.A., Ukhterova N.D.

The role of circulating cytokines and thyroid hormones in the development of the nephrotic variant of glomerulonephritis

The I.N. Ulianov Chuvash state university of Minobrnauka of Russia, Cheboksary, 428015, Russia

The purpose of the research — studying the features of the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as indicators of thyroid status in patients with nephrotic variant of glomerulonephritis (GN). **Research methods.** The examination involved 78 patients with primary GN, including 30 patients with nephrotic syndrome (NS) and 48 GN patients who had no NS symptoms. Laboratory researches included the determination of the concentration of the main cytokines circulating in the blood — IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ and the receptor antagonist of IL-1 β — Ra-IL-1 β by the method of solid-phase enzyme linked immunosorbent assay enzyme immunoassay (ELISA) in the system of the bideterminant definition of antigen with the use of peroxidase as indicator enzyme using standard sets (“Cytokine”, St.-Petersburg) according to the technique attached to a set. The investigation of the basic indicators of thyroid status — free thyroxine (FT₄), free triiodothyronine (FT₃), thyroid-stimulating hormone (TSH), anti-thyroid peroxidase antibodies (TPOAb) is carried out by the ELISA using standard sets and NGO techniques «Diagnostic systems»

(N-Novgorod). The researches were conducted twice — before the hospitalization (1—2 days) and after the end of a stationary stage of treatment (12—14 days). **Results.** In 90% of patients with nephrotic option of GN there have been identified laboratory signs of hypothyroidism of different degrees of severity accompanied by increasing of production levels of proinflammatory cytokine IL-1 β and IL-4, related to the activity of a humoral link of adaptive immunity. The reduction of glomerular, erythropoietic, concentration kidney functions, as well as proteinuria in patients with nephrotic option GN are associated with the decrease of T4 levels in the blood and increased levels of the cytokines circulating in the blood — IL-1 β and IL-4. **Conclusion.** The obtained data demonstrate that the high level of production of IL-1 β and IL-4 in GN patients causes hypothyroidism resulting in the formation of NS.

Key words: glomerulonephritis; nephrotic syndrome; cytokines; hypothyroidism, nonthyroidal illness syndrome

For citation: Karzakova L.M., Avtonomova O.I., Kudryashov S.I., Komelyagina N.A., Ukhterova N.D. The role of circulating cytokines and thyroid hormones in the development of the nephrotic variant of glomerulonephritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 76—82. (in Russ).

For correspondence: Louise M. Karzakova, Doctor of Medical Sciences, Head of Hospital therapy Department №2, Chuvash State University; 15, Moskovskij pr., Cheboksary, 428015, Russian Federation, e-mail: luizak58@mail.ru.

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Karzakova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-5899-6352>

Avtonomova O.I., <http://orcid.org/0000-0001-9259-2661>

Kudryashov S.I., <http://orcid.org/0000-0003-2277-9425>

Komelyagina N.A., <http://orcid.org/0000-0002-4155-4849>

Ukhterova N.D., <http://orcid.org/0000-0003-1808-6845>

Received 12.03.2016

Введение

Ключевой компонент нефротического варианта гломерулонефрита (ГН) — нефротический синдром (НС). НС может встречаться практически при всех гистологических вариантах ГН, однако чаще он является проявлением ГН с минимальными изменениями, фокально-сегментарного гломерулосклероза, мембранозной нефропатии, постстрептококкового ГН, экстракапиллярного ГН. Экспериментально доказана связь развития НС с повреждающим действием на подоциты цитокинов — IFN- γ , IL-4 и IL-13 [1, 2]. Клинические исследования циркулирующих в крови цитокинов у больных нефротическим вариантом ГН малочисленны [3, 4], в связи с чем нет целостного представления о роли циркулирующих в крови цитокинов в развитии НС. Известно, что циркулирующие цитокины оказывают системное воздействие на организм, модулируя функции различных органов и систем, необходимых для обеспечения защитных реакций, в том числе влияют и на состояние гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси [5]. В свою очередь, тиреоидные гормоны способны модулировать развитие и функции почек [6].

Цель исследования — изучение особенностей продукции про- и противовоспалительных цитокинов, а также показателей тиреоидного статуса у больных нефротическим ГН.

Методика

Проведено обследование 30 больных нефротическим вариантом ГН, проходивших стационарное лечение. Длительность заболевания — от дебюта ГН до 16 лет. Среди обследованных — 12 женщин и 18 мужчин. В группу сравнения вошли 48 пациентов с ГН, не имевших признаков НС. Для обеспечения репрезентативности результатов исследований проводили рандомизацию групп больных по длительности заболевания, морфофункциональной характеристике, а также по полу, возрасту, социальному статусу, наличию вредных привычек. Клиническими критериями исключения из исследования являлись: 1 — сопутствующие заболевания (сердечно-сосудистые, желудочно-кишечные, сахарный диабет, наркомания, хронический алкоголизм и др.), за исключением острых заболеваний верхних дыхательных путей; 2 — вторичные ГН на фоне системных аутоиммунных заболеваний; 3 — быстро прогрессирующий ГН (экстракапиллярный ГН с образованием полулуний); 4 — ГН с признаками почечной недостаточности (сывороточный креатинин больше 200 мкг/л, скорость клубочковой фильтрации — СКФ — меньше 60 мл/мин); 5 — беременные женщины.

Изучение цитокинового профиля и тиреоидного статуса больных выполнены на базе БУ «Республиканская клиническая больница» МЗ Чувашии, ка-

федры госпитальной терапии № 2 ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», Центриализованной клинико-диагностической лаборатории БУ «Городская клиническая больница № 1» МЗ Чувашии в период с 2007 по 2013 г.

Определение концентрации основных циркулирующих в крови цитокинов — IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ и рецепторного антагониста IL-1 β — Ra-IL-1 β проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в системе бидетерминантного определения антигена с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента с использованием стандартных наборов («Цитокин», С-Петербург) в соответствии с прилагаемой к набору методикой. Основные показатели тиреоидного статуса (ТТГ, Т₄ св., Т₃ св., анти-ТПО) определяли методом ИФА с использованием стандартных наборов и методик НПО «Диагностические системы» (Н-Новгород). Исследования проводили дважды — до начала стационарного лечения (1—2-е сут.) и после завершения стационарного этапа лечения (12-е—14-е сут.).

Полученные данные обрабатывали с помощью статистической программы «Statistica v. 10.0». Ввиду асимметричности распределения совокупности значений показателей в группах вычисляли медиану (Me),

границы варьирования изучаемой совокупности определяли в пределах от 10 до 90 перцентилей, а статистическую значимость различий оценивали по непараметрическому критерию Манна—Уитни (p_{m-w}) для независимых группировок и Вилкоксона (p_w) для сопряженных групп. Статистическую значимость связи между двумя рядами наблюдений оценивали на основании вычисления коэффициента корреляции рангов Спирмена (r_s), статистически значимыми коэффициенты считали при $p_{rs} < 0,05$. Результаты исследования больных сравнивали с референсными значениями, полученными при исследовании 40 практически здоровых лиц.

Результаты и обсуждение

У больных ГН, независимо от клинических проявлений, исходный уровень всех изучаемых цитокинов был повышен (табл. 1).

Факт стимуляция выработки различных про- и противовоспалительных цитокинов при развитии ГН как у больных нефротическим вариантом, так и в группе сравнения, подтверждает преобладающий взгляд на природу ГН как иммунологическую патологию с участием факторов врожденного и приобретенного иммунитета и связанных с их активацией цитокинов [7]. Запуск иммунологических механизмов при развитии ост-

Таблица 1

Цитокиновый профиль больных нефротическим вариантом ГН и группы сравнения

Цитокин, пг/мл		Референсные значения (здоровые), n = 40	Нефротический вариант ГН, n = 30	Группа сравнения, n = 48	p_{m-w}
		Me (P ₁₀ ; P ₉₀)	Me (P ₁₀ ; P ₉₀)	Me (P ₁₀ ; P ₉₀)	
IL-1 β	(1)	1,4	117,5 ^{###} (11,6; 315,8)	12,8 ^{###} (2,5; 206,8)	0,003
	(2)	(0,0; 7,0)	94,3 ^{###} (6,2; 198,4)	12,6 ^{###} (1,3; 213,9)	0,014
IL-2	(1)	5,3	36,1 ^{###} (22,7; 44,0)	29,6 ^{###} (14,8; 126,3)	NS
	(2)	(0,6; 17,9)	25,0 ^{**###} (14,6; 27,8)	30,4 ^{###} (15,5; 281,4)	0,018
IL-4	(1)	1,4	7,9 ^{###} (4,7; 12,8)	4,7 ^{###} (2,5; 8,9)	0,020
	(2)	(0,0; 4,8)	5,4 ^{*###} (1,8; 10,7)	3,8 ^{###} (1,9; 8,1)	NS
IL-10	(1)	0,1	2,9 ^{###} (1,9; 3,8)	4,3 ^{###} (1,7; 10,9)	0,040
	(2)	(0,0; 0,5)	2,8 ^{###} (1,0; 3,3)	2,8 ^{###} (1,9; 8,3)	NS
Ra-IL-1 β	(1)	75,2	1327,1 ^{###} (250,2; 2942,6)	490,9 ^{###} (157,4; 1886,4)	0,016
	(2)	(0,6; 149,4)	963,4 ^{**###} (237,9; 1677,5)	472,9 ^{###} (30,2; 2942,7)	NS
IL-1 β / Ra-IL-1 β	(1)	0,019	0,088 ^{###} (0,040; 0,113)	0,026 (0,016; 0,080)	0,032
	(2)	(0,002; 0,046)	0,098 ^{###} (0,026; 0,118)	0,027 (0,043; 0,073)	0,021
IFN- γ	(1)	5,0	61,5 ^{###} (49,6; 68,2)	64,5 ^{###} (36,6; 308,4)	NS
	(2)	(0,0; 9,4)	43,9 ^{**###} (32,1; 52,0)	56,7 ^{###} (31,6; 377,2)	0,000

Примечание. Здесь и в табл. 3: (1), (2) — концентрации цитокинов на 1-е—2-е сут. и 12-е—14-е сут. стационарного лечения соответственно; p_{m-w} — статистическая значимость различий показателей у больных нефротическим ГН относительно значений больных группы сравнения; * — $p_w < 0,05$, ** — $p_w < 0,01$ — статистическая значимость различия уровней (1) и (2); ## — $p_{m-w} < 0,01$, ### — $p_{m-w} < 0,001$ — статистическая значимость различий показателей у больных относительно референсных значений; NS — различие статистически не значимо ($p_{m-w} > 0,05$).

рого ГН или обострении хронической формы ГН инициируется различными этиологическими факторами (антигены стрептококков, стафилококков, аллергены, химические вещества, эндогенные антигены) или триггерными факторами (переохлаждение, острые вирусные инфекции, внутривенные инъекции, алкоголизм). С помощью Toll-подобных рецепторов (TLR) моноциты, резидентные макрофагальные клетки распознают сходные молекулярные структуры различных патогенов, так называемые патогенассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП). В результате такого взаимодействия с TLR запускается внутриклеточный каскад передачи сигнала, приводящий к экспрессии генов цитокинов. Одним из ранних провоспалительных цитокинов является IL-1 β — медиатор развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма [8]. За счет конститутивной экспрессии своих рецепторов IL-1 β активирует практически все типы клеток, участвующих в воспалительной реакции, включая эндотелий, резидентные макрофаги и все популяции лейкоцитов. Включается также продукция других цитокинов — поздних провоспалительных (IL-6, IL-2, IFN- γ) и противовоспалительных (Ra-IL-1 β , IL-10).

Обнаружен ряд различий в уровнях продукции цитокинов у пациентов нефротическим вариантом ГН и группы сравнения. В частности, у первых исходные уровни IL-1 β и IL-4 превышали таковые у больных группы сравнения, а уровень противовоспалительного цитокина — IL-10 был снижен. Параллельно с ростом продукции IL-1 β повышался уровень Ra-IL-1 β , продукция которого, как известно, происходит под действием тех же стимулов, что и IL-1 β , и который конкурирует с IL-1 β за связь с общим рецептором и, связывая последний, блокирует провоспалительную активность IL-1 β [9]. Если у больных группы сравнения уровни продукции IL-1 β и Ra-IL-1 β повышались в равной степени, о чем свидетельствует сохранение баланса их уровней (IL-1 β /Ra-IL-1 β) в пределах референсных значений, то у больных нефротическим ГН рост уровня IL-1 β преобладал над степенью продукции Ra-IL-1 β , и в результате соотношение IL-1 β /Ra-IL-1 β более чем в 3 раза превышало аналогичный показатель в группе сравнения и в 4,6 раза — в группе здоровых.

Обнаруженное у больных нефротическим вариантом ГН превышение исходного уровня IL-4 и сниженные уровни IL-2, IFN- γ к концу стационарного лечения можно в определенной степени считать проявлением поляризации иммунного ответа в сторону преобладания активации гуморального механизма адаптивного иммунного ответа, связанного, как известно, с функцией хелперных клеток типа Th2 []. Авторы, занимавшиеся изучением НС у детей, пришли к заключению, что данный синдром ассоциируется с атопическими проявлениями, повышенным уровнем сывороточного IgE и, следовательно, с преобладанием функции Th2 [11]. Действительно, *in vitro* показано, что IL-4 и IL-13, продуцируемые Th2, способны оказывать повреждающее действие на подоциты путем связывания с рецепторами IL-4R2, предполагается, что данные цитокины играют важную роль в патогенезе специфических изменений в структуре подоцитов и клубочковой проницаемости у больных ГН с минимальными изменениями [2].

Обнаружена связь уровней продукции IL-1 β , IL-4 и IFN- γ у обследуемых больных с содержанием в крови тиреоидных гормонов (табл. 2). Уровень IL-1 β имел, кроме того, прямую связь с концентрацией ТТГ.

Анализ показателей тиреоидного статуса выявил у пациентов с нефротическим ГН повышение уровня ТТГ и снижение Т₄ св. (табл. 3). У 16 больных (53%) с данным вариантом ГН содержание в крови Т₄ св. было на уровнях ниже 10 перцентильного значения здоровых, а уровень ТТГ выше значения, соответствующего 90 перцентилем здоровых. Следовательно, у 53% больных нефротическим ГН имелись признаки гипотиреоза. Между уровнем ТТГ и Т₄ имеется отрицательная логарифмическая зависимость, в связи с чем даже небольшое снижение концентрации Т₄ св. трансформируется в значительно большее увеличение уровня ТТГ. У 11 пациентов (37%) обнаружено повышение уровня ТТГ на фоне сохранения концентрации Т₄ св. на уровнях референсных значений, что дает основание расценивать изменения в тиреоидном статусе данных больных как субклинический гипотиреоз, для которого характерно умерен-

Таблица 2

Статистически значимые корреляционные связи показателей цитокинового и тиреоидного статуса у больных ГН

Цитокин	Показатели тиреоидного статуса	r _s	p _{rs}
IL-1 β	ТТГ	0,33	0,004
	Т ₄ св.	0,21	0,012
IL-4	Т ₄ св.	0,38	0,003
IFN- γ	Т ₃ св.	0,33	0,004

ное повышение концентрации ТТГ в крови при нормальных уровнях Т₄ св. и Т₃ св. [12].

Таким образом, у 90% больных нефротическим вариантом ГН выявлены лабораторные признаки гипотиреоза разной степени выраженности, связанного, по всей видимости, с избыточной продукцией провоспалительного цитокина — ИЛ-1β. Известно, что провоспалительные цитокины, включая ИЛ-1β, блокируют транскрипцию генов внутреннего мембранного белка, обеспечивающего активный транспорт йодидов в клетки щитовидной железы, уменьшают организацию йодидов, синтез тиреоглобулина и снижают выработку тиреоидных гормонов [13, 14]. Возможно, что тиреотропные эффекты цитокинов обусловлены активацией аутоиммунных процессов повреждения щитовидной железы, о чем свидетельствует повышение медианы концентрации анти-ТПО при нефротическом варианте ГН.

В ряде работ обсуждается роль тиреоидных гормонов при патологии почек [15—17]. В преобладаю-

щем числе публикаций сообщается об обнаружении у пациентов с патологией почек признаков гипотиреоза в рамках варианта «синдрома нетиреоидных заболеваний» (СНТЗ) — «синдрома низкого ТЗ» [16, 17].

Уровень Т₄ св. обнаруживал корреляционные связи с рядом лабораторных показателей мочи и крови, характеризующих функциональное состояние почек (табл. 4).

Анализируя выявленные связи, можно заключить, что Т₄ св. положительно влияет на клубочковую (азотвыделительную) функцию почек, о чем свидетельствует обратная связь уровня данного гормона с содержанием в крови креатинина. Кроме того, Т₄ св. положительно коррелирует с числом эритроцитов в крови, что косвенно указывает на его стимулирующее влияние на эритропоэтическую функцию почек. Обладает антипротеинурическим эффектом (отрицательная связь Т₄ св. с концентрацией белка в моче) и положительным влиянием на концентрационную функцию почек (прямая связь Т₄ св. с удельным весом

Таблица 3

Показатели тиреоидного статуса у больных нефротическим вариантом ГН и группы сравнения

Показатель, ед. измерения		Референсные значения (здоровые), n = 40	Нефротический вариант ГН, n = 30	Группа сравнения, n = 48	P _{m-w}
		Me P ₁₀ — P ₉₀	Me P ₁₀ — P ₉₀	Me P ₁₀ — P ₉₀	
ТТГ, мМЕ/л	(1)	1,9	5,4 ^{###} 2,5-7,3	2,3 1,2-3,8	0,000
	(2)	0,4-2,8	2,6 ^{**} 1,2-4,3	2,2 1,0-5,6	NS
Т ₃ св., пмоль/л	(1)	4,8	7,5 2,9-16,5	4,3 3,2-8,1	NS
	(2)	3,2-7,2	4,4 3,4-9,8	4,0 3,2-8,9	NS
Т ₄ св., пмоль/л	(1)	17,4	11,6 ^{**} 5,0-17,2	16,2 12,7-20,0	0,004
	(2)	12,0-22,1	13,0 ^{###} 10,3-13,7	15,8 12,1-21,2	0,000
Анти-ТПО, ЕД/мл	(1)	14,2	91,2 ^{**} 0-361,8	21,2 0-45,1	0,000
	(2)	0-28,0	81,6 ^{**} 0-329,0	18,6 0-29,5	0,000

Таблица 4

Статистически значимые связи уровней Т св. и ИЛ-1β с лабораторными показателями крови и мочи

Лабораторные показатели	Т ₄ св.	ИЛ-1β
	r _s (p _{rs})	r _s (p _{rs})
Кровь		
Эритроциты	0,24 (0,001)	—
С-РБ	—	0,29 (0,001)
Креатинин	0,21 (0,041)	0,60 (0,000)
Моча		
Креатинин	0,23 (0,002)	—
Удельный вес	0,23 (0,003)	-0,24 (0,001)
Белок	0,36 (0,000)	—
Зернистые цилиндры	0,25 (0,001)	0,25 (0,001)
Эритроциты	—	0,22 (0,002)

мочи), уменьшает повреждение почек (отрицательная связь с числом зернистых цилиндров в моче). Противоположно влияние на большинство из названных почечных функций у провоспалительного цитокина — IL-1 β .

Установленное у больных нефротическим вариантом ГН статистически значимое повышение сывороточного уровня креатинина до $126 \pm 8,8$ мкмоль/л (против $104,9 \pm 32,3$ мкмоль/л в группе сравнения, $p < 0,05$), протеинурия нефротического уровня — $3,3 \pm 3,5$ г/л (в группе сравнения — $0,3 \pm 0,4$ г/л, $p < 0,001$), увеличение содержания зернистых цилиндров в моче до $3,5 \pm 0,5$ в поле зрения (в группе сравнения — $1,1 \pm 0,5$ в поле зрения, $p < 0,001$), низкие значения содержания эритроцитов — $3,5 \pm 0,1 \times 10^{12}$ /л (в группе сравнения — $4,1 \pm 0,5 \times 10^{12}$ /л, $p < 0,01$) и общего белка — $58,5 \pm 7,3$ г/л (в группе сравнения — $72,1 \pm 6,4$ г/л, $p < 0,001$) в крови могут быть связаны с гипотиреозом, развившимся в условиях продукции высокого уровня IL-1 β . При обследовании больных первичным гипотиреозом также обнаруживали повышение уровня креатинина в крови на фоне снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ) [18]. Такие же изменения уровня креатинина и СКФ описаны при субклиническом гипотиреозе [19]. В снижении СКФ при гипотиреозе могут быть задействованы различные патогенетические механизмы: снижение клубочковой фильтрации вследствие уменьшения сердечного выброса (отрицательные хронотропный и инотропный эффекты) и нарастание периферического сопротивления кровотоку из-за повышенного тонуса, а также внутривисцеральная вазоконстрикция, снижение экспрессии генов таких почечных дилататоров, как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) [20]. Кроме того, снижению СКФ при гипотиреозе способствуют структурные изменения в клубочках — утолщение базальной мембраны клубочков, пролиферация мезангиального матрикса, усугубляющие изменения в клубочках, связанные с ГН [21].

Изменения канальцевой функции почек связаны преимущественно с угнетением активности Na⁺/K⁺-АТФазы клеток на ранних сроках гипотиреозного состояния в проксимальных канальцах, а позже практически во всех сегментах нефрона [22], в чего результате уменьшается реабсорбция натрия и бикарбоната. Сниженная реабсорбтивная мощность приводит к неспособности поддерживать определенный уровень осмотического давления в мозговом слое, являющегося движущей силой концентрационной функции почек. При гипотиреозе повышается чувствительность собирательных трубочек к действию антидиуретического гормона (АДГ), что приво-

дит к повышению реабсорбции воды. Гипотиреоз сопровождается снижением сердечного выброса, что запускает стимуляцию каротидных барорецепторов и в конечном итоге увеличивает неосмотическую секрецию АДГ [23]. Гипотиреоз приводит к повышению проницаемости клубочкового фильтра для белков и развитию протеинурии [24]. Снижение СКФ, нарушение реабсорбции натрия, бикарбонатов, относительное увеличение продукции АДГ и повышенная чувствительность почек к нему, протеинурия приводят к задержке и накоплению жидкости, развитию отеков.

Развивающийся при нефротическом ГН гипотиреоз связан с нарушением баланса продукции провоспалительного цитокина — IL-1 β и его рецепторного антагониста в сторону преобладания первого. Известно, что циркулирующие провоспалительные цитокины, наряду со снижением уровня инсулиноподобного ростового фактора, ацидозом, при почечной патологии являются основными факторами развития гиперкатаболического состояния [25]. Изменение продукции тиреоидных гормонов по типу гипотиреоза той или иной степени выраженности является компенсаторно-приспособительной реакцией, направленной на снижение энергетических затрат в организме. Показано, что длительно существующий гипертиреоз у экспериментальных животных приводит к возникновению или отягощению патологии почек из-за оксидативного стресса, активности ренин-ангиотензиновой системы, клубочковой гиперфильтрации и сопутствующей протеинурии [6]. Вместе с тем, есть данные о связи гипотиреозного состояния с высоким риском летальности у пациентов с хроническими заболеваниями почек. Авторы предполагают, что развивающееся при почечной патологии гипотиреозное состояние не столько адаптационное, сколько неадекватное [25].

Таким образом, у больных ГН с исходно повышенной продукцией IL-1 β и активностью гуморальной составляющей адаптивного иммунного ответа, связанной с функцией Th2, создаются условия для развития гипотиреоза. Гипотиреоз, возникающий как компенсаторная реакция в ответ на развитие катаболических процессов у больных ГН, инициированных циркулирующим в крови провоспалительным цитокином — IL-1 β , вызывает снижение клубочковой, эритропоэтической, концентрационной функций почек, задержку жидкости, обуславливая в целом формирование нефротического синдрома.

References

1. Coers W., Vos J.T., Van der Meide P.H., Van der Horst M.L., Huitema S., Weening J.J. Interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-4 expressed during mercury-induced

membranous nephropathy are toxic for cultured podocytes. *Clin Exp Immunol.* 1995; 102(2): 297-07.

2. Van Den Berg J.G., Aten J., Annink C., Ravesloot J.H., Weber E., Weening J.J. Interleukin-4 and -13 promote basolateral secretion of H⁺ and cathepsin L by glomerular epithelial cells. *Am J. Physiol. Renal Physiol.* 2002; 282(1): F26-33.

3. Vashurina T.V., Sergeeva T.V., Cygin A.N., Sencova T.B. Levels interleukin-1 and interleukin-2 at primary chronic glomerulonephritis in children. In: *Theses reports of the 2th congress of pediatricians-nephrologists of Russia [Tezisy dokladov II sezda pediatrov-nefrologov Rossii]*, Moscow; 2000: 70-3. (in Russian)

4. Jordan S.C., Querfeld U., Toyoda M., Prehn J. Serum interleukin-2 levels in a patient with focal segmental glomerulosclerosis. Relationship to clinical course and cyclosporin A therapy. *Pediatr. Nephrol.* 1990; 4(2): 166-68.

5. Gavin C., Meggison H., Ooi T.C. Proposing a causal link between thyroid hormone resistance and primary autoimmune hypothyroidism. *Med. Hypotheses.* 2008; 70(5): 1024-28.

6. Van Hoek I., Daminet S. Interactions between thyroid and kidney function in pathological conditions of these organ systems: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2009; 160: 205-15.

7. Uwaezuoke S.N. Steroid-sensitive nephrotic syndrome in children: triggers of relapse and evolving hypotheses on pathogenesis. *Ital. J. Pediatr.* 2015; 41: 19.

8. Buttini M., Boddeke H. Peripheral Lipopolysaccharide Stimulation Induces Interleukin-1 β Messenger RNA in Rat Brain Microglial Cells. *Neuroscience.* 1995; 65(2): 523-30.

9. Huang H.Y., Wen Y., Kruessel J.S., Raga F., Song Y.K., Polan M.L. Interleukin (IL)-1 β regulation of IL-1 β and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 1387-93.

10. Tipping P.G., Kitching A.R. Glomerulonephritis, Th1 and Th2: what's new? *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 142(2): 207-15.

11. Bagga A., Mantan M. Nephrotic syndrome in children. *Indian J. Med. Res.* 2005; 122: 13-28.

12. ALGani F.A. The Use of Thyroid-Stimulating Hormone for Description Sub-Clinical Hypothyroidism. *Int. J. Biol. Med. Res.* 2011; 2(4): 1175-77.

13. Dohan O., De la Vieja A., Carrasco N. Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000; 11(3): 99-105.

14. Dubois J.M., Dayer J.M., Siegrist-Kaiser C.A., Burger A.G. Human recombinant interleukin-1 β decreases plasma thyroid hormone and thyroid stimulating hormone levels in rats. *Endocrinology.* 1988; 123: 2175-81.

15. Tanaka A., Maeda K., Sawai K., Okuda J., Sugawara A., Kuwahara T. Concealed hypothyroidism in patients with myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic autoantibodies- (MPO-ANCA) positive renal disease. *Clin. Nephrol.* 1999; 52(2): 91-5.

16. Rhee C.M., Kalantar-Zadeh K., Streja E., Carro J.-J., Ma J.Z., Lu J.L. et al. The relationship between thyroid function and estimated glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2015; 30(2): 282-87.

17. Xu G., Yan W., Li J. An update for the controversies and hypotheses of regulating nonthyroidal illness syndrome in chronic kidney diseases. *Clin. Exp. Nephrol.* 2014; 18(6): 837-43.

18. Karanikas G., Schutz M., Szabo M. Isotopic renal function studies in severe hypothyroidism and after thyroid hormone replacement therapy. *Am. J. Nephrol.* 2004; 24: 41-5.

19. Verhelst J., Berwaerts J., Marescau B. Serum creatinine, creatinine, and other guanidino compounds in patients with thyroid dysfunction. *Metabolism.* 1997; 46: 1063-67.

20. Dousdampanis P., Trigka K., Vagenakis G.A., Fourtounas C. The thyroid and the kidney: a complex interplay in health and disease. *Int. J. Artif. Organs.* 2014; 37(1): 1-12.

21. Bradley S.E., Coelho J.B., Sealey J.E., Edwards K.D., Stephan F. Changes in glomerulotubular dimensions, single nephron glomerular filtration rates and the renin-angiotensin system in hypothyroid rats. *Life Sci.* 1982; 30: 633-9.

22. Garg L.C., Tisher C.C. Effects of thyroid hormone on Na-K-adenosine triphosphatase activity along the rat nephron. *J. Lab. Clin. Med.* 1985; 106: 568-72.

23. Hanna F.W., Scanlon M.F. Hyponatraemia, hypothyroidism, and role of arginine-vasopressin. *Lancet.* 1997; 350: 755-6.

24. Wheatley T., Edwards O.M. Mild hypothyroidism and oedema: Evidence for increased capillary permeability to protein. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 1983; 18: 627-35.

25. Carrero J.J., Park S.H., Axelsson J., Lindholm B., Stenvinkel P. Cytokines, atherogenesis, and hypercatabolism in chronic kidney disease: a dreadful triad. *Semin. Dial.* 2009; 22: 381-6.

Сведения об авторах:

Автономова Ольга Ильинична, аспирант каф. госпитальной терапии № 2 с курсом клинической иммунологии

Кудряшов Сергей Игоревич, аспирант каф. госпитальной терапии № 2 с курсом клинической иммунологии

Комелягина Надежда Анатольевна, канд. мед. наук, доцент каф. госпитальной терапии № 2 с курсом клинической иммунологии

Ухтерова Надежда Димитриевна, канд. мед. наук, доцент каф. госпитальной терапии № 2 с курсом клинической иммунологии

Брин В.Б.^{1,2}, Митциев К.Г.², Митциев А.К.¹, Кабисов О.Т.²

Влияние гипervитаминоза D₃ на гемодинамические проявления экспериментальной медной интоксикации

¹ — ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 362019, Республика Северная Осетия-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 40

² — ИБМИ ВНЦ РАН и РСО-Алания. 362019, Республика Северная Осетия-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 40

Медь, являясь одним из составных компонентов различных ферментов, относится к жизненно важным микроэлементам, однако избыточное поступление меди в организм приводит к развитию многочисленных токсических эффектов. Наиболее значимо патогенное влияние ксенобиотика на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. Установлено, что кальций, является конкурентным биометаллом для ксенобиотиков, и состояние искусственной гиперкальциемии, как в эксперименте, так и в клинике используется для профилактики негативных эффектов большинства тяжелых и цветных металлов. Однако работы, посвященные изучению профилактической эффективности кальция в условиях медной интоксикации, в научной литературе практически отсутствуют. **Цель исследования** — изучение влияния хронической медной интоксикации на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы и её реактивность в условиях экспериментальной гиперкальциемии. **Методика.** Модель экспериментальной гиперкальциемии создавали путем формирования экспериментального гипervитаминоза D, посредством введения препарата «Аквадетрим» через атравматичный зонд в желудок в дозировке 3000 МЕ (0,2 мл)/100 г массы тела животного в течение 30 сут. Модель хронической медной интоксикации создавалась путем внутрижелудочного введения раствора сульфата меди в дозировке 20 мг/кг (в пересчете на металл) в течение 30 сут, ежедневно, 1 раз в сутки. Для оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы определяли среднее артериальное давление, удельное периферическое сосудистое сопротивление, ударный индекс, сердечный индекс, реактивность ренин-ангиотензиновой системы и адренореактивность сердечно-сосудистой системы. **Результаты.** Исследование показало, что длительная интоксикация медью приводит к развитию артериальной гипертензии, обусловленной повышением общего сосудистого периферического сопротивления, наряду с этим отмечается снижение показателей насосной функции сердца. Экспериментальная гиперкальциемия усиливает токсические эффекты сульфата меди на сердечно-сосудистую систему. **Заключение.** Отравление организма медью характеризуется развитием артериальной гипертензии, а гиперкальциемия потенцирует кардиотоксические действие меди.

Ключевые слова: сердечно-сосудистая система, гиперкальциемия, сульфат меди, кальцитриол

Для корреспонденции: Брин Вадим Борисович, доктор мед. наук, проф., зав. кафедрой, e-mail: vbbrin@yandex.ru

Для цитирования: Брин В.Б., Митциев К.Г., Митциев А.К., Кабисов О.Т. Влияние гипervитаминоза D₃ на гемодинамические проявления экспериментальной медной интоксикации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 61(3): 83—87.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.07.2015

Brin V.B.^{1,2}, Mittsiev K.G.¹, Mittsiev A.K.², Kabisov O.T.¹

Influence hypervitaminosis D₃ on hemodynamic presentation of experimental copper intoxication

¹ — State Educational Institution of Higher Professional Education «North Ossetian State Medical Academy» Russian Ministry of Health. 362019, Republic of North Ossetia-Alania, Vladikavkaz, st. Pushkinskaya, 40

² — Biomedical Research Institute of Vladikavkaz Scientific Centre & RNO-Alania. 362019, Republic of North Ossetia-Alania. Vladikavkaz, st. Pushkinskaya, 40

As a component of various enzymes, it refers to copper essential trace elements, but the excessive consumption of the metal leads to the development of the pathogenic effects of xenobiotics on the functional condition of the cardiovascular system. However, the works devoted to the study of the effectiveness of prophylactic calcium in a copper toxicity, is not in the current literature. **The purpose:** study the effect of long-term toxicity of copper on the functional state of the cardiovascular system and its reactivity in experimental hypercalcemia. **Methods.** Experimental hypercalcemia model was created by forming a pilot hypervitaminosis D, by introducing «Аквадетрим» atraumatic preparation through a probe into the stomach in the

dose 3000 IU (0.2 ml) / 100 g of body weight for 30 days. Chronic copper poisoning model created by intragastric administration of copper sulfate solution at a dosage of 20 mg/kg (in terms of metal) for 30 days, daily one time a day. The study of the functional state of the cardiovascular system is to determine the mean arterial pressure, specific peripheral vascular resistance, stroke index, cardiac index, the reactivity of the renin-angiotensin system and adrenoreactivity cardiovascular system. **Results.** The experimental study revealed that long-term copper poisoning leads to the development of hypertension due to an increase in total peripheral vascular resistance, along with the marked decline in the pumping function of the heart. Experimental hypercalcemia simulated by intragastric administration of vitamin D promotes more pronounced toxic effects of copper sulfate on the cardiovascular system. **Conclusion.** Copper poisoning of the body is characterized by the development of hypertension and the condition of artificial hypercalcemia potentiates the cardiotoxic effects of copper.

Keywords: cardiovascular system, hypercalcemia, copper sulfate, calcitriol

For correspondence: Vadim B. Brin, MD, Professor, Head of the Department of Normal Physiology State Budgetary Educational Institution «North Ossetian State Medical Academy» Russian Ministry of Health. 362019. Russian Federation, Vladikavkaz, street Pushkin, 40. e-mail: vbbrin@yandex.ru

For citation: Brin V.B., Mittsiev K.G., Mittsiev A.K., Kabisov O.T. Influence hypervitaminosis D₃ on hemodynamic presentation of experimental copper intoxication. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 83—87. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship

Information about authors:

Brin V.D. <http://orcid.org/0000-0001-8382-3210>

Mittsiev A.K. <http://orcid.org/0000-0002-9414-5387>

Received 25.07.2015

Введение

Медь является одним из важнейших микроэлементов, принимающих активное участие в различных внутриклеточных процессах. Большая часть (80—95%) поступившей в организм меди формирует прочные ковалентные связи с церулоплазмином, остальные 5—20%, взаимодействуя с альбумином, образуют так называемую «свободную медь», увеличение концентрации которой приводит к интоксикации [1]. Внутриклеточная концентрация меди является одной из жестких констант, так как даже ее незначительное повышение приводит к развитию мощного окислительного стресса [2]. Медь и ее соединения являются наиболее распространенными химическими веществами, используемыми в промышленности и сельском хозяйстве, ввиду чего острое и хроническое отравление данным металлом встречается довольно часто [3, 4]. Особый интерес у исследователей вызывает участие меди в регуляции работы миокарда и уровня артериального давления. Установлено, что нарушение процессов метаболизма, меняющих гомеостазис меди, приводит к повышению уязвимости сердца и кровеносных сосудов [5], однако вопрос о гипертензивном влиянии меди до сих пор остается дискуссионным, поскольку имеются работы, в которых описывается наличие, как прямой взаимосвязи между уровнем артериального давления и концентрацией меди в крови [6], так и исследования, полностью отрицающие наличие корреляции между степенью гипертензивных изменений и концентрацией меди в плазме [7].

В экспериментальных условиях была установлена профилактическая эффективность кальция в условиях хронического отравления свинцом и кадмием, вследствие присущих кальцию выраженных ионообменных свойств [8]. Также известно, что кальций является конкурентным металлом по отношению к меди и способен снижать выраженность токсических эффектов ксенобиотика в условиях хронического отравления [9].

Цель исследования — изучение влияния медной интоксикации на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы и ее реактивность в условиях экспериментальной гиперкальциемии.

Методика

Работа выполнена на 45 крысах-самцах Wistar. При проведении экспериментов руководствовались статьей 11-й Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267). Крысы в течение эксперимента находились на стандартном пищевом рационе, имели свободный доступ к пище и воде в течение суток. Модель экспериментальной гиперкальциемии создавали путем формирования экспериментального гипervитаминоза D₃ посредством ежедневного введения препарата «Аквдетрим» через атравматич-

ный зонд в желудок в дозировке 3000 МЕ (0,2 мл)/100 г массы тела животного в течение 30 сут., что не является чрезмерной водной нагрузкой [10]. Через 30 сут. проводили исследование функционального состояния сердечно-сосудистой системы, определяли концентрацию кальция в плазме крови животных (интактные животные — $2,23 \pm 0,06$ ммоль/л; животные с внутрижелудочным введением препарата «Аквадетрим» — $2,95 \pm 0,04$ ммоль/л). У животных, получавших изолированное внутрижелудочное введение препарата «Аквадетрим», отмечалась тенденция к росту среднего артериального давления. Модель хронической медной интоксикации создавали путём внутрижелудочного введения раствора сульфата меди в дозировке 20 мг/кг (в пересчёте на металл) в течение 30 сут., ежедневно. Исследовано 3 группы животных: 1-я группа — контрольные животные, с внутрижелудочным введением фиксированного объема физиологического раствора; 2-я группа — животные с внутрижелудочным введением сульфата меди; 3-я группа — животные с внутрижелудочным введением сульфата меди на фоне интрагастрального введения препарата «Аквадетрим». В ходе эксперимента животным с целью изучения реактивности сердечно-сосудистой системы в бедренную вену вводились ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) каптоприл в дозе 30 мг/кг и α_1 -адреноблокатор доксазозин в дозе 20 мг/кг. Гемодинамические показатели определяли в остром эксперименте под тиопенталовым наркозом. Артериальное давление измеряли путем введения в бедренную артерию пластикового катетера, заполненного 10%-ным раствором гепарина и подключенного к электроманометру «ДДА» (Россия). Показания регистрировали с помощью монитора МХ-04 (Россия). Рассчитывали среднее артериальное давление (САД) по формуле $САД = ДД + 1/3 ПД$, где ДД — диастолическое давление, ПД — пульсовое давление. Для определения минутного объема крови через левую общую сонную артерию в дугу аорты вводили термистор МТ-54М (Россия). Физиологический раствор фиксируемой температуры объемом 0,2 мл инъецировали в правое предсердие через катетеризируемую правую яремную вену. Кривые термодилуции регистрировали на самописце ЭПП-5 (Россия). По специальным формулам [11] рассчитывали сердечный индекс (СИ), ударный индекс (УИ) и удельное периферическое сосудистое сопротивление (УПСС). Полученные результаты экспериментальных исследований статистически обработаны с применением критерия «t» Стьюдента методом вариационного анализа, с помощью программы Prisma 4.0.

Результаты и обсуждение

В условиях хронической медной интоксикации отчетливо выражена гипертензивная реакция сердечно-сосудистой системы. Основной причиной повышения САД у крыс, получавших сульфат меди, было увеличение УПСС (табл. 1). Существует мнение о том, что изменение сосудистого тонуса в условиях отравления медью связано со способностью ксенобиотика трансформировать процессы симпатической регуляции, приводящие к системной вазоконстрикции [12]. Помимо данных эффектов медь в условиях хронического отравления негативно влияла на насосную функцию сердца, что проявлялось снижением УИ и, как следствие, уменьшением СИ (табл. 1). Определение реактивности ренин-ангиотензиновой системы у животных получавших внутрижелудочное введение сульфата меди, выявило лишь тенденцию к снижению САД и УПСС спустя 1 и 60 мин после введения каптоприла, что свидетельствует о снижении реактивности ренин-ангиотензиновой системы (табл. 2). Из данных литературы известно, что медь в условиях хронического отравления снижает чувствительность эндотелия сосудистого русла к ангиотензину II [13], тем самым, видимо, внося существенный вклад в снижение реактивности ренин-ангиотензиновой системы.

Через 1 мин после введения доксазозина САД снижалось относительно исходных значений. Данная реакция была обусловлена уменьшением УПСС. Следует указать, что реакция снижения САД у животных, получавших сульфат меди через 1 мин после введения доксазозина статистически значимо не отличалась от контроля (табл. 2). Через 60 мин после введения доксазозина проявлялась дальнейшая тенденция к снижению САД, связанная с уменьшением УПСС. Величина снижения САД через 60 мин после введения доксазозина во 2-й группе животных была более выраженной (табл. 2). Таким образом, снижение способности системы кровообращения к восстановлению исходных гемодинамических параметров после α_1 -адреноблокады в условиях хронической медной интоксикации подтверждалось более выраженной реакцией снижения САД и УПСС спустя 60 мин после введения доксазозина (табл. 2).

В условиях хронической интоксикации сульфатом меди на фоне экспериментальной гиперкальциемии установлено развитие артериальной гипертензии, вследствие значительного роста удельного периферического сосудистого сопротивления относительно фона и соответствующих показателей в группе животных, получавших только $CuSO_4$ (табл. 1). Таким образом, гемодинамические эффекты интрагастрально вводимого ксенобиотика приобретают более значимый характер на фоне искусственного гипервитамино-

Влияние сульфата меди на основные гемодинамические показатели у крыс в условиях экспериментальной гиперкальциемии ($M \pm m$)

Группы опыта	САД	УПСС	СИ	УИ
1-я гр. Фон	103,9 ± 0,85	1,52 ± 0,04	55,19 ± 1,48	0,143 ± 0,005
2-я гр. CuSO ₄ внутривенно	120,4 ± 1,7*	2,09 ± 0,09*	40,70 ± 1,22*	0,101 ± 0,004*
3-я гр. CuSO ₄ внутривенно + Аквадетрим внутривенно	139,1 ± 2,12*,#	2,61 ± 0,11*,#	39,0 ± 1,7*,#	0,094 ± 0,005*,#

Примечание. * — статистически значимые изменения по сравнению с фоном ($p \leq 0,001$); # — статистически значимые изменения относительно 2-й группы.

Относительные сдвиги показателей системной гемодинамики у экспериментальных животных после введения доксазозина и каптоприла по сравнению с исходными данными (%)

Условия опыта	САД (каптоприл)		УПСС (каптоприл)		САД (доксазозин)		УПСС (доксазозин)	
	1 мин	60 мин	1 мин	60 мин	1 мин	60 мин	1 мин	60 мин
Фон	-40%	-24%	-46%	-25%	-41%	-12%	-43%	-11%
Группа №2	-21%*	-20%	-26%*	-22%	-46%	-30%*	-44%	-31%*
Группа №3	-19%*	-18%	-23%*	-21%	-44%	-27%**	-42%	-29%**

Примечание. * — статистически значимое ($p \leq 0,001$) изменение по сравнению с фоном; ** — статистически значимое ($p \leq 0,05$) изменение по сравнению с фоном.

за D₃, что, по всей видимости, объясняется активацией процессов всасывания меди в желудочно-кишечном тракте под влиянием кальцитриола, который, как известно, увеличивает количество кальциевых транспортных систем [14], обеспечивающих повышенную абсорбцию тяжелых металлов в системе пищеварения и поступление во внутреннюю среду организма.

Оценка показателей, характеризующих α_1 -адренореактивность и реактивность ренин-ангиотензиновой системы у экспериментальных животных, получавших сульфат меди в условиях экспериментальной гиперкальциемии, выявила изменения аналогичные наблюдаемым в группе животных, изолированно получавших CuSO₄ (табл. 2), что, по-видимому, свидетельствует о способности меди нивелировать влияние гиперкальциемии на сердечно-сосудистую систему. Из данных литературы известно, что ионы меди являются непосредственными антагонистами ангиотензиновых рецепторов, а увеличение концентрации кальция в крови приводит к снижению чувствительности сосудистого русла к прессорным эффектам ангиотензина II [15]. Ранее было показано, что при хроническом поступлении в организм меди происходит повышение адренореактивности сердечно-сосудистой системы, что связано с выраженной способностью ксенобиотика приводить к мощной внутриклеточной генерации ионов супероксида [16]. Также известно, что в условиях гиперкальциемии происходит увеличение адренореактивности сердечно-сосудистой системы [17]. Вероятно, сочетанием этих механизмов и объясняется отсутствие разли-

чий в реакции сердечно-сосудистой системы на внутривенное введение каптоприла и доксазозина в группах животных получавших только CuSO₄ и у крыс с внутривенным введением сульфата меди на фоне гипервитаминоза D.

Таким образом, длительное поступление меди в организм и сочетание введения меди с экспериментальной гиперкальциемией приводят к развитию артериальной гипертензии, основным патогенетическим механизмом которой является повышение общего периферического сосудистого сопротивления, развивающееся вследствие изменений α_1 -адренореактивности сердечно-сосудистой системы и реактивности ренин-ангиотензиновой системы. Насосная функция сердца при этом снижена. Экспериментальная гиперкальциемия усиливает негативное влияние длительного внутривенного введения сульфата меди на сердечно-сосудистую систему.

References

1. Brewer G.J. Copper toxicity in the general population. *Clinical Neurophysiology*. 2010; 121(4): 459-60.
2. Ardehali H., Rines A. K. Transition metals and mitochondrial metabolism in the heart. *J of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013; (55): 50-7.
3. Hassan S., Shaikh M.U., Ali N., Riaz M. Copper sulphate toxicity in a young male complicated by methemoglobinemia, rhabdomyolysis and renal failure. *J of the College of Physicians and Surgeons Pak*. 2010; 20(7): 490-1

4. Sinkovic A., Strdin A., Svensek F. Severe acute copper sulphate poisoning: a case report. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 2008; 59(1): 31-5.
5. Uriu-Adams J.Y., Keen C.L. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005; 26 (4-5): 268-98.
6. Ghayour-Mobarhan M., Shapouri-Moghaddam A., Azimi-Nezhad M., et al. The relationship between established coronary risk factors and serum copper and zinc concentrations in a large Persian cohort. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2009; 23(3): 167-75.
7. Sierra A., Larrousse M. Endothelial dysfunction is associated with increased levels of biomarkers in essential hypertension. *J Human Hypertension*. 2010; (6): 373-79.
8. Mata Y.N., Blazquez M.L., Ballester A., et al. Biosorption of cadmium, lead and copper with calcium alginate xerogels and immobilized *Fucus vesiculosus*. *J of Hazardous Materials*. 2009; 163 (2-3): 555-62.
9. Poulsen S.B., Svendsen J.C., Aarestrup K., Malte H. Calcium-dependent behavioural responses to acute copper exposure in *Oncorhynchus mykiss*. *J of Fish Biology*. 2014; 84 (5): 1326-39.
10. Mittsiev K.G., Brin V.B., Mittsiev A.K., Kabisov O.T. Vlijanie giperkal'ciemii, vyzvannoj kal'citriolom, na funkcional'noe sostojanie serdechno-sosudistoj sistemy. *Vladikavkazskij mediko-biologicheskij vestnik*. 2012; 14 (22): 120-23. (in Russian)
11. Brin V.B., Zonis B.Ja. *Fiziologija sistemnogo krovoobrashhenija*: Rostov-na-Donu: Izdatel'stvo Rostovskogo universiteta; 1984. (in Russian)
12. Lukaski H. C. Klevay L. M., Milne D. B. Effects of dietary copper on human autonomic cardiovascular function. *European J of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1988; 58(1-2): 74-80.
13. Li S., Case A.J., Yang R.F., et al. Over-expressed copper/zinc superoxide dismutase localizes to mitochondria in neurons inhibiting the angiotensin II-mediated increase in mitochondrial superoxide. *Redox Biol*. 2013; (2): 8-14.
14. Hoendero J.G., Bindels R.J. Calcitropic and Magnesiotropic TRP Channels. *Physiology*. 2008; (23): 32-40.
15. Aiko A., Ito M., Okamura H., et al. Effect of a low calcium intake on the vascular sensitivity to angiotensin II in normotensive pregnant rats. *Artery*. 1992; 19 (4): 199-210.
16. Chiarugi A., Pitari G.M., Costa R. Effect of prolonged incubation with copper on endothelium-dependent relaxation in rat isolated aorta. *British J Pharmacology*. 2002; 136 (8): 1185-93
17. Trautner S., Amtorp O., Boesgaard S. Noradrenaline-induced increases in calcium and tension in skeletal muscle conductance and resistance arteries from rats with post-infarction heart failure. *European Journal of Pharmacology*. 2006; 537 (1-3): 143-54.

Сведения об авторах:

Митциев Кермен Гагеевич, канд. мед. наук, науч. сотр.

Митциев Астан Керменович, доктор мед. наук, доц. кафедры, e-mail: digur1985@mail.ru

Кабисов Олег Тасолтанович, канд. мед. наук, науч. сотр.

Дмитриева Л.А., Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С.

Современное состояние проблемы доставки лекарственных веществ с использованием эритроцитов в качестве клеток-переносчиков

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», 664003, г.Иркутск, ул. Борцов Революции, д. 1

Эритроциты являются перспективными переносчиками широкого круга лекарственных препаратов и других биологически активных агентов. Основная особенность и преимущества эритроцитов в качестве транспортной формы лекарства — их абсолютная биосовместимость и способность к длительной циркуляции в организме. По мере старения эти клетки подвергаются в организме естественному процессу биодеградации. Относительно инертная внутриклеточная среда защищает поставляемый препарат от инактивации различными эндогенными факторами. В настоящее время используются разнообразные методы загрузки лекарственных препаратов в эритроциты: электропорация; индуцированный эндоцитоз; осмотический пульсовый метод гемолиза; гипотонический гемолиз. Большинство из этих методов основывается на способности этих клеток обратимо деформировать свою поверхность без изменения ее площади. Включение лекарственных средств в эритроциты может осуществляться и естественным путем вследствие их сорбции на клеточной мембране. В роли объекта для направленного транспорта используются различные лекарственные препараты: антибиотики, противоопухолевые препараты, кортикостероиды, пептиды, ферменты и многие другие. Экстракорпоральная фармакотерапия с использованием эритроцитов в качестве клеток-переносчиков находит применение в лечении самых разных заболеваний. Спектр применяемых препаратов и предоставляемых возможностей достаточно широк уже сегодня, и дальнейшее развитие этого направления имеет большие перспективы. Цель обзора — дать общее представление о потенциале эритроцитов как универсальных средствах транспорта лекарственных средств для терапии различных патологических состояний.

Ключевые слова: эритроциты; лекарственные средства; направленный транспорт

Для корреспонденции: Дмитриева Людмила Аркадьевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. патофизиологии функциональных систем научно-лабораторного отдела ИНЦХТ, e-mail: scrrs.irk@gmail.com

Для цитирования: Дмитриева Л.А., Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С. Современное состояние проблемы доставки лекарственных веществ с использованием эритроцитов в качестве клеток-переносчиков. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(3): 88—94.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.01.15

Dmitrieva L.A., Pivovarov Yu.I., Kurilskaya T.E., Sergeeva A.S.

Modern state of problem of delivery of medicines with use of erythrocytes as cell-carriers

Federal State Budgetary Scientific Institution «Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology»

Erythrocytes are prospective carriers of wide range of medicines and other biologically active agents. Main peculiarity and advantage of erythrocytes as carriers of medicines is their absolute bio-compatibility and ability for long circulation in an organism. While growing old these cells undergo natural process of biodegradation. Relatively inactive endocellular environment protects carried medicine from being inactivated by different endogenous factors. At the present time different methods of loading medicines in erythrocytes are used: electroporation, induced endocytosis, osmotic pulse hemolysis, hypotonic hemolysis. Most of these methods are based on the ability of these cells for reversible deformation of the surface without changing area of surface. Introduction of medicines in erythrocytes can be conducted in natural way as a result of their sorption on cell membrane. Different medicines can be used as the objects for targeted transport: antibiotics, antineoplastic drugs, corticosteroids, peptides etc. extracorporeal pharmacotherapy with use of erythrocytes as carriers can be applied in the treatment of different diseases. Range of used medicines and provided possibilities is quite wide at a present time, but further development of this direction is very prospective. The aim of the authors was to outline a common concept of the potential of erythrocytes as universal transportation means of medicines for therapy of different pathological conditions.

Keywords: erythrocytes; medicines, targeted transport

For citation: Dmitrieva L.A., Pivovarov Yu.I., Kuril'skaya T.E., Sergeeva A.S. Modern state of problem of delivery of medicines with use of erythrocytes as cell-carriers. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (3): 88—94. (in Russ).

For correspondence: *Dmitriyeva Ludmila Arkadjevna*, candidate of medical sciences, senior scientific worker of the laboratory of pathophysiology of functional systems at scientific-laboratory department of ISCST, e-mail: scrs.irk@gmail.com

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 23.01.15

Важной составляющей успеха любой новой терапии является возможность доставки определенных молекул в клетки- и органы-мишени. Идея селективного воздействия биологически активных веществ возникла давно, но приблизиться к ее разрешению удалось лишь в современный период развития медицинской науки благодаря разработке и внедрению в клиническую практику методов направленного транспорта (НТ). НТ представляет собой способ избирательной доставки биологически активных соединений, в том числе и лекарственных средств (ЛС) к точке приложения эффекта, т.е. в охваченную патологическим процессом зону, что позволяет обеспечить максимальную концентрацию вещества в органе-мишени без значительного повышения концентрации в других органах и тканях.

Направленный транспорт может быть основан на регионарном введении ЛС, использовании различных носителей или векторов, обладающих тропностью к определенным тканям и клеткам, микроконтейнеров, в качестве которых выступают липосомы, капсулы из человеческого альбумина, а также использовании систем доставки ЛС с применением микро- и наночастиц [1—3].

Переносчики ЛС должны удовлетворять всем требованиям, которые предъявляются к любым веществам, вводимым в организм. Они должны быть нетоксичны, не иметь, или иметь минимальные побочные эффекты, быть доступными для биodeградации. Наиболее широкое распространение получили методы, связанные с использованием аутоклеток крови для модификации их свойств с целью создания внутриклеточного депо лекарственного препарата и осуществления НТ. Обработанные таким образом клетки получили название фармакоциты. В качестве фармакоцитов используют тромбоциты, лейкоциты, стволовые клетки, эритроциты [4]. Несомненными достоинствами эритроцитов являются их идеальная биосовместимость и способность к длительной циркуляции в организме. Они легко могут быть выделены из крови, где присутствуют в больших количествах. По мере старения эти клетки подвергаются в организме ес-

тественному процессу биodeградации. Относительно инертная внутриклеточная среда защищает поставляемый препарат от инактивации различными эндогенными факторами [5—7]. Существенно и то, что использование в качестве переносчиков аутологичных эритроцитов сводит к минимуму риск инфицирования пациента. Все это делает задачу разработки новых лекарственных форм на основе эритроцитов-носителей перспективной и актуальной.

Первой попыткой в реализации направленного транспорта ЛС с помощью эритроцитов было введение АТФ в так называемые эритроцитарные тени, получаемые с помощью гипотонического гемолиза [8]. Несколько позднее появились сообщения об успешном заключении внутрь эритроцитов декстранов с молекулярной массой 10—250 кДа [9]. Спустя 15 лет эритроциты были использованы в качестве носителей терапевтических препаратов уже для непосредственной доставки к органам-мишеням [10].

В настоящее время используются разнообразные методы загрузки лекарственных препаратов в эритроциты [11—13]. Большинство из этих методов основывается на способности этих клеток обратимо деформировать свою поверхность без изменения ее площади. Степень деформируемости эритроцитов связана с эластичностью мембранного цитоскелета, вязкостью цитоплазмы клетки и соотношением объема и площади поверхности [14]. Благодаря этому свойству эритроциты могут увеличивать свой объем вплоть до образования в клеточной мембране микроразрывов с размерами, позволяющими макромолекулам проникать внутрь клетки [15]. К основным методам, реализующим это свойство эритроцитарной мембраны, относятся: электропорация; индуцированный эндоцитоз; осмотический пульсовый метод гемолиза; гипотонический гемолиз.

Метод электропорации заключается в том, что клетки, помещенные в изотонический раствор, подвергаются импульсивному воздействию электрического поля высокой напряженности [11]. При этом в билипидном слое мембраны клетки возникают множественные электрические пробой, приводящие к образо-

ванию небольших пор и увеличению ее проницаемости, в результате чего вещество, находящееся в растворе начинает диффундировать внутрь клетки. При достижении равновесного состояния концентрации ЛС в инкубационной среде и внутри клетки осуществляют спонтанное закрытие пор в осмотически сбалансированной среде при 37°C. Остатки содержащегося в растворе препарата удаляют путем многократного отмывания клеток. Конечным результатом данного метода загрузки ЛС в эритроциты является их осмотический лизис, вследствие нарушения активного транспорта ионов.

Эндоцитоз — это везикулярный захват жидкостей, макромолекул или небольших частиц в клетку. Зрелые эритроциты, как правило не способны к эндоцитозу, поскольку их мембрана теряет способность к слиянию. В то же время мембранное слияние у эритроцитов можно осуществить искусственно, если обработать эритроциты мембранотропными препаратами. Подобный феномен могут вызывать несколько классов ЛС, среди которых наиболее исследован противомаларийный препарат примахин-фосфат и родственные ему 8-аминохинолоны. Загруженные примахином эритроциты приобретают сферическую форму и имеют повышенную осмотическую хрупкость и низкую устойчивость к турбулентному шоку по сравнению с нормальными клетками [16]. Обработка глутаральдегидом стабилизирует клетки, которые становятся устойчивыми к осмотическому и турбулентному шоку. *In vitro* было показано, что выделение препарата из клеток замедлялось при обработке загруженных эритроцитов глутаральдегидом. Проведенные исследования показали потенциал нагруженных примахином эритроцитов в сочетании с введением глутаральдегида, как системы доставки для профилактики и радикальной терапии малярии. Помимо примахина подобным свойством обладают винбластин, хлорпромазин и другие катионные феноксиазины, гидрокортизон, пропанол, витамин А. Такой фармакологически стимулированный эндоцитоз может использоваться для направленного введения внутрь клетки даже таких больших молекул, как ДНК.

Осмотический пульсовый метод был активно использован в клинических исследованиях группой авторов, которые поставили задачу получить эритроциты с низким сродством к кислороду [17, 18]. Для этого необходимо было включить в цитоплазму эритроцитов инозитолгексафосфат, который связывается с дезоксигемоглобином. При этом снижается сродство гемоглобина к кислороду, что, в свою очередь, приводит к его высвобождению из эритроцитов. В осмотическом пульсовом методе гемолиза клетки подвергаются короткому, но интенсивному осмотическому стрессу. Для создания временного трансмемб-

ранного осмотического градиента, позволяющего молекулам входить внутрь клетки, чаще всего используют диметилсульфоксид (ДМСО) [19]. Процедура включения вещества в клетки проводится в несколько этапов. На первом этапе эритроциты инкубируют в растворе ДМСО для достижения высоких значений осмотического давления внутри- и внеклеточной жидкости. На втором этапе суспензию клеток смешивают с изотоническим раствором, содержащим вещество, которое необходимо включить в клетки, в результате чего концентрация ДМСО во внеклеточной среде резко снижается и в системе создается временный градиент его концентрации. Под действием градиента концентрации происходит нагнетание воды из внеклеточного пространства внутрь клеток и их набухание, что приводит к временному образованию пор в клеточной мембране и увеличению ее проницаемости. На следующем этапе происходит переход вещества в клетки и частичный выход из них ДМСО, осмотическое давление внутри клеток падает, поры закрываются, вводимое вещество «запечатывается» внутри клеток. Этот механизм во многом обусловлен тем, что транспорт молекул ДМСО из клетки во внеклеточную среду идет медленнее, чем вход воды внутрь клетки. На последнем этапе, когда поток молекул ДМСО из клеток восстановит осмотический баланс, клетки возвращаются к своей исходной форме.

Достаточно высокий процент включения ЛС в эритроциты достигается с помощью гипотонического гемолиза клеток с последующим их «запечатыванием» после введения вещества. Существует несколько таких методов, основанных на одних и тех же физико-химических свойствах эритроцитов: метод разведения; метод ступенчатого гемолиза с предварительной сферуляцией клеток; диализный метод; метод Маньяни; диализно-концентрационный метод [11—13]. Суть их состоит в следующем. При помещении эритроцитов в гипотонический раствор происходит увеличение их объема до 50—75% от нормы, при этом площадь поверхности клеток остается постоянной. Эритроциты изменяют свою форму, превращаясь из нормального двояковогнутого дискоцита в сфероцит. Если далее снизить тоничность раствора путем разбавления, мембрана эритроцита разрываться с образованием больших пор. В фазе гипотонического гемолиза вещества, подлежащие включению в эритроциты из раствора поступают внутрь клеток. В следующей фазе при повышении тоничности раствора мембрана эритроцитов восстанавливает свою целостность, клетка «запечатывается», приобретая нормальную двояковогнутую форму. Все эти методы имеют свои преимущества и недостатки. Например, метод разбавления требует значительного расхода

препарата, включаемого в эритроциты, а метод ступенчатого гемолиза не обеспечивает включения достаточного количества вещества в эритроциты. Диализный метод лишен этих недостатков, но имеет некоторые свои особенности: использование эритроцитарной массы с высоким уровнем гематокрита (70%); продолжительность диализа зависит от осмотического давления диализного буферного раствора; соблюдение точного значения осмотического давления эритроцитов (~120 мОсм) после этапа гемолиза для достижения достаточного включения вещества и высокого выхода жизнеспособных «запечатанных» эритроцитов.

Метод Маньяни был разработан для получения небольшого количества «запечатанных» эритроцитов [20]. Метод включает три основные стадии: гипотонический гемолиз очищенных эритроцитов путем диализа суспензии клеток; изотоническое запечатывание клеток с «запечатывающим» раствором (аденин, инозин, глюкоза, пируват натрия); восстановление структуры и функций эритроцитов путем инкубации при 37°C в течение 30 мин. В лаборатории физической биохимии ГНЦ РАМН метод Маньяни нашел свое развитие и получил название диализно-концентрационный [11]. Используя все преимущества метода Маньяни в новом варианте удалось избежать и присущие ему недостатки, главные из которых: высокий расход предназначенного к «запечатыванию» препарата, а также заметное повреждение эритроцитов в ходе длительных и травматичных для клеток процедур. Выход «запечатанных» эритроцитов с использованием данного метода составляет 30—45%.

Описанные технологии позволяют вводить в эритроциты препараты различной природы с разной молекулярной массой. При этом, в небольшие объемы эритроцитов может быть загружено несколько терапевтических доз препарата и как показали фармакокинетические исследования, время жизни таких нагруженных эритроцитов после введения их в кровоток составляет 3—4 недели [21].

Следует отметить, что широкое внедрение существующих методов ограничено в связи с отсутствием специальной аппаратуры для введения препаратов в эритроциты, хотя разработки автоматизированных систем загрузки ЛС в клетки ведутся как в России, так и за рубежом.

Включение ЛС в выделенные из организма клетки крови может осуществляться и естественным образом вследствие сорбции на клеточной мембране или проникать внутрь клетки по обычным транспортным механизмам путем индукции этого процесса соответствующими препаратами. Имеющиеся в литературе данные позволяют заключить, что эритроциты способны сорбировать и концентрировать на своей по-

верхности различные биологически-активные молекулы и обеспечивать их доставку в клетки и органы-мишени. Поэтому для некоторых препаратов перспективным методом является метод прямой инкубации эритроцитов в среде, содержащей данный препарат. На примере антрациклиновых антибиотиков было показано, что эритроциты при инкубации в растворе рубомицина и доксорубицина могут связывать антибиотик непосредственно из инкубационной среды [22, 23]. В ряде исследований показана способность эритроцитов сорбировать инсулин, глюкокортикоидные гормоны, биорегуляторные пептиды тимуса [24, 25]. Установлены наличие и характер влияния эритроцитов, несущих молекулы этих веществ, на иммунный ответ.

В роли объекта для направленного транспорта могут выступать различные лекарственные препараты. Эритроциты были успешно использованы в качестве носителей анти-ВИЧ пептидов, антисмысловых олигонуклеотидов, противоопухолевых препаратов, эритропоэтина, интерлейкина 3, системных кортикостероидов, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), ферментов и многих других [26—28].

Большое количество исследований посвящено направленному транспорту антибактериальных препаратов [23, 29, 30]. Первые сообщения об успешном применении эритроцитов в качестве контейнеров для гентамицина появились в 1986 г., а для метранидазола — в 1992 г. [31, 32]. В нашей стране разработкой методик направленного транспорта антибиотиков занимались многие исследователи. При проведении экспериментальных исследований [29] был оценен показатель включения антибиотиков в тени эритроцитов при гипоосмотическом лизисе. Авторы показали, что наибольшим включением в эритроцитарные тени характеризовались антибиотики из группы аминогликозидов (канамицин, гентамицин). При изучении фармакокинетики, заключенного в эритроцитарные тени канамицина у животных с экспериментальным холеститом по сравнению с традиционным способом введения была показана высокая эффективность антибактериальной терапии. Полученные результаты позволили обосновать применение метода направленного транспорта канамицина в тени эритроцитов для лечения гнойно-воспалительных заболеваний желчных путей.

В работах по изучению направленного транспорта эритромицина и цефтриаксона при тяжелой внегоспитальной пневмонии показано [33], что эритроциты, будучи измененными в процессе экстракорпоральной обработки антибиотиками, секвестрируются в капиллярах малого круга кровообращения, что обеспечивает повышение концентрации препарата, ассоциирован-

ного с клетками, в легочной ткани. Направленный транспорт антибактериальных препаратов у больных с тяжелой пневмонией ускоряет восстановление оксигенирующей функции легких, способствует более полноценной коррекции кислотно-основного состояния, уменьшает продолжительность клинических проявлений заболевания. Кроме того определены оптимальные параметры среды инкубации, способствующие наиболее эффективному экстракорпоральному насыщению аутоэритроцитов антибиотиками.

Во многих экспериментальных исследованиях изучена терапевтическая эффективность эритроцитов-переносчиков противоопухолевых антибиотиков. Так, использование нагруженных антрациклиновыми антибиотиками эритроцитов показало их высокую противоопухолевую активность на мышинных моделях опухолей [34]. А результаты, полученные при исследовании степени повреждения клеток, позволили сделать вывод, что эритроциты, нагруженные антрациклиновыми антибиотиками в терапевтических концентрациях по биохимическим и физиологическим параметрам близки к нативным [35]. Была изучена фармакокинетика новой лекарственной формы с использованием эритроцитов, нагруженных противоопухолевыми антибиотиками у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями [36]. Показано, что терапевтическая эффективность новой формы не уступает стандартной форме лекарства при одинаковой дозе, при этом сильно уменьшается токсическое воздействие препаратов. Введение антибиотиков подобным образом изменяет фармакокинетику ЛС, удлиняя медленную фазу их выведения. Это обеспечивает значительное пролонгирование циркуляции лекарства в крови.

При клинических исследованиях пациентам с острым лимфобластным лейкозом вводили эритроциты, инкапсулирующие L-аспарагиназу (L-ASNase). L-ASNase-загруженные эритроциты были обнаружены в сосудистых сетях на 24-й день после первой инъекции. Исследователи сообщили о сокращении количества и тяжести аллергических реакций у пациентов, получавших L-ASNase-загруженные эритроциты по сравнению с неинкапсулированной формой L-ASNase [37].

Направленный транспорт фосфоглива — гепатопротектора растительного происхождения с противовирусной активностью успешно применен с целью коррекции печеночно-клеточной недостаточности у пациентов с билиарным панкреатитом и хроническим гепатитом [38, 39]. Включение препарата в аутологичные эритроциты осуществляли методом гипотонического лизиса. Установлено, что применение НТ фосфоглива сопровождается более быстрой, чем у больных контрольной группы нормализацией показателей ин-

токсикации и цитолиза, что связано с восстановлением детоксицирующей функции печени за счет стабилизации мембран гепатоцитов и улучшения их метаболизма.

Пациентам с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и муковисцидозом вводили инкапсулированный в эритроцитах дексаметазон-21-фосфат (Dex-21-P) [40]. Dex-21-P медленно дефосфорилируется в эритроцитах с выделением в процессе циркуляции дексаметазона. Фармакокинетические анализы показали, что одиночное введение эритроцитов, нагруженных Dex-21-P (2—4 мг) достаточно для поддержания в крови обнаруживаемой концентрации дексаметазона в течение 7 сут. У пациентов с муковисцидозом фармакокинетические анализы были выполнены для более длительного периода времени и выявили обнаруживаемую концентрацию дексаметазона (0,02—0,05 спустя месяц после инфузии).

Эритроциты, несущие препарат могут быть модифицированы для связывания аутологичных иммуноглобулинов и депозиции С3b компонента компонента, при этом, они становятся селективно узнаваемыми тканевыми макрофагами и в процессе фагоцитоза таких опсонизированных эритроцитов вещество высвобождается [31]. Протестирована доставка аналогов нуклеотидов, пептидов, олигонуклеотидов. Аналоги нуклеотидов — потенциально противовирусные агенты. Эти молекулы фосфорилируются внутри макрофагов вирусными или макрофагальными ферментами. К сожалению, данные ферменты обычно недостаточно эффективны, чтобы обеспечить должную защиту, поэтому доставка аналогов нуклеозидов в фосфорилированной форме дает лучший результат, что было доказано *in vitro* и *in vivo* [41]. Получен интересный результат доставки с помощью эритроцитов аналога убиквитина. Данный пептид стабилен внутри эритроцитов и эффективно конкурирует с убиквитином в макрофагах. Наконец был исследован метод доставки олигонуклеотидов. Использован аналог РНА (пептидная нуклеиновая кислота) с эффективностью более 30%. Процент ингибирования выбранного макрофагального гена (iNOs) составил 30—40% как *in vivo*, так и *in vitro*.

В принципе, любой препарат, включая пептиды, нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды и т.д. может быть инкапсулирован в эритроциты, однако для ряда молекул была показана возможность быстрой диффузии через клеточную мембрану эритроцита, другие же молекулы могут быть токсичны для самих эритроцитов [13]. Важно отметить, что эритроциты — «активные» переносчики, содержащие ферменты, которые превращают препарат в действующий агент. Данное свойство позволяет разрабатывать неактивные

лекарственные формы с заряженными группами, что даст возможность избежать быстрой диффузии или токсичности. Как только такие заряженные группы будут гидролизрованы эритроцитарными ферментами, препарат может диффундировать в кровяное русло или в требуемую целевую область.

В настоящее время существуют и продолжают разрабатываться различные способы модификации мембраны эритроцитов, например обработка эритроцитов химическими соединениями (глутаральдегид), использование биосовместимых полиэлектролитных эритроцитарных носителей, позволяющих регулировать профиль высвобождения инкапсулированной макромолекулы [12]. Предложен метод модификации мембран эритроцитов для направленного транспорта ЛС с помощью ультрафиолетового облучения (УФО) [15]. Показано, что УФО эритроцитов, находящихся в физиологическом растворе, содержащем гепарин, приводит к депонированию последнего внутри клеток. При этом происходит незначительное изменение их гемореологических свойств — увеличение степени их агрегации, повышение ригидности и дисферической трансформации.

Таким образом, резюмируя изложенный материал, можно утверждать, что эритроциты являются потенциальными биосовместимыми векторами для различных биоактивных веществ, в том числе и лекарственных препаратов. В настоящее время существуют различные методы, позволяющие инкапсулировать препараты в эритроциты с соответствующим выходом. Эритроциты, нагруженные ЛС, позволяют достичь разной скорости высвобождения. Кроме того, инкапсуляция в эритроцитах существенно изменяет фармакокинетические свойства препаратов. Экстракорпоральная фармакотерапия с использованием эритроцитов находит применение в лечении самых различных заболеваний. Спектр применяемых препаратов и предоставляемых возможностей достаточно широк уже сегодня, но и дальнейшее развитие этого направления имеет большие перспективы.

References

1. Postnov V.N., Naumysheva E.B., Korolyov D.V., Galagudza M.M. Nanosized pathogens for delivery of medicines. *Biotechnosfera*. 2013; 6(30): 16-27. (in Russian)
2. Caruthers S.D., Wickline S.A., Lanza G.M. Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007; 18(1): 26-30.
3. Dutta R.C. Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress. *Curr. Pharm. Des.* 2007; 13(7): 761-69.
4. Karpushina I.A., Stebleva T.F., Bonitenko E.Yu. Use of methods of targeted transport of medicines in clinical practice (review of literature). *Biomeditsinskiy Zhurn.* 2004; 5: 404-8. (in Russian)
5. Gothoskar A.V., Hamidi M., Tajerzadeh H. Resealed erythrocytes: a revive. *J. Pharm. Technol.* 2004; 3: 140-58.
6. Hamidi M., Zarrin A., Foroozesh M., Mohammadi-Samani S. Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceutical. *J. Control Release.* 2007; 118(2): 145-60.
7. Pierige F., Serafini S., Rossi L., Magnani M. Cell — based drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(2): 286-92.
8. Gardos G. Akkumulation de kalium onch durch menschliche Blufkorperchen. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 1953; 6: 191-6.
9. Marsden N.V.B., Ostling S.G. Akkumulation of dextran in human red blood cells after hemolysis. *Nature.* 1959; 184: 723-4.
10. Iher G.M., Glew R.M., Schnure F.M. Enzyme loading of erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973; 70: 2663-6.
11. Sarbash V.I., Tikhonova A.G., Vuymo T.A., Derbov A.L. Erythrocytes — the carriers of medicines. *Ros. Khim. Zhurn.* 2007; 51(1): 143-9. (in Russian)
12. Luo R., Mutukumaraswamy S., Venkatraman S.S., Neu B. Engineering of erythrocyte — based drug carriers: control of protein release and bioactivity. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012; 23(1): 63-71.
13. Magnani M., Pierige F., Rossi L. Erythrocytes as a novel delivery vehicle for biologics: from enzymes to nucleic acid-based therapeutics. *Ther. Deliv.* 2012; 3(3): 405-411.
14. Muravyov A.V., Mikhaylova A.G., Tikhomirova I.A. Role on endocellular signal systems in the change of microheological properties of erythrocytes. *Biologich. Membrany: Zhurn. Membrannoy I Kletochnoy biologii.* 2014; 31(9): 270-6. (in Russian)
15. Levin G.Ya., Sosnina L.N. Research of rheological properties of erythrocytes modified for targeted transport of medicines. *Fyndamental. Issledovaniya.* 2013; 2: 105-9. (in Russian)
16. Talwar N.P., Jain N.K. Erythrocytes as carriers of metronidazole: In-vitro characterization. *J. Drug Dev. Industr. Pharm.* 1992; 18: 1799-812.
17. Franco R.S., Barker R., Novick S., Weiner M., Martelo O.J. Effect of inositol hexaphosphate on the transient behavior of red cells a DMC0-induced osmotic pulse. *J. Cell Physiol.* 1986; 129(2): 221-9.
18. Wise J.M., Franco R.S., Barker R., Yacko M.A., Butterfield D.A. Membrane processes associated with the osmotic pulse incorporation of inositol hexaphosphate. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1022(1): 87-92.
19. Franco R.S., Weiner M., Wagner K., Martelo O.J. Preparation of low-affinity red cells with dimethylsulfoxide — mediated inositol hexaphosphate incorporation: hemoglobin and ATP recovery using a continuous-flow method. *Am. J. Hematol.* 1984; 17(4): 393-400.
20. Magnani M., Rossi L., Bianchi M., Fornani G., Benatti U., Guida L. et. al. Improved metabolic properties of hexokinase-overloaded human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1988; 972(1): 1-8.
21. Magnani M., Rossi L. Approaches to erythrocyte-mediated drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014; 11 (5): 677-87.
22. Ataulakhanov F.I., Kulikova E.V., Vitvitsky V.M. Reversible binding of anthracycline antibiotics to erythrocytes treated with glutaraldehyde. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1996; 24(Pt 3): 241-4.
23. Tonetti M., Astroff B., Satterfield W., De Flora A., Benatti U., DeLoach J.R. Construction and characterization of ad-

riamycin-loaded canine red blood cells as a potential slow delivery system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1990; 12(6): 621-9.

24. Dmitrieva L.A., Kirdey E.G. Character and conditions of sorption of biologically active substances of erythrocytes. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. (Irkutsk)*. 1995; 3: 23-5. (in Russian)

25. Kirdey E.G., Dmitrieva L.A. Role of erythrocytes in the regulation and realization of immune response. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. (Irkutsk)*. 1995; 3: 5-8. (in Russian)

26. Provotorov V.M., Ivanova G.A. Role and place of erythrocytes in the system of targeted transport of different pharmacological agents. *Klinicheskaya Meditsina*. 2009; 9: 4-8. (in Russian)

27. Hu C.M., Fang R.H., Zhang L. Erythrocyte — inspired delivery systems. *Adv. Healthc. Mater.* 2012; 5: 532-7.

28. Millan C.G., Marinero M.L., Castaneda A.Z., Lanao J.M. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J. Control Release*. 2004; 95(1): 27-49.

29. Zhumadilov Zh.Sh., Makarenkova R.V. Peculiarities of including of some antibiotics in erythrocytic shadows — system of focused delivery of chemotherapeutic preparations. *Antibiotiki i Khimioterapiya*. 1990; 11: 54-6. (in Russian)

30. Gutierrez M.C., Zarzuelo Castaneda A., Gonzales Lopez F., Sayalero Marinero M.L., Lanao J.M. Pharmacokinetics and biodistribution of amikacin encapsulated in carrier erythrocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 61(2): 375-81.

31. Eichler H.G., Gasic S., Bauer K., Korn A. In vivo clearance of antibody-sensitized human drug carrier erythrocytes. *J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1986; 40: 300-3.

32. Talwar N.P., Jain N.K. Erythrocytes as carriers of metronidazole: In-vitro characterization. *J. Drug Dev. Industr. Pharm.* 1992; 18: 1799-812.

33. Minaeva O.V. Optimization of method of targeted transport of erythromycin and ceftriaxone at grave community-acquired pneumonia: abstract of medical candidate's thesis. Saransk; 2008. (in Russian)

34. Pyataev N.A., Meltsaev G.G., Skopin P.I., Minaeva O.V., Шукин С.А. Targeted transport of antineoplastic chemotherapeutic agents: modern technologies and prospects of development. *Povolzhskiy Onkologicheskii vestnik*. 2012; 2: 60-71. (in Russian)

35. Skorokhod O.A. Garmaeva T.T., Vitvitsky V.M., Isaev V.G., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. et. al. Pharmacokinetics of erythrocyte-bound daunorubicin in patients with acute leukemia. *Med. Sci. Monit.* 2004; 10(4): 155-64.

36. Tikhonova A.G., Aleksandrovich Yu.G., Vuy-mo T.A., Sinauridze E.I., Ataulakhanov F.I. Erythrocytes — the carriers of anthracycline antibiotics. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2008; 7: 91-4. (in Russian)

37. Bahmani B., Bacon D., Anvari B. Erythrocyte-derived photo-theranostic agents: hybrid nano-vesicles containing indocyanine green for near infrared imaging and therapeutic applications. *Sci. Rep.* 2013; 3: 2180.

38. Belokonova O.N., Konoplya A.I., Pokrovskiy M.V., Gavrilyuk V.P., Dolgareva S.A. Disorders of albumen-lipid spectrum of erythrocytes membranes at the experimental acute drug-induced hepatopathy, correction with different forms of «Phosphoglyph» preparation. *Fundamentalnye Issledovaniya*. 2011; 11(3): 481-4. (in Russian)

39. Charyshkin A.L., Midlenko O.V., Midlenko V.I., Charyshkin A.L. Targeted transport of medicines in complex treatment of patients with gallstone pancreatitis in combination with HCV-infection. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2010; 6: 80-4. (in Russian)

40. Rossi L., Serafini S., Cenerini L., Picardi F., Bigi L., Panzani I. et. al. Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biotech. Appl. Biochem.* 2001; 33: 85-9.

41. Rossi L., Serafini S., Pierige F., Antonelli A., Cesari A., Fraternali A. et al. Erythrocyte-based drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2005; 2(2): 311-22.

Сведения об авторах:

Пивоваров Юрий Иванович, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. патофизиологии функциональных систем научно-лабораторного отдела ИНЦХТ

Курильская Татьяна Ефимовна, доктор мед. наук, зав. лаб. патофизиологии функциональных систем научно-лабораторного отдела ИНЦХТ

Сергеева Анна Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. патофизиологии функциональных систем научно-лабораторного отдела ИНЦХТ

© Коллектив авторов, 2016
УДК 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Сухоруков В.Н.¹, Камон Л.², Ломм М.², Карагодин В.П.^{1,3}, Чепмен Д.², Контуш А.², Орехов А.Н.^{1,3}

Модификация метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией для анализа липидома ЛПВП

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

² — «Национальный институт здоровья и медицинских исследований», подразделение 1166; «Университет Пьера и Марии Кюри», Париж, 6; Университетский госпиталь Питье-Сальпетриер, Госпитальный бульвар 83, 75651, Париж, Франция

³ — «НИИ атеросклероза» (Сколково), а/я №21, 121609, Москва, Россия

Цель. Цель исследования — создание универсальной методики для анализа липидома липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Так как фосфолипиды являются основными биоактивными липидами, входящими в состав ЛПВП, в ходе данного исследования был охарактеризован фосфосфинголипидом основных нормолипидемических подфракций ЛПВП. **Методика и ее модификация.** В статье приводятся основные методики, применяемые для анализа липидома, обосновывается выбор в пользу той или иной методики для использования в анализе липидома ЛПВП. На основе существующих методик анализа липидома была разработана оригинальная методика анализа липидома ЛПВП при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ионизацией в электро-спрее с тандемной масс-спектрометрией (LC-ESI/MS/MS). Эта методика использовалась для анализа 5 нормолипидемических субпопуляций ЛПВП. **Заключение.** Разработанная методика позволила выявить 162 индивидуальные липидные молекулы, принадлежащие к 9 подклассам липидов, включая 23 вида фосфатидилхолина, 22 вида сфингомиелина, 9 видов лизофосфатидилхолина, 25 видов фосфатидилэтаноламина, 17 видов фосфатидилинозитола, 11 видов фосфатидилглицерина, 24 вида церамида, 18 видов фосфатидилсерина и 13 видов фосфатидной кислоты, в 5 нормолипидемических подфракциях ЛПВП и измерить концентрации этих молекул.

Ключевые слова: ВЭЖХ; масс-спектрометрия; ЛПВП; липидом; сфинголипиды; фосфолипиды

Для корреспонденции: Сухоруков Василий Николаевич, мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии, e-mail: vnsukhorukov@gmail.com

Для цитирования: Сухоруков В.Н., Камон Л., Ломм М., Карагодин В.П., Чепмен Д., Контуш А., Орехов А.Н. Модификация метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией для анализа липидома ЛПВП. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 95–100.

Финансирование. Работа проведена при финансовой поддержке Национального института здоровья и медицинских исследований (INSERM, Франция) и CODDIM Ile-de-France (Париж, Франция) с участием Минобрнауки России (проект RFMEFI61614X0010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.07.15

Sukhorukov V.N.¹, Camont L.², Lhomme M.², Karagodin V.P.¹,
Chapman M.J.², Kontush A.², Orekhov A.N.^{1,3}

Novel liquid chromatography-mass spectrometry method to analyze hdl lipidome

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, 8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia

² — INSERM UMR 1166 ICAN, University of Pierre and Marie Curie — Paris 6, Pitie-Salpetriere University Hospital, 75651 Paris Cedex 13, Bd de l'Hopital 83

³ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, PO Box #21, 121609, Moscow, Russia

Subject. High-density lipoprotein (HDL) is highly heterogeneous in function, structure, and composition. Components of HDL can be assayed using various techniques, including LC/MS approaches. The purpose of this study was to develop a novel method for the analysis of the HDL lipidome. Since phospholipids represent a major bioactive lipid component of HDL, the phosphosphingolipidome of major normolipidemic HDL subpopulations was characterized in this study. **Methods and Results.** The article describes the methodology used for the analysis of the HDL lipidome. Based on existing methods of lipidomic analysis, an original method of analyzing lipidome of HDL by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS) was developed. This technique was used to analyze the lipidome of five normolipidemic HDL subpopulations. **Conclusions.** The developed method allowed to identify and quantify 162 indi-

vidual molecular lipid species in five normolipidemic HDL subpopulations across nine lipid subclasses, including 23 phosphatidylcholine, 22 sphingomyelin, 9 lysophosphatidylcholine, 25 phosphatidylethanolamine, 17 phosphatidylinositol, 11 phosphatidylglycerol, 24 ceramide, 18 phosphatidylserine, and 13 phosphatidic acid species.

Keywords: HPLC; mass spectrometry; HDL; lipidome; sphingolipids; phospholipids

For correspondence: Sukhorukov V.N., Junior Researcher work Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, 8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russian Federation, e-mail: vnsukhorukov@gmail.com.

For citation: Sukhorukov V.N., Camont L., Lhomme M., Karagodin V.P., Chapman M.J., Kontush A., Orekhov A.N. Novel liquid chromatography-mass spectrometry method to analyze hdl lipidome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 95–100. (in Russ).

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

Funding. These studies were financially supported by INSERM (France) and CODDIM Ile-de-France (Paris, France), with a participation of the Ministry of Education of Russia (project RFMEFI61614X0010).

Information about authors:

Sukhorukov V.N., <http://orcid.org/0000-0002-0312-3773>

Karagodin V.P., <http://orcid.org/0000-0003-0501-8499>

Orekhov A.N., <http://orcid.org/0000-0002-6495-1628>

Received 31.07.15

Список сокращений:

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
 МС — масс-спектрометрия
 LC-ESI/MS/MS — ВЭЖХ с ионизацией в электроспрее с тандемной масс-спектрометрией
 ESI — электроспрей
 ЛПВП — липопротеиды высокой плотности
 ФЛ — фосфолипиды
 ФХ — фосфатидилхолин

ЛФХ — лизофосфатидилхолин
 ФЭ — фосфатидилэтанолламин
 ФИ — фосфатидилинозитол
 ФГ — фосфатидилглицерин
 ФС — фосфатидилсерин
 ФК — фосфатидная кислота
 СЛ — сфинголипиды
 СМ — сфингомиелин
 Цер — церамиды

Введение

Методика анализа липидома липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) состоит из двух основных этапов: этап разделения исследуемых молекул и этап детектирования этих молекул. Говоря об этапе разделения, нужно отметить, что в последние годы эталоном в изучении липидов стала методика высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). У этой методики есть две разновидности: обращенно-фазовая и нормально-фазовая хроматография. Обращенно-фазовая хроматография используется для разделения, основанного на разности в гидрофобности исследуемых молекул, тогда как нормально-фазовая хроматография применяется для разделения веществ в основном по разности их полярных компонентов [1–4].

Этап детектирования заключается в масс-спектрометрическом анализе. При помощи метода масс-спектрометрии (МС) липиды изучаются уже по меньшей мере в течение пятидесяти лет. Совместно с МС применяется множество методов ионизации: матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

(MALDI) [5], электроспрей (ESI) [6], а также химическая ионизация при атмосферном давлении — АРСИ (и ее подвид с дополнительной фотоионизацией — АРПИ) [7]. В качестве масс-анализаторов применяются магнитный и электростатический секторный [1], квадрупольный [7] и времяпролетный [1] приборы, а также масс-анализаторы ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием [8] и ионная ловушка [6]. Метод масс-спектрометрии — самый подходящий метод для анализа липидома, так как он обеспечивает:

- 1) высокий уровень специфичности определения сложных веществ посредством их молекулярной массы, особенно с использованием тандемной МС (МС/МС);
- 2) уровень чувствительности, который на порядки выше, чем у других методик, таким образом вещества могут быть обнаружены, даже если их количество составляет несколько фмоль;
- 3) сигнальный ответ, который может коррелировать с концентрацией анализируемого вещества при условии наличия надлежащим образом подобранных внутренних

стандартов для нормализации различий в ионизации и фрагментации отдельных видов молекул [1].

На сегодняшний день самой подходящей для анализа липидома комбинацией является методика ВЭЖХ с ионизацией в электроспрее, в комбинации с тандемной масс-спектрометрией (LC-ESI/MS/MS) [9-11]. При ионизации методом электроспрея жидкость (изучаемые соединения с растворителем) вырывается под давлением вместе с коаксиально подаваемым разогретым газом (азотом) с высокой скоростью из узкого капилляра или иглы, которая находится под повышенным потенциалом в 1-6 кВ, и прямо в этой струе мелкодисперсного тумана с электронных оболочек молекул срываются электроны, превращая молекулы в ионы. В зависимости от режима ионизации образуются положительные или отрицательные ионы, которые затем детектируются в масс-спектрометре [1]. ESI представляет собой метод мягкой ионизации (т.к. при этом образуются ионы с небольшой фрагментацией), и сигнальный ответ часто пропорционален концентрации анализируемого вещества, что практически идеально для количественного анализа. С электроспреем наиболее часто используются тандемные масс-спектрометры (MS/MS). Тандемный масс-спектрометр в общем случае представляет собой два объединенных масс-спектрометра; таким образом формирующиеся ионы из источника ионизации могут быть отобраны в первом масс-спектрометре, затем фрагментированы, и уже затем фрагменты этих ионов анализируются во втором масс-спектрометре. Фрагменты ионов предоставляют важную информацию о структуре и реакционной способности интактных молекулярных ионов, а также могут быть использованы в качестве опознавательного знака, который помогает идентифицировать нужные ионы интереса во втором масс-спектрометре, которые могут иметь такое же, или похожее, соотношение массы заряда, как и в первом масс-спектрометре.

Модификация методики

Для анализа липидома ЛПВП плазмы крови человека в подразделении 1166 Национального института здоровья и медицинских исследований (Париж, Франция) была разработана методика LC-ESI/MS/MS, которая позволяет одновременно анализировать более 160 липидных молекул. Эта методика была разработана путем модификации существующих методик LC-ESI/MS/MS с целью подбора условий для анализа фосфолипидов и сфинголипидов в одном эксперименте [1, 9, 10, 12, 13].

Целесообразность разработки данной методики заключается в том, что до ее появления не существовало подхода, позволяющего одновременно производить количественный анализ всех фосфо- и сфинголи-

пидных молекул, входящих в состав ЛПВП. Поэтому были подобраны такие условия для метода ESI-LC/MS/MS, которые позволили бы напрямую анализировать полностью все липидные молекулы, входящие в состав ЛПВП.

Материалы

В нашей работе, как и в исходных методиках, были использованы следующие липидные стандарты: 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (LPC 16:0), 1-стеароил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (LPC 18:0), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 14:0/14:0), 1-миристоил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 14:0/16:0), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/16:0), 1-пальмитоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/18:0), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/18:1), 1-пальмитоил-2-линолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/18:2), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/18:0), 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/18:1), 1-стеароил-2-линолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/18:2), 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/20:4), 1-пальмитоил-2-докозагексаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/22:6), 1-стеароил-2-докозагексаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/22:6), 1-стеароил-АПБ-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (LPE 18:0), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (PE 18:0/18:0), 1-гептадеканоил-2-9Z-тетрадеценил-sn-глицеро-3-фосфо-1'-мио-инозит (PI 17:0/14:1), N-стеароил-D-эритро-сфингозин (CerD 18:1/18:0), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфат (PA 18:0/18:0), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфо-1'-рац-глицерин (PG 18:0/18:0) и 1-пальмитоил-2-линолеил-sn-глицеро-3-фосфо-L-серин (PS 16:0/18:2) были куплены у AvantiPolarLipids (Alabaster, AL, USA). Применяемые стандарты соответствуют исследуемым веществам.

Градиентные растворители для ВЭЖХ/МС были получены от Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США) или VWR (WestChester, PA, USA) и использованы без дальнейшей очистки.

Подготовка проб

Пять подфракций ЛПВП были выделены из нормолипидемических образцов человеческой плазмы методом изопикнического ультрацентрифугирования в градиенте плотности [14]. Липиды были экстрагированы из субпопуляций ЛПВП согласно адаптированной методике, описанной Лариджани [15]. Для этого 30 мкг общей массы фосфолипидов, определенных при помощи коммерческого теста, были добавлены к 4 мл холодного CHCl_3 /подкисленного CH_3OH

(5:2 об/об), содержащего следующие стандарты: 4 мкг РСd9 32:0, 100 нгРІ 25:0, 80 нг РЕ 25:0, 80 нг РА 25:0, 40 нг PS 25:0, 20 нг РС 25:0 и 20 нг Сер 17:0. Негативный контроль (натрий-фосфатный буфер) и положительный контроль (ЛПВП2, полученные из нормолипидемической плазмы) были экстрагированы параллельно с каждой партией проб для обеспечения контроля качества; каждый образец был нормирован относительно отрицательного контроля. Был добавлен раствор К₄EDTA (200 мМ) (1:5 об/об), и смесь была перемешана на вортексе в течение 1 мин и центрифугирована при 3600g в течение 10 мин при 4°C. Органическая фаза была перенесена в 5 мл стеклянные пробирки и высушена в атмосфере азота. Липиды были восстановлены в 150 мкл смеси изопропанол/гексан/вода (вместо этилацетата использовали гексан) (10:5:2 об/об), перенесены в затемненные виалы со вставками, высушены в атмосфере азота и ресуспендированы в 40 мкл смеси изопропанол/гексан/вода (10:5:2 об/об). Липидные молекулы были проанализированы и количественно измерены с помощью ВЭЖХ/МС/МС.

Анализ

Семь основных подклассов фосфолипидов: фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ) фосфатидилэтанолламин (ФЭ), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидная кислота (ФК) и два основных подкласса сфинголипидов (СЛ) (сфингомиелин (СМ) и церамиды (Цер)), которые в совокупности содержат более 160 видов индивидуальных липидных молекул и отвечают за 95% всех ФЛ и СМ плазмы, анализировали с помощью метода ВЭЖХ тандемной масс-спектрометрии. Подклассы липидов подразделяются на основные (те, содержание которых больше 1% от общего числа ФЛ+СЛ, то есть ФХ, СМ, ЛФХ, ФЭ и ФИ) и миноритарные (те, содержание которых меньше 1% от общего числа ФЛ+СЛ, то есть, ФГ, Цер, ФС и ФК) [16].

Количественная оценка липидов была проведена при помощи метода жидкостной хроматографии с ионизацией распылением в электроспрее с масс-спектрометрическим анализом с использованием масс-спектрометра QTrap 4000 (AB Sciex, Framingham, MA, USA), оснащенного турбоисточником ионизации в электроспрее (работающего при 300°C), объединенного с системой ВЭЖХ LC20AD, автоматическим пробоотборником SIL-20AC (Shimadzu, Kyoto, Japan) и системой сбора данных Analyst 1.5 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). В методиках, взятых за основу, указано, что температуру источника ионов можно изменять в диапазоне от 300 до 500°C в зависимости от состава

растворителя и масс-спектрометра [9]. Для целей данного исследования после ряда пробных экспериментов температура 300°C оказалась наиболее подходящей для ионизации ионов. Ионизация в электроспрее была выбрана как самый подходящий способ ионизации липидов, так как при этом способе максимально минимизируется фрагментация исследуемого вещества при ионизации [1]. В соответствии с рекомендациями, приведенными в оригинальных статьях, был выбран способ ионизации для фосфолипидов и сфинголипидов [9, 17]. В итоге после оптимизации метода для всех ФЛ и СЛ была выбрана положительная ионизация, за исключением ФИ, для которого больше подходила отрицательная ионизация. Измерение ФЛ и СЛ осуществлялось в режиме положительно заряженных ионов, за исключением ФИ, который измеряли в режиме отрицательно заряженных ионов. В качестве способа ионизации был выбран электроспрей, или ионизация распылением в электрическом поле (ESI, англ. electrosprayionization) — метод, применяемый в масс-спектрометрии для получения ионов в газовой фазе из раствора [12].

В зависимости от природы биологического образца могут быть использованы различные условия хроматографического разделения СЛ и ФЛ. Так, в зависимости от наличия разного типа СЛ и ФЛ, могут быть использованы хроматографические колонки различной длины от 50 до 250 мм [9, 18]. Для разделения основных классов липидов (ФЛ и СЛ) достаточно использовать короткую колонку (50 мм). При хроматографическом разделении сфинголипидов и фосфолипидов используется как нормально-фазовая, так и обращенно-фазовая ВЭЖХ. Например, сфингоидные основания, 1-фосфаты сфингоидных оснований и церамид-1-фосфаты анализируются при помощи обращенно-фазовой хроматографии с использованием колонки Supelco 2.1 (i.d.) x 50 mm Discovery C18 (Sigma, St. Louis, MO) и бинарной системы растворителей при скорости потока 1 мл/мин. Если эта скорость потока не позволяет осуществить полную десольватацию (как правило, при зубчатом профиле элюции), скорость потока может быть уменьшена и/или скорость потока газового источника ионов может быть увеличена. Церамиды, сфингомиелин, моногексоцилцерамиды и дигексоцерамиды анализируются с использованием нормально-фазовой ВЭЖХ при помощи колонки Supelco 2.1 (i.d.) x 50 mm LC-NH₂ при скорости потока 1 мл/мин [9, 10]. Выбор колонки (обращенно-фазовая, нормально-фазовая) зависит от растворителей, используемых для экстракции образца. Так как для экстракции образцов в данной работе были использованы, в основном, полярные растворители (изопропанол, вода), то для ВЭЖХ использовалась колонка для обращенно-фа-

зовой хроматографии SymmetryShield RP8 3,5 мкм 2,1x50 мм (Waters Corporation, Milford, MA, USA). В методиках, описанных ранее, для ВЭЖХ использовали скорость потока от 0,02 мл/мин до 1 мл/мин [1, 11, 13]. На основе этих данных была проведена оптимизация скорости потока под задачи данной работы, наилучшего результата удалось добиться при скорости 0,1 мл/мин.

На практике для получения ESI масс-спектров используют такие полярные и относительно летучие растворители, как вода, метанол или ацетонитрил [19, 20]. Для усиления процесса образования протонированных частиц к растворам объекта анализа часто добавляют органические кислоты (например, муравьиную кислоту), соли аммония (ацетат или формиат) и гидроксид лития [21]. Эти растворители используются и как мобильная фаза в ВЭЖХ [19]. В данной работе наилучшие результаты давало использование метанола и воды, содержащих 5мМ формиат аммония и 0,1% муравьиную кислоту.

В настоящей методике хроматография проводится при следующих условиях: образец (4 мкл) вводят в колонку SymmetryShield RP8 3,5 мкм 2,1x50 мм с использованием градиента растворителей от 85:15 до 91:9 (об/об) метанол/вода, содержащего 5 мМ формиата аммония и 0,1% муравьиную кислоту при скорости потока в 0,1 мл/мин в течение 30 мин.

Масс-спектрометрия

Различные виды липидов выявлялись с использованием мониторинга нескольких реакций, отражающего фрагментацию полярной группы молекулы каждого класса липидов [17, 22, 23]. В методике, взятой за основу, сфинголипиды были проанализированы с помощью метода ВЭЖХ ESI-МС в режиме положительной ионизации с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра ABI 3000 для сложных сфинголипидов (церамиды, СМ и моногексозилцерамиды). Сфингоидные основания и 1-фосфат-сфингоидные основания были исследованы на масс-спектрометре MDS SCIEX 4000 Q Trap. Фосфолипиды анализировали при помощи масс-спектрометра AppliedBiosystems/MDS SCIEX 4000 QTRAP с ионной ловушкой (AppliedBiosystems, FosterCity, CA) [10]. В настоящей работе все виды липидных молекул анализировали на одном тройном квадрупольном масс-спектрометре с ионной ловушкой QTrap 4000 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). ФХ, ЛФХ и СМ выявлялись как ионы с соотношением массы к заряду (m/z) 184, ФЭ, ФС, ФГ и ФК как нейтральные потери с m/z 141, 185, 189 и 115 соответственно, а ФИ как ион с m/z -241. Определение этих молекул осуществлялось согласно стандартным методикам [17, 24]. Воздух использова-

ли в качестве газа для создания дисперсии образца, а N_2 как газ для создания ионов исследуемых веществ. ФЭ, ФС, ФГ, ФИ, ФК и Цер наблюдались по 18 мс; ФХ, ЛФХ и СМ наблюдались по 30 мс в разрешении 0,7 атомных единиц массы на половину высоты пика.

Определение концентраций

Липиды количественно определяли с использованием калибровочных кривых, созданных для каждого из девяти индивидуальных липидных классов, имеющих до 12 различных жирнокислотных остатков. 23 калибровочные кривые были созданы в неразбавленных, 10- и 100-кратно разбавленных матрицах для коррекции матрица-индуцированных ион-подавляющих эффектов. Липиды, которые показывали нелинейный ответ в неразбавленных экстрактах, были измерены в 10- или 100-кратно разбавленных образцах. Для компиляции данных из трех отдельных измерений был использован собственный скрипт для Excel (Microsoft Office 2010, Redmond, WA, USA). Коэффициенты вариации для анализируемых липидов, рассчитанные в одном образце ЛПВП, выделенном из пула нормолипидемической плазмы, были <10% для всех проанализированных подклассов липидов.

Заключение

Методики, взятые за основу данного исследования, позволяли статистически значимо оценивать лишь отдельные классы липидов, тогда как задача состояла в одновременной оценке всех видов липидных молекул. В результате проведенных модификаций методики, предназначенные для анализа разных классов липидных молекул, были объединены в один метод. В итоге данный метод позволил идентифицировать и измерить 162 разные липидные молекулы в 5 нормолипидемических подфракциях ЛПВП. Эти молекулы относятся ко всем 9 подклассам липидов, включая в себя 23 ФХ, 22 СМ, 9 ЛФХ, 25 ФЭ, 17 ФИ, 11 ФГ, 24 Цер, 18 ФС и 13 ФА. Разновидности ФХ были основными видами, составляя от 74% до 80% от общего количества ФЛ+СЛ, следующими по количеству были СМ (14—20%), ЛФХ (1,5—3,3%), ФИ (1,6—2,0%), ФЭ (1,4—2,1%), Цер (0,11—0,19%), ФС (0,03—0,63%), ФГ (0,011—0,015%) и ФА (0,010—0,025%) [3, 25].

Таким образом, настоящая модификация существующих методик позволила использовать для анализа состава ЛПВП не несколько подходов, а один, что существенно упрощает и ускоряет исследование липидома ЛПВП плазмы крови человека.

References

- Merrill A.H. Jr., Sullards M.C., Allegood J.C., Kelly S., Wang E. Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods*. 2005; 36(2): 207-24.
- Orekhov A.N., Mukhamedova N.M., Sviridiov D.D., Karagodin V.P., Melnichenko A.A., Myasoedova V.A. et al. Study of anti-inflammatory effect of high density lipoproteins. *Pathogenesis*. 2012; 10(2): 83-90. (In Russian)
- Camont L., Lhomme M., Rached F., Le Goff W., Negre-Salvayre A., Salvayre R. et al. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(12): 2715-23.
- Melnichenko A.A., Orekhova V.A., Sobenin I.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Development of novel cell models for the evaluation of cholesterol efflux. *Patogenez*. 2013; 11(4): 39-48. (In Russian)
- Hunnam V., Harvey D.J., Priestman D.A., Bateman R.H., Bordoli R.S., Tyldesley R. Ionization and fragmentation of neutral and acidic glycosphingolipids with a Q-TOF mass spectrometer fitted with a MALDI ion source. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001; 12(11): 1220-5.
- Houjou T., Yamatani K., Nakanishi H., Imagawa M., Shimizu T., Taguchi R. Rapid and selective identification of molecular species in phosphatidylcholine and sphingomyelin by conditional neutral loss scanning and MS3. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004; 18(24): 3123-30.
- Butovich I.A. Lipidomic analysis of human meibum using HPLC-MSn. *Methods Mol Biol*. 2009; 579: 221-46.
- Ishida M., Yamazaki T., Houjou T., Imagawa M., Harada A., Inoue K., Taguchi R. High-resolution analysis by nano-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the identification of molecular species of phospholipids and their oxidized metabolites. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004; 18(20): 2486-94.
- Shaner R.L., Allegood J.C., Park H., Wang E., Kelly S., Haynes C.A. et al. Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. *J Lipid Res*. 2009; 50(8):1692-707.
- Quehenberger O., Armando A.M., Brown A.H., Milne S.B., Myers D.S., Merrill A.H. et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*. 2010; 51(11): 3299-305.
- Bui H.H., Leohr J.K., Kuo M.S. Analysis of sphingolipids in extracted human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2012; 423(2): 187-94.
- Ivanova P.T., Milne S.B., Byrne M.O., Xiang Y., Brown H.A. Glycerophospholipid identification and quantitation by electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Enzymol*. 2007; 432: 21-57.
- Ogiso H., Suzuki T., Taguchi R. Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection of phosphatidic acid and phosphatidylserine. *Anal Biochem*. 2008; 375(1): 124-31.
- Chapman M.J., Goldstein S., Lagrange D., Laplaud P.M. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res*. 1981; 22(2): 339-58.
- Larijani B., Poccia D.L., Dickinson L.C. Phospholipid identification and quantification of membrane vesicle subfractions by 31P-1H two-dimensional nuclear magnetic resonance. *Lipids*. 2000; 35(11): 1289-97.
- 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.
- Nakanishi H., Ogiso H., Taguchi R. Qualitative and quantitative analyses of phospholipids by LC-MS for lipidomics. *Methods Mol Biol*. 2009; 579: 287-313.
- Temchenko A.V., Nikiforov N.G., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Karagodin V.P., Sobenin I.A. et al. Achievements in therapy of atherosclerosis. *Pathogenesis*. 2013; 11(2): 11-8.
- Xia Y.Q., Jemal M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009; 23(14): 2125-38.
- 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.
- Henderson M.A., McIndoe J.S. Ionic liquids enable electrospray ionisation mass spectrometry in hexane. *Chem Commun (Camb)*. 2006; (27): 2872-4.
- Bielawski J., Pierce J.S., Snider J., Rembiesa B., Szulc Z.M., Bielawska A. Comprehensive quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2009; 579: 443-67.
- 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)
- Pulfer M., Murphy R.C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev*. 2003; 22(5): 332-64.
- Kontush A., Lindahl M., Lhomme M., Calabresi L., Chapman M.J., Davidson W.S. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol*. 2015; 224: 3-51.

Сведения об авторах:

Карагодин Василий Петрович, доктор биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии, e-mail: vprka@mail.ru

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., рук. лаб. ангиопатологии, e-mail: a.h.opexob@gmail.com

Контуш Анатолий, PhD, research director, e-mail: anamol.kontush@upmc.fr

Камон Лоран, PhD, research scientist

Ломм Мари, PhD, research engineer

Чепмен Джон, PhD, DSc

Иванов Ю.Д.¹, Мальсагова К.А.¹, Татур В.Ю.², Веснин С.Г.³, Иванова Н.Д.⁴, Зиборов В.С.⁵

СВЧ-излучение раствора альбумина при внешнем возбуждении

¹ — Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение

«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, Москва, Погодинская ул., д. 10

² — Фонд перспективных технологий и новаций, 115682, г. Москва, Шипиловская ул., 64, 1, 147

³ — ООО «Фирма РЭС», 105082, Москва, Большая Почтовая ул., д. 22

⁴ — ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», 109472, Москва ул. Академика Скрябина, д. 23

⁵ — Объединенный институт высоких температур РАН, 125412, Москва, ул. Ижорская, д. 13, стр. 2

Цель исследования — измерение неравновесного СВЧ-излучения водного раствора альбумина при его механическом возбуждении. **Методика.** Проводился мониторинг изменения соотношения величин яркостных температур $T_{\text{СВЧ}}$ и $T_{\text{ИК}}$ после механического возбуждения водного раствора альбумина в измерительной ячейке при температуре 35—39°C. Измерения яркостных температур проводились при помощи радиотермометра. СВЧ-диапазон составлял 3,4—4,2 ГГц, ИК-диапазон составлял 8—13 мкм. **Результаты.** Обнаружено, что при механическом возбуждении водного раствора альбумина при температуре около 39°C возникает изменение соотношения между $T_{\text{СВЧ}}$ и $T_{\text{ИК}}$. Это соответствует появлению неравновесного СВЧ-излучения раствора вблизи области фазового перехода с температурой ~39°C. **Заключение.** Выявлен эффект возникновения неравновесного микроволнового излучения белкового раствора в области температуры раствора 39°C. Эта температура соответствует температуре организма человека при патологических состояниях, связанных с воспалительными процессами. Обнаруженный эффект может быть использован для разработки новых диагностических приборов и неинвазивных методов диагностики заболеваний.

Ключевые слова: кластеры воды, СВЧ-излучение, механическое воздействие

Для корреспонденции: Иванов Юрий Дмитриевич, доктор биол. наук, проф., руководитель лаборатории нанобиотехнологии, e-mail: yurii.ivanov@gambler.ru

Для цитирования: Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Татур В.Ю., Веснин С.Г., Иванова Н.Д., Зиборов В.С. СВЧ-излучение раствора альбумина при внешнем возбуждении. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 101—104.

Финансирование. Работа была выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 годы, гранта РНФ № 14-25-00132 и гранта РФФИ 15-04-08368а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.05.16

Ivanov Yu.D.¹, Malsagova K.A.¹, Tatur V.Yu.², Vesnin S.G.³, Ivanova N.D.⁴, Ziborov V.S.⁵

SHF radiation from albumin solution upon external excitation

¹ — Institute of Biomedical Chemistry, 10, ul. Pogodinskaya, Moscow, 119121, Russia

² — Foundation of Perspective Technologies and Novations, 64 build. 1, ul. Shipilovskaya, Moscow, 115682, Russia

³ — RES Ltd., 22, ul. B. Pochtovaya, Moscow, 105082, Russia

⁴ — Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, ul. Akademika Skryabina, Moscow, 10947, Russia

⁵ — Joint Institute for High Temperatures of Russian Academy of Sciences, 13 build. 2, ul. Izhorskaya, Moscow, 125412, Russia

The purpose of the research consisted in the measurement of nonequilibrium radiation in superhigh frequency (SHF) range from aqueous solution of albumin upon its mechanical stimulation. **Methods:** the monitoring of change in the ratio between brightness temperatures T_{SHF} and T_{IR} values after the mechanical stimulation of aqueous solution of albumin in the measuring cell at 35—39°C. The measurements of brightness temperatures were carried out with use of radiothermometer. SHF frequency range corresponded to 3.4—4.2 GHz, SHF frequency range corresponded to 8—13 μm . **Results:** It was found that mechanical stimulation of aqueous solution of albumin at the temperature ~39°C, the change in the ratio between T_{SHF} and T_{IR} occurs. This corresponds to emergence of nonequilibrium SHF radiation from the solution near the phase transition with ~39°C temperature. **Conclusion:** The effect of emergence of nonequilibrium SHF radiation from protein solution near its temperature 39°C was found. This temperature corresponds to the temperature of human organism upon a

number of pathological states connected with inflammatory processes. The discovered effect can be used in the development of novel non-invasive methods of disease diagnostics.

Keywords: water clusters, SHF emission, mechanical impact.

For correspondence: Yuri D. Ivanov, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory, Institute of Biomedical Chemistry; 10, ul. Pogodinskaya, Moscow, 119121, Russia, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

For citation: Ivanov Yu.D.¹, Malsagova K.A.¹, Tatur V.Yu.², Vesnin S.G.³, Ivanova N.D.⁴, Ziborov V.S. SHF radiation from albumin solution upon external excitation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 101–104. (in Russ).

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

Funding. This work was funded by the Russian Science Foundation, Grant No. 14-25-00132, and by RFBR Grant No. 15-04-08368a. The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013—2020.

Information about authors

Ivanov Yu.D., <http://orcid.org/0000-0001-5041-1914>

Pleshakova T.O., <http://orcid.org/0000-0003-3217-9095>

Received 12.05.2016

Введение

Белок альбумин присутствует в крови в высокой концентрации, порядка 7×10^{-4} М [1]. Вода, в свою очередь, является основной составляющей организма. Как известно, в воде существуют устойчивые кластеры с характерными частотами массивного льда [2]. Структура воды обуславливает ее сложные свойства, такие, как наличие нескольких фазовых переходов в ряде температурных диапазонов — в области 4°C , комнатных температур $19\text{—}25^\circ\text{C}$, в области физиологических температур $35\text{—}37^\circ\text{C}$ [2, 3]. Ранее нами было обнаружено СВЧ-излучение воды при ее механическом возбуждении в этих областях фазового перехода [4]. Взаимодействие белков с молекулами воды приводит к формированию структурированного слоя белка около молекулы воды [2]. Причем структура белкового раствора способна к изменению при изменении температуры, в том числе температуры организма. Известно, что при патологических процессах в организме температура может повышаться до 40°C и выше, а в определенных случаях и понижаться. Интересно отметить, что вязкость водного раствора гемоглобина, извлеченного из эритроцитов уменьшается на порядок в области температуры $36,6^\circ\text{C}$ при увеличении концентрации альбумина в 1,7 раза до 500 мг/мл [2]. Таким образом, водные растворы белка при патологических состояниях резко изменяют свои свойства. Также следует отметить, что проницаемость капилляров для эритроцитов скачкообразно изменяется при температуре выше 37°C [2].

Цель исследования — измерение СВЧ-излучения водного раствора белка при его механическом возбуждении в температурном диапазоне $35\text{—}39^\circ\text{C}$. Температурный диапазон был выбран исходя из физиологического диапазона температур в норме и патологии.

Методика

Деионизованная, ультрачистая вода была получена на установке Milli-Q System (Millipore, USA). Лиофилизированный раствор BSA белка (Sigma) разводили деионизованной водой до концентрации 10^{-4} М.

Измерение яркостной температуры в СВЧ-диапазоне и ИК-диапазоне

Известно, что в состоянии термодинамического равновесия любая среда излучает сплошной спектр, том числе в инфракрасном и в СВЧ-диапазоне. Интенсивность излучения в каждом из этих диапазонов определяется величиной яркостной температуры, характеризующей излучения. В состоянии равновесия яркостная температура в СВЧ-диапазоне ($T_{\text{СВЧ}}$) равна яркостной температуре в ИК-диапазоне ($T_{\text{ИК}}$).

В общем случае, зависимость яркостной температуры среды от времени в разных диапазонах может отличаться друг от друга, что указывает на появление неравновесного излучения.

В работе проводился мониторинг изменения соотношения величин $T_{\text{СВЧ}}$ и $T_{\text{ИК}}$ после механического воздействия на водный раствор альбумина. Для измерений использовали радиометр RTM-01 RES (Россия) с помощью которого определялось электромагнитное излучение среды: $T_{\text{СВЧ}}$ — в случае измерений в СВЧ-диапазоне и $T_{\text{ИК}}$ — в случае измерений в ИК-диапазоне. СВЧ-диапазон составлял $3,4\text{—}4,2$ ГГц (или $7,1\text{—}8,8$ см), ИК-диапазон составлял $8\text{—}13$ мкм. Для регистрации излучения использовалась штыревая антенна, соединенная с радиотермометром. Точность измерения температуры составляла $0,1^\circ\text{C}$.

*Механическое возбуждение
водного раствора альбумина*

Механическое возбуждение водного раствора альбумина осуществлялось посредством пипетирования (инъекции) раствора ($V = 1$ мл) в измерительной ячейке. За исходную температуру измерений принимали начальное значение $T_{ИК}$ до пипетирования. Общий объем раствора наполнения ячейки составлял 6 мл. Исследования проводили при температурах $T_{ИК} \sim 35\text{—}39^\circ\text{C}$. Необходимая температура поддерживалась с помощью водяной бани с термостатом.

Результаты и обсуждение

Основные результаты экспериментов при температурах 39 и 35°C приведены на рис. 1 и 2. Начальное значение $T_{ИК}$ использовалось в качестве температуры воды, при которой проводился эксперимент, т.е. для отнесения температурных условий эксперимента к одному из указанных выше температурных диапазонов.

Как показано на рис. 1, после механического возбуждения раствора белка при температуре 39°C наблюдалось импульсное увеличение $T_{СВЧ}$ на $\sim 1^\circ\text{C}$ и последующий спад до прежнего уровня. При этом $T_{ИК}$ снижалась (примерно на 2°C), причем этом снижение наблюдалось в течение всего времени эксперимента, то есть наблюдалось значительное расхождение $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$ после механического перемешивания среды, что означает появление неравновесного СВЧ-излучения. Таким образом, было показано, что при механическом возбуждении жидкости имеет место изменение соотношения уровня СВЧ-излучения и уровня ИК-излучения вблизи фазовых переходов воды.

На рис. 2 показана зависимость $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$ раствора альбумина при механическом возбуждении при $T_{ИК} = 35^\circ\text{C}$. Как видно, в этой области температур после механического возбуждения раствора белка появляется только импульс СВЧ-излучения с характерной яркостной температурой порядка $T_{СВЧ} \sim 1^\circ\text{C}$, после чего $T_{СВЧ}$ возвращается на прежний уровень, а $T_{ИК}$ не изменяется.

Изменение уровня неравновесного СВЧ-излучения при возбуждении жидкости было различным при $T_{ИК} = 35$ и 39°C для разных областей фазовых переходов. При повышении температуры до 39°C наблюдается повышение неравновесности состояния раствора, выражающегося в расхождении температур $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$.

Повышенный уровень $T_{СВЧ}$ по сравнению с уровнем $T_{ИК}$ связан с тем, что при механическом возбуждении жидкости инициируется изменение содержания льдоподобных структур в этой жидкости. А выделя-

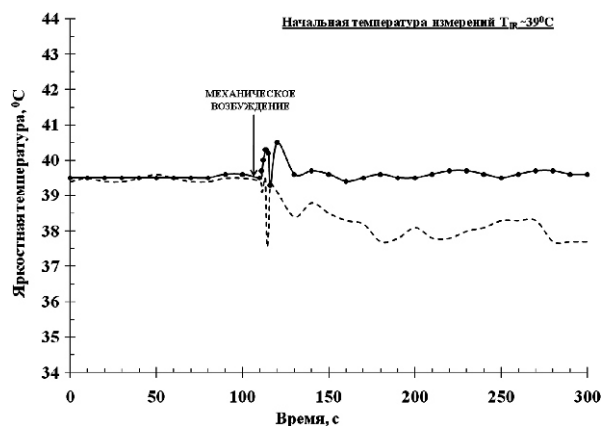


Рис. 1. Результаты измерения яркостной температуры в СВЧ-диапазоне $T_{СВЧ}$ (сплошная линия) и в инфракрасном диапазоне $T_{ИК}$ (прерывистая линия) в воде. Вертикальными стрелками указан момент механического воздействия на жидкость. $T_{ИК} \sim 39^\circ\text{C}$. По оси X — время измерений, минуты; по оси Y — величина яркостной температуры, градусы.

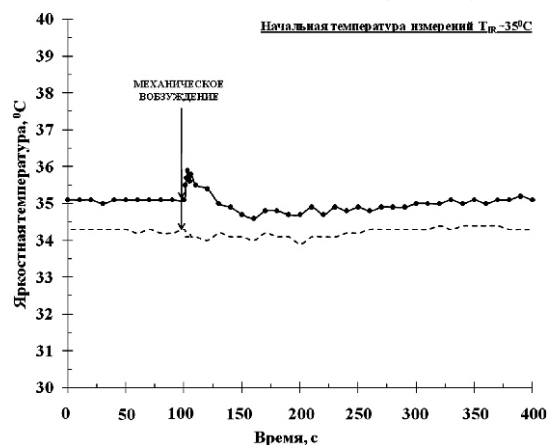


Рис. 2. Результаты измерения яркостной температуры в СВЧ-диапазоне $T_{СВЧ}$ (сплошная линия) и в инфракрасном диапазоне $T_{ИК}$ (прерывистая линия) в воде. Вертикальными стрелками указан момент механического воздействия на жидкость. $T_{ИК} \sim 35^\circ\text{C}$. По оси X — время измерений, минуты; по оси Y — величина яркостной температуры, градусы.

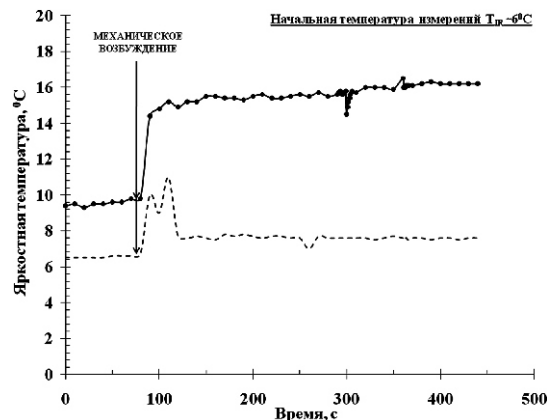


Рис. 3. Результаты измерения яркостной температуры в СВЧ-диапазоне $T_{СВЧ}$ (сплошная линия) и в инфракрасном диапазоне $T_{ИК}$ (прерывистая линия) в воде. Вертикальными стрелками указан момент механического воздействия на жидкость. $T_{ИК} \sim 6^\circ\text{C}$. По оси X — время измерений, минуты; по оси Y — величина яркостной температуры, градусы.

References

ющаяся энергия преобразования ледовых кластеров выделяется в виде СВЧ-излучения. Частота генерации этого излучения соответствует вращательным переходам воды и гидроксила [5]. Что интересно, это подтверждается экспериментами в области температур другого фазового перехода раствора ($T_{ИК}$ порядка $4-8^{\circ}C$), где наблюдается резкое увеличение $T_{СВЧ}$ раствора белка при сохранении $T_{ИК} \sim 6-8^{\circ}C$ (рис. 3), связанного с температурой плавления льда.

Обнаруженный эффект возникновения неравновесного состояния водного раствора альбумина в области повышенной температуры (температура организма человека при воспалительных заболеваниях) может быть использован для разработки новых неинвазивных серологических методов диагностики заболеваний. Следует сказать, что диагностика ряда патологических состояний на основе анализа СВЧ-излучения тканей пациента уже используется в клинике [<http://www.google.com/patents/WO2010074608A3?hl=ru&cl=ru>].

Таким образом, обнаружено неравновесное излучение водного раствора альбумина в СВЧ-диапазоне после механического воздействия. Характер и выраженность изменений уровня СВЧ-излучения различно для разных температурных диапазонов.

Учитывая, что СВЧ-поле в этом диапазоне может влиять на свойства ферментативных систем [6], можно сделать предположение о возможной синхронизации процессов в организме человека посредством этого излучения. Интересно отметить, что для области пониженных температур ($6^{\circ}C$), когда наблюдается выход из анабиоза земноводных, происходит существенное ступенчатое повышение СВЧ-излучения.

При комнатной температуре ($\sim 22^{\circ}C$) наблюдается максимальная функциональная активность некоторых ферментативных систем почвенных бактерий, как нами было показано ранее с помощью АСМ [7] для цитохрома P450BM3 из *Bacillus megaterium* [8].

Обнаруженные эффекты генерации СВЧ в воде могут быть полезны для создания новых методов диагностики патологических состояний человека, в том числе сопряженные с высокочувствительными системами на базе нанопроводных детекторов [9, 10] и АСМ [11].

Сведения об авторах:

Мальсагова Кристина Ахмедовна, мл. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии

Татур Вадим Юрьевич, исполнительный директор

Веснин Сергей Георгиевич, канд. технических наук, доцент, генеральный директор

Иванова Нина Дмитриевна, преподаватель

Зиборов Вадим Серафимович, канд. физико-математических наук, ст. науч. сотр. лаборатории №1.1.1. — ударно-волновых воздействий

1. Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 2005; 57: 787-96.

2. Pershin S.M. Ortho-Para Conversion of H₂O in Water and a Jump in Erythrocyte Fluidity Through a Microcapillary at a Temperature of $36.6 \pm 0.3^{\circ}C$. In: *V International Congress «Weak and Ultra-Weak Fields and Emissions in Biology and Medicine». Conference Proceedings*. 2009; St.-Petersburg: 87-97. (in Russian)

3. Kholmanskiy A.S. Two types of anomalous thermodynamics of water. *Apriori. Series: Iestestvennye I tekhnicheskie nauki*. 2015; 1: 1-17. (in Russian)

4. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Microwave emission from water in bioanalytical systems. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2015; 59(4): 78-81. (in Russian)

5. Pershin S.M., Bunkin A.F., Anisimov N.V., Pirogov Yu.A. Water enrichment by H₂O ortho-isomer: four-photon and NMR spectroscopy. *Laser Physics*. 2009; 19(3): 410-3.

6. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A. et al. AFM-based protein fishing in the pulsed electric field. *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9(2): 121-9.

7. Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Pleshakova T.O., Frantuzov P.A., Krokhin N.V., Ziborov V.S., Archakov A.I. Atomic force microscopy visualization and measurement of the activity and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes. *Biofizika*. 2011; 56: 939-44. (in Russian)

8. Ivanov Y.D., Malsagova K.A., Izotov A.A., Pleshakova T.O., Tatur V.Yu., Vesnin S.G. et al. Detection of microwave radiation of cytochrome CYP102 A1 solution during the enzyme reaction. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016; 5: 285-9.

9. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Shumyantseva V.V. et al. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and a-fetoprotein. *Lab Chip*. 2012; 12: 5104-11.

10. Malsagova K.A., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Kozlov A.F. et al. A SOI-nanowire biosensor for the multiple detection of D-NFATc1 protein in the serum. *Anal. Methods*. 2015; 7: 8078-85.

11. Ivanov Y.D., Pleshakova T., Malsagova K., Kozlov A., Kaysheva A., Kopylov A. et al. Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis. *FEBS J*. 2014; 281: 4705-17.