

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.jppt.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: (с) ИП Иришкин Дмитрий Андреевич
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 2013 0,600

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

Подписные индексы
по каталогу агентства «Роспечать»:
для индивидуальных подписчиков **71456**
для предприятий и организаций **72151**

Сдано в набор 15.05.2016 г.
Подписано в печать 16.03.2016 г.

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.
2016. Том 60. № 2. 1–120

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.

(с) 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, № 2, 2016

Апрель—июнь

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.jpvet.net
E-mail: path.physiol@yandex.ru

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель:
(с) ИП Иришкин Дмитрий Андреевич
E-mail: genius-media@mail.ru

ИФ РИНЦ 2013 0,600

ISSN 0031-2991
Pathological
physiology
and experimental
therapy
2016. Vol. 60. № 2. 1–120

Moscow

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIA

Pathological physiology and experimental therapy

*Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol. 60, № 2, 2016

April—June

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

- Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Захарова И.А., Гречко А.В., Морозов С.Г.* Измерение уровня митохондриального шаперона DNAJC15/MCJ в клетках крови больных с atopическим дерматитом средней тяжести 4
- Бажанова Е.Д., Козлова Ю.О., Анисимов В.Н., Суханов Д.С., Теплый Д.Л.* Пути апоптоза нейронов и функциональные возможности коры головного мозга при старении — роль некоторых препаратов (ангиоген, цитофлавин, пирарцетам) 13
- Шурыгина Л.В., Злищева Э.И., Кравцов А.А., Полещук Л.А., Абрамова Н.О.* Влияние комената калия на антиоксидантную глутатионовую систему головного мозга стрессированных мышей 20
- Игнатьева Г.А., Корнилаева Г.В., Мельникова Т.М., Сорокина Е.Г., Батенева Е.И.* Экспериментальное исследование индукции гуморального ответа на синтетический мультимерный пептидный антиген, потенциально имитирующий конформационный эпитоп нейтрализации ВИЧ-1 24
- Хамнагдаева Н.В., Семенова Л.Ю., Обрубов С.А., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Рогожина И.В.* Характеристика популяций Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и активационных маркеров у детей с близорукостью в зависимости от исходного уровня иммунного статуса 29
- Топол И.А., Камышный А.М.* Закономерности и направленность изменений в иммунной системе кишечника в условиях хронического социального стресса 34
- Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В.* Гуморальный иммунный ответ на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц в зависимости от стажа курения 39
- Тропская Н.С., Шашкова И.Г., Черненко Т.В., Попова Т.С.* Влияние ванкомицина на мигрирующий миоэлектрический комплекс и видовой состав микрофлоры кишечника 44
- Чегодарь Д.В., Кубышкин А.В.* Влияние раствора наносеребра на процессы неспецифического протеолиза в слизистой желудка при профилактике и лечении экспериментальной язвы желудка 51
- Звягина Т.С., Горбенко Н.И., Бороков А.Ю.* Влияние таурина на биоэнергетические процессы митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности 57
- Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О.* Сократительная функция и метаболизм миокарда в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени у крыс 63
- Ляшев Ю.Д., Королев В.А., Грибач И.В., Кирищева Н.Е.* Влияние острой или хронической интоксикации банколом на состояние процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов 69
- Сажина Н.Н., Титов В.Н., Евтеева Н.М., Ариповский А.В.* Изменение суммарной ненасыщенности жирных кислот липидов плазмы крови больных артериальной гипертензией в глюкозолерантном тесте 74
- Очеретина Р.Ю., Стогов М.В.* Белково-азотистый обмен в печени мышей в восстановительном периоде после скелетной травмы 81

ОБЗОРЫ

- Пальцын А.А.* Физические нагрузки и возрастные когнитивные изменения 87
- Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Семенов А.С., Мухомедзянов А.В., Горбунов А.С.* Влияние посткондиционирования сердца на некроз, апоптоз, онкоз и аутофагию кардиомиоцитов 94
- Саприна Т.В., Прохоренко Т.С., Новицкий В.В., Ворожцова И.Н., Рязанцева Н.В.* Механизмы формирования аутоиммунных заболеваний поджелудочной и щитовидной желез 101

МЕТОДИКА

- Мельниченко А.А., Мясоедова В.А., Елизова Н.В., Никитина Н.А., Карагодин В.П., Собенин И.А., Орехов А.Н.* Оценка содержания циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови 107
- Онищенко Н.А., Мещерин С.С., Алексеева Л.С., Севастьянов В.И.* Модель хронической трансплантационной нефропатии 112

ХРОНИКА

- Хугаева В.К.* Алексей Михайлович Чернух (1916–1982) 118

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Zakharova I.A., Grechko A.V., Morozov S.G.* Mitochondrial chaperon DNAJC15/MCJ level measuring in the blood cells of patients with atopic dermatitis of moderate severity 4
- Bazhanova E.D., Kozlova Yu.O., Anisimov V.N., Sukhanov D.S., Teply D.L.* Pathways of neuronal apoptosis and functionality of the brain cortex during aging — the role of some drugs (angiogen, cytoflavin, piracetam) 13
- Shurygina L.V., Zlischeva E.I., Kravtsov A.A., Poleschuk L.A., Abramova N.O.* Effect of potassium comenat on antioxidant glutathione system in brain of stressed mice 20
- Ignateva G.A., Kornilaeva G.V., Melnikova T.M., Sorokina E.G., Bateneva E.I.* Experimental study of antibody's response on synthetic multimeric peptide wich potentially imitate conformational neutralizing epitope of HIV-1 24
- Khamnagdaeva N.V., Semenova L.Y., Obrubov S.A., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Rogozhina I.V.* Characteristic populations of T and B lymphocytes, NK-cell and activation markers in children with myopia depending on the starting level of the immune status 29
- Topol I.A., Kamyshny A.M.* Regularities and direction of change in the gut immune system in conditions of chronic social stress 34
- Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V.* Humeral immune response to the oxidation of lipoproteins in nicotine addicted patients according to their smoking history 39
- Tropkaya N.S., Shashkova I.G., Chernen'kaya T.V., Popova T.S.* Efect of vancomycin on migrating myoelectric complex and intestinal microflora 44
- Chegodar D.V., Kybushkin A.V.* The influence of nanosilver solution on nonspecific proteolysis processes in gastric mucosa in prophylactic and treatment of experimental gastric ulcer 51
- Zvyagina T.S., Gorbenko N.I., Borikov A.Y.* Taurine influence on heart mitochondrial bioenergy processes of rats with insulin resistance syndrome 57
- Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O.* Contractile function and myocardial metabolism in early period after maximally allowable liver resection in rats 63
- Lyashev Yu.D., Korolev V.A., Gribach I.V., Kirishcheva N.E.* The influence of acute or chronic bankol intoxication of the lipid peroxidation processes and the activity of antioxidant enzymes 69
- Sazhina N.N., Titov V.N., Evteeva N.M., Aripovsky A.V.* Change of total nonsaturation of blood plasma lipids for patients with arterial hypertension in glucose tolerance test 74
- Ocheretina R.Iu., Stogov M.V.* Protein and nitrogen metabolism in the liver of mice during recovery period after skeletal injury 81

REVIEWS

- Paltsyn A.A.* Exercise and age-related cognitive decline 87
- Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Sementsov A.S., Mukhomedzyanov A.V., Gorbunov A.S.* Impact of postconditioning of the heart on necrosis, apoptosis, oncosis, autophagy of cardiomyocytes 94
- Saprina T.V., Prokhorenko T.S., Novitsky V.V., Vorozhtsova I.N., Ryazantseva N.V.* Mechanism of formation of autoimmune diseases pancreatic and thyroid glands 101

METHODS

- Melnichenko A.A., Myasoedova V.A., Elizova N.V., Nikitina N.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N.* Method for measurement of circulating multiply modified low-density lipoprotein in the blood serum 107
- Onischenko N.A., Meshcherin S.S., Alekseeva L.S., Sevastyanov V.I.* The model of chronic transplantational nephropathy 112

CHRONICLE

- Khugayeva V.K.* Alexey Mikhailovich Chernukh (1916–1982) 118

Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092

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

Измерение уровня митохондриального шаперона DNAJC15/MCJ в клетках крови больных с атопическим дерматитом средней тяжести

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

Цель исследования — изучить экспрессию белка теплового шока DNAJC15/MCJ семейства HSP40 в лимфоцитах и нейтрофилах крови больных атопическим дерматитом средней степени тяжести (индекс SCORAD от 20 до 40) в остром периоде заболевания. **Методика.** Бактериальную контаминацию кожи больных атопическим дерматитом определяли методом ПЦР в реальном времени. Клетки крови получали из локтевой вены, окрашивали антителами к рецепторам плазматической мембраны и митохондриальному белку DNAJC15/MCJ. Для измерения уровня индуцированного апоптоза нейтрофилов использовали С2-церамид. Клетки анализировали методом проточной цитометрии. **Результаты.** Установлено, что экспрессия молекулярного шаперона DNAJC15/MCJ в CD8+ цитотоксических лимфоцитах и в нейтрофилах периферической крови больных атопическим дерматитом статистически значимое выше по сравнению со здоровыми донорами. При наличии бактериальной контаминации кожи уровень экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах крови больных атопическим дерматитом в 2 раза превышает соответствующие показатели у больных без верифицированной контаминации кожи. Увеличение экспрессии белка DNAJC15/MCJ сопряжено с возрастанием уровня церамид-индуцированного апоптоза нейтрофилов крови больных атопическим дерматитом. **Выводы.** Повышение экспрессии митохондриального белка DNAJC15/MCJ в лимфоцитах и нейтрофилах больных атопическим дерматитом средней степени тяжести в острой стадии заболевания отражает изменения метаболизма в клетках крови.

Ключевые слова: атопический дерматит, лимфоциты, нейтрофилы, HSP40, DNAJC15/MCJ

Для корреспонденции: Морозов С.Г., доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ВРИО директора ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: biopharm@list.ru

Для цитирования: Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Захарова И.А., Гречко А.В., Морозов С.Г. Измерение уровня митохондриального шаперона DNAJC15/MCJ в клетках крови больных с атопическим дерматитом средней тяжести. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; (2): 4–12.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.12.15

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

Mitochondrial chaperon DNAJC15/MCJ level measuring in the blood cells of patients with atopic dermatitis of moderate severity

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.

The purpose. Heat shock protein DNAJC15/MCJ expression has been measured in lymphocytes and neutrophils obtained from patients with atopic dermatitis of moderate severity (SCORAD index from 20 to 40) in acute phase compared with healthy donors. **Methods.** Real time PCR method has been used to verify the bacterial contamination of the skin of pa-

tients with atopic dermatitis. Peripheral blood lymphocytes and neutrophils have been double stained with antibodies to the plasma membrane receptors and mitochondrial protein DNAJC15/MCJ. C2-ceramide has been used to induce an apoptosis in neutrophils separated on Percoll gradient. Cells were analyzed by flow cytometry. **Results.** In the first time it is established that molecular chaperone DNAJC15/MCJ expression in CD8⁺ T cells of patients with atopic dermatitis were significantly higher compared to the healthy donors ($P < 0.05$). Expression DNAJC15/MCJ in neutrophils of atopic patients was much dependent on the bacterial contamination of skin that raised the level of DNAJC15/MCJ expression twice. The increased expression of DNAJC15/MCJ protein in neutrophils of atopic patients has been found to be associated with the elevated level of ceramide-induced apoptosis in these cells. **Conclusions.** Increased expression of the mitochondrial protein DNAJC15/MCJ in lymphocytes and neutrophils of patients with atopic dermatitis of moderate severity reflects the changes of metabolism in blood cells under this disease.

Keywords: atopic dermatitis, lymphocytes, neutrophils, HSP40, DNAJC15/MCJ.

For citation: Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Zakharova. I.A., 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. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 4–12. (in Russ).

For correspondence: Morozov S.G., PhD, professor, corresponding member of Russian Academy of Sciences, acting director of Scientific research institute of the general pathology and pathophysiology, e-mail: biopharm@list.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Elistratova I.V., <http://orcid.org/0000-0002-0393-4947>

Ivanchenko O.B., <http://orcid.org/0000-0003-2715-8935>

Zakharova. I.A., <http://orcid.org/0000-0002-5648-4214>

Grechko A.V., <http://orcid.org/0000-0003-2366-3117>

Morozov S.G., <http://orcid.org/0000-0001-5822-5729>

Received 17.12.15

Введение

Изучение механизмов развития атопического дерматита (АД) является актуальной проблемой дерматологии в связи с ростом частоты встречаемости данной патологии и отягощением его клинической картины. В обострении АД немалую роль играет стресс, который на уровне клеток активирует систему молекулярных шаперонов, исторически называемых белками теплового шока (Heat Shock Proteins). Так, нами впервые было показано, что у больных АД активируются HSP90 [1]. Продолжением наших исследований явилось изучение другой группы шаперонов — HSP40. Семейство белков теплового шока 40 кДа (HSP40) входит в состав суперсемейства, состоящего из HSP90, HSP70, HSP40, малых белков теплового шока и шаперонинов. Семейство HSP40 человека включает 49 белков — шаперонов, основная функция которых — защита клеток от последствий стресса. В подсемейство А белков HSP40 входят 4 белка, в подсемейство В — 14 белков, к подсемейству С относятся 30 белков, выполняющих функции шаперонов и ко-шаперонов во всех компартментах клетки [2]. Семейство белков HSP40 названо DNAJ (J домен способен связы-

вать ДНК) по терминологии, используемой для обозначения этого белка у *E.coli*. Белок DNAJC15 имеет 75% гомологии с идентичными белками клеток других млекопитающих и более 57% гомологии с клетками прокариот и низших эукариот [3]. Все белки HSP40 включают консервативный J домен и классифицируются на основании его структурной организации. J домен необходим для связывания с HSP70, ко-шапероном которого является HSP40 [4]. HSP40 также могут связывать HSP90 и выполнять роль ко-шаперонов при фолдинге нативных и поврежденных белков, перемещении полипептидов через клеточные мембраны и т.д.

В ответ на стресс, инициированный в органеллах клетки, в ядре клетки повышается транскрипционная активация генов и синтез стресс-зависимых белков, специфичных для данных органелл. Большое число публикаций посвящено роли ко-шаперонов семейства HSP40 при стрессе в эндоплазматическом ретикулуме, а также их роли в цитозоле, однако, активности HSP40 в митохондриях посвящено значительно меньше работ, хотя по значимости для клетки митохондриальный стресс имеет глобальное значение в связи с изменениями её энергетического статуса [5].

В митохондриях человека обнаружено несколько белков семейства HSP40. Белок DNAJC15 (также называется MCJ — Methylation — Controlled J protein, поэтому далее указывается как белок DNAJC15/MCJ) заякорен С-концом во внутреннюю мембрану митохондрий, его J домен направлен в сторону матрикса митохондрии. DNAJC15/MCJ участвует в биогенезе митохондрий, взаимодействует с компонентами первого комплекса электронно-транспортной (дыхательной) цепи митохондрий. DNAJC15/MCJ — это эндогенный митохондриальный репрессор дыхательной цепи, он препятствует формированию суперкомплексов из белков дыхательной цепи [3]. DNAJC15/MCJ регулирует митохондриальные поры (Mitochondrial Permeability Transition Pore, МРТР): повышение его экспрессии открывает поры и индуцирует апоптоз, снижение уровня DNAJC15/MCJ супрессирует активность пор и повышает способность клеток к выживанию. DNAJC15/MCJ связывает регулятор циклофилин D (cyclophilin D) и переносит его на МРТР [6]. DNAJC15/MCJ формирует комплексы с MAGMAS — митохондриальным мотором и регулятором транслоказ, обеспечивающим импорт пре-белков через мембрану митохондрий. MAGMAS транспортируется молекулярным шапероном DNAJC15/MCJ к индивидуальной транслоказе, требуемой для переноса специфического белка [7]. DNAJC15/MCJ взаимодействует с препротейн-транслоказой внутренней мембраны митохондрий TIM23 (Translocase of the Inner Mitochondrial membrane), компонентом которой является митохондриальный HSP70 морталин (mortalin). DNAJC15/MCJ стимулирует АТФ-азную активность морталина и обеспечивает работу транслоказы TIM23 [8]. Митохондриальное дыхание зависит от метаболической активности клетки. DNAJC15/MCJ регулирует ответ клетки на поступление питательных веществ и контролирует метаболизм митохондрий, поэтому уровень белка DNAJC15/MCJ регулируется в соответствии с изменениями метаболизма.

Ген *mcj* человека имеет локализацию 13q14, его экспрессия высока в CD8+ Т-лимфоцитах и почти не определяется в CD4+ Т-хелперах и в В-клетках, уровень белка DNAJC15/MCJ высок в цитотоксических лимфоцитах, а в хелперах существенно ниже. Эти различия могут, в частности, определяться тем, что активированные цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты являются источником секретируемого интерферона-гамма (IFN- γ). Ген *mcj* является транскрипционной мишенью IFN- γ , обуславливающей динамическую адаптацию тканей к стрессу. У больных атопическим дерматитом в дерме и в эпидермисе в зоне воспаления кожи повышено содержание CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , IL-13 и IL-22 [9]. IFN- γ репрес-

сирует транскрипцию гена *mcj* в макрофагах, транскрипционный регулятор Ikaros связывает промотор *mcj* и обуславливает репрессию его гена, в сигнальный путь входит казеин-киназа-II [10]. Экспрессия гена *mcj* в макрофагах регулирует их ответ на воспалительные стимулы. Ген *mcj* необходим для продукции TNF- α макрофагами в ответ на связывание TLR рецепторов бактериями и другими лигандами [11].

Таким образом, изучение белка DNAJC15/MCJ представляет несомненный интерес для оценки метаболической активности клеток.

Цель исследования — количественное измерение экспрессии белка DNAJC15/MCJ в клетках периферической крови больных атопическим дерматитом по сравнению с показателями здоровых доноров.

Методика

Пациенты и доноры

Работа проведена на клетках крови 68 молодых мужчин в возрасте от 18 до 34 лет, больных АД средней тяжести (с индексом SCORAD от 20 до 40). У всех обследованных лиц обострение заболевания началось в пределах одной недели до взятия крови. Донорами были 32 здоровых мужчины в возрасте от 18 до 32 лет.

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, патология нервной системы и соматическая патология, которые могли бы существенно изменить полученные результаты.

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 местах, внешне не затронутых воспалительным процессом. Наличие бактериальной или грибковой контаминации верифицировали методом ПЦР в реальном времени с парами праймеров, синтезированными на основании соответствующих олигонуклеотидов патогенов, известных из базы данных [12]. В работе использовали методику, применяемую для клинических исследований [13, 14].

Работа с клетками крови

Кровь получали из локтевой вены в вакуутайнеры с ЭДТА, освобождали от эритроцитов лизирующим буфером (Vecton 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 метаболизма. Для исследования рецепторов плазматической мембраны (CD16, CD32, CD3, CD4, CD8 и др.) клетки окрашивали антителами, затем фиксировали в 4% параформальдегиде. Для исследования внутриклеточных белков клетки сначала фиксировали в 4% параформальдегиде с 0,001% Тритоном X-100, отмывали, а затем окрашивали антителами к белку теплового шока

DNACJ15/MCJ [EPR12823] (ab179820) (Abcam). Вторыми антителами были изотипспецифические F(ab)2 фрагменты иммуноглобулинов, меченные FITC или фикоэритрином. Для изучения спонтанного апоптоза клетки фиксировали немедленно после выделения, затем окрашивали пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере с цитратом натрия, что позволяет получать как диплоидные пики ДНК, так и пики ДНК, соответствующие апоптозу или некрозу. Для определения уровня индуцированного апоптоза использовали 20 мкМ С2-церамида, проникающего в клетку, который стандартно используется для этих целей [15]. Через 2 ч инкубации с церамидом клетки отмывали, фиксировали и далее окрашивали, как указано выше. Интенсивность флуоресценции измеряли на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson) по программе SimulSet. В каждом образце регистрировали 10 000 событий.

Статистический анализ

Полученные результаты анализировались по программе ANOVA и представлены как $M \pm m$. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, статистический анализ нескольких групп проводился с помощью непараметрического анализа

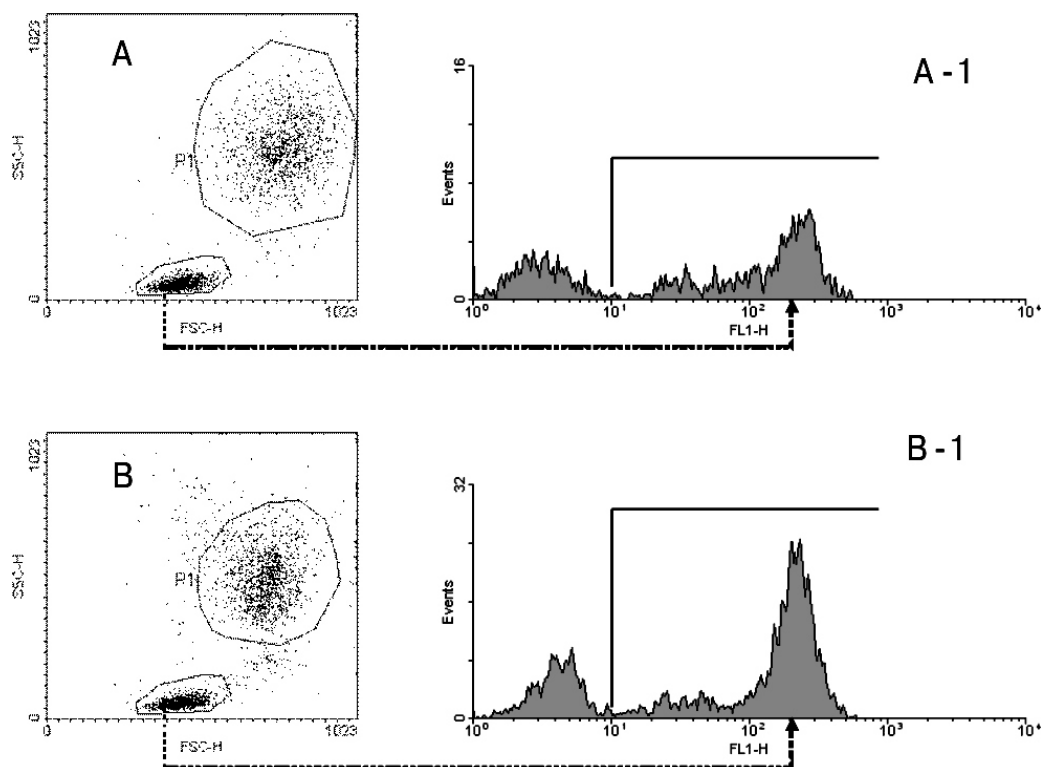


Рис. 1. Данные проточной цитометрии по экспрессии белка теплового шока DNACJ15/MCJ в лимфоцитах крови.

Представлены данные проточной цитометрии (DotPlot) основных популяций клеток крови, (А) — пример здорового донора, (В) — пример больного с atopическим дерматитом. Гейт лимфоцитов обведен. (А-1) — гистограмма экспрессия белка DNACJ15/MCJ в лимфоцитах донора, (В-1) — гистограмма экспрессия белка DNACJ15/MCJ в лимфоцитах больного.

методом множественного сравнения по критерию Ньюмена—Кейлса, $p \leq 0,05$ дается как статистически значимое различие между группами.

Результаты и обсуждение

Экспрессия белка теплового шока DNAJC15/MCJ в лимфоцитах крови

В связи с тем, что нарушение дифференцировки и активации лимфоцитов играет важную роль в патогенезе АД, была исследована экспрессия белка DNAJC15/MCJ в лимфоцитах. Лимфоциты крови больных АД и доноров были окрашены антителами к белку DNAJC15/MCJ и проанализированы на проточном цитометре. На гистограммах донора и больного левый негативный пик соответствует изотипическому контролю, а правый пик соответствует положительно окрашенным лимфоцитам. Бимодальность положительного пика определяется тем, что лимфоциты разных субпопуляций имеют различный уровень экспрессии митохондриального белка DNAJC15/MCJ [3] (рис. 1). Анализ интенсивности внутриклеточной флуоресценции (измеряется в условных единицах и соответствует уровню экспрессии изучаемого белка) не выявил статистически значимого различия между больными atopическим дерматитом и донорами в связи с существенным разбросом данных (рис. 2). При этом имела явная тенденция к повышению экспрессии белка DNAJC15/MCJ у больных, что даёт возможность

Экспрессия DNAJC15/MCJ в лимфоцитах

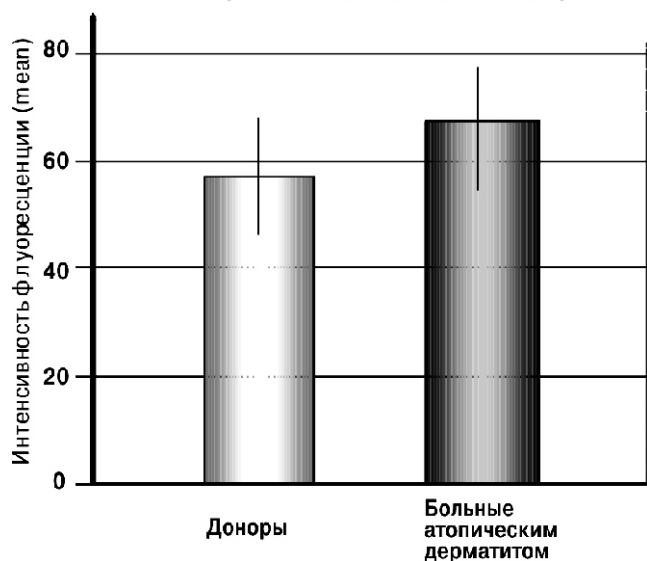


Рис. 2. Интенсивность внутриклеточной флуоресценции белка теплового шока DNAJC15/MCJ в лимфоцитах крови. Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (mean) (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJC15/MCJ в лимфоцитах здоровых доноров ($n = 32$) и больных atopическим дерматитом ($n = 68$).

предполагать нарушения метаболизма лимфоцитов больных atopическим дерматитом, так как DNAJC15/MCJ является репрессором I комплекса дыхательной цепи митохондрий.

В связи с тем, что *in vitro* было показано различие в экспрессии белка DNAJC15/MCJ в популяциях CD4+ и CD8+ клеток [3], была проанализирована его экспрессия в CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитах периферической крови больных с АД. Примеры двойной окраски лимфоцитов на антиген CD8 и белок DNAJC15/MCJ (или CD4 и DNAJC15/MCJ), представлены на рис. 3.

Экспрессия белка DNAJC15/MCJ статистически значимо различается в CD4+ Т-хелперах и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитах (рис. 4). У больных АД экспрессия DNAJC15/MCJ несколько повышается в CD4+ Т-лимфоцитах, хотя основной вклад в повышение экспрессии этого белка вносят CD8+ Т-клетки. Статистический анализ результатов указывает на значимые различия в экспрессии белка DNAJC15/MCJ в цитотоксических лимфоцитах доноров и больных АД.

Значение полученных результатов определяется тем, что CD8+ Т-лимфоциты играют роль в патогенезе АД. У больных в CD8+ Т-лимфоцитах периферической крови, экспрессирующих антиген, ассоциированный с кожей (CLA+), повышена экспрессия перфорина и гранзима-В, которые индуцируют апоптоз клеток и поддерживают воспаление [16]. CD8+ Т-лимфоциты обеспечивают защиту организма от патогенов, при контакте с которыми они быстро пролиферируют, при этом 90—95% CD8+ Т-лимфоцитов погибает, а часть клеток дифференцируется в клетки памяти [17]. Микробные суперантигены, в частности, стафилококковый энтеротоксин, обуславливают клональную экспансию Т-клеток, повышение Th2 и CD8+ Т-клеток на фоне супрессии Т регуляторных клеток, что поддерживает воспаление при АД [18].

Экспрессия белка теплового шока DNAJC15/MCJ в нейтрофилах крови

Нейтрофилы играют важную роль в патогенезе АД [19]. Поскольку нейтрофилы и лимфоциты значительно различаются по числу митохондрий, то следующим этапом работы было определение экспрессии белка DNAJC15 в нейтрофилах. Данные проточной цитометрии представлены на рис. 5. Фигуры А (донор), В (больные АД, без верификации инфицирования кожи) и С (больные с бактериальной инфекцией кожи, что подтверждено методом ПЦР) показывают распределение окрашенных антителами нейтрофилов. На гистограмме (картина D) отражено существенное увеличение экспрессии белка DNAJC15 у больных

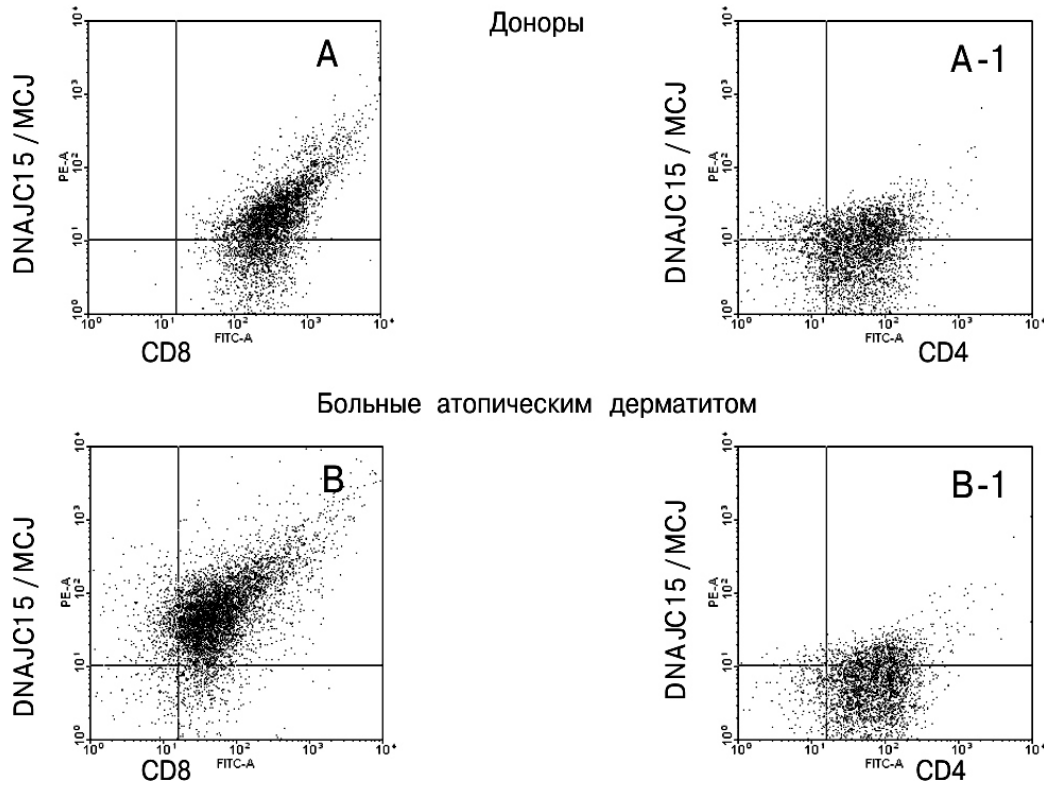


Рис. 3. Двойная окраска лимфоцитов периферической крови доноров и больных с atopическим дерматитом антителами к белку теплового шока DNAJC15/MCJ и рецепторам лимфоцитов. Представлены примеры проточной цитометрии по двойной окраске лимфоцитов периферической крови антителами к рецепторам лимфоцитов (CD8 или CD4) (канал FITC-A) и антителами к митохондриальному белку DNAJC15/MCJ (канал PE-A).

atopическим дерматитом ($n = 41$), с верифицированной методом ПЦР бактериальной контаминацией кожи (наиболее часто определялся золотистый стафилококк) по сравнению с группой больных АД без верифицированной инфекции ($n = 27$). Количественные результаты измерения интенсивности флуоресценции белка DNAJC15 приведены на рис. 6. Следует отметить, что отсутствие бактериальной контаминации во внешне здоровых участках кожи не отражает её отсутствия (или наличия) в пораженных участках кожи. Однако задачей работы было изучение реакции клеток всего организма на стресс, вызванный заболеванием, а не локальное поражение клеток в очаге воспаления.

Очищенная фракция нейтрофилов была получена на градиенте плотности, после чего клетки были отмыты, переведены в полную среду с сывороткой и инкубированы для восстановления их метаболизма.

Это исключало подавление функции митохондрий в связи с экспериментальными условиями. Далее нейтрофилы исследовали на предмет спонтанного и индуцированного апоптоза. Примеры гистограмм, отражающих состояние ДНК в нейтрофилах, приведены на рис. 7.

Экспрессия DNAJC15/MCJ в CD8+ и в CD4+ лимфоцитах

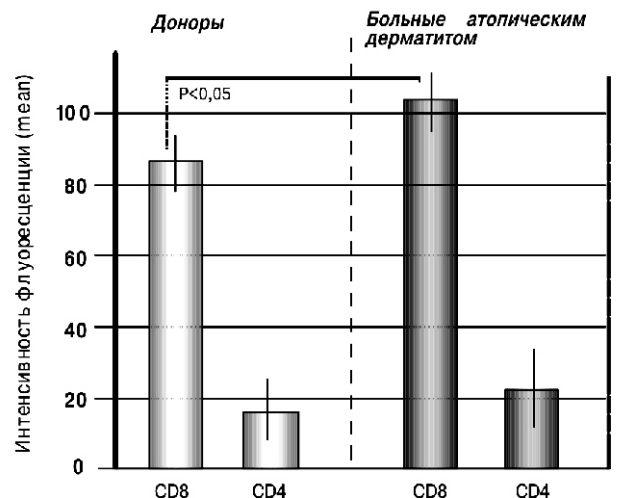


Рис. 4. Интенсивность внутриклеточной флуоресценции белка теплового шока DNAJC15/MCJ в CD8+ и в CD4+ лимфоцитах периферической крови.

Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (mean) (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJC15/MCJ в CD8+ лимфоцитах и в CD4+ лимфоцитах здоровых доноров ($n = 32$) и больных с atopическим дерматитом ($n = 68$).

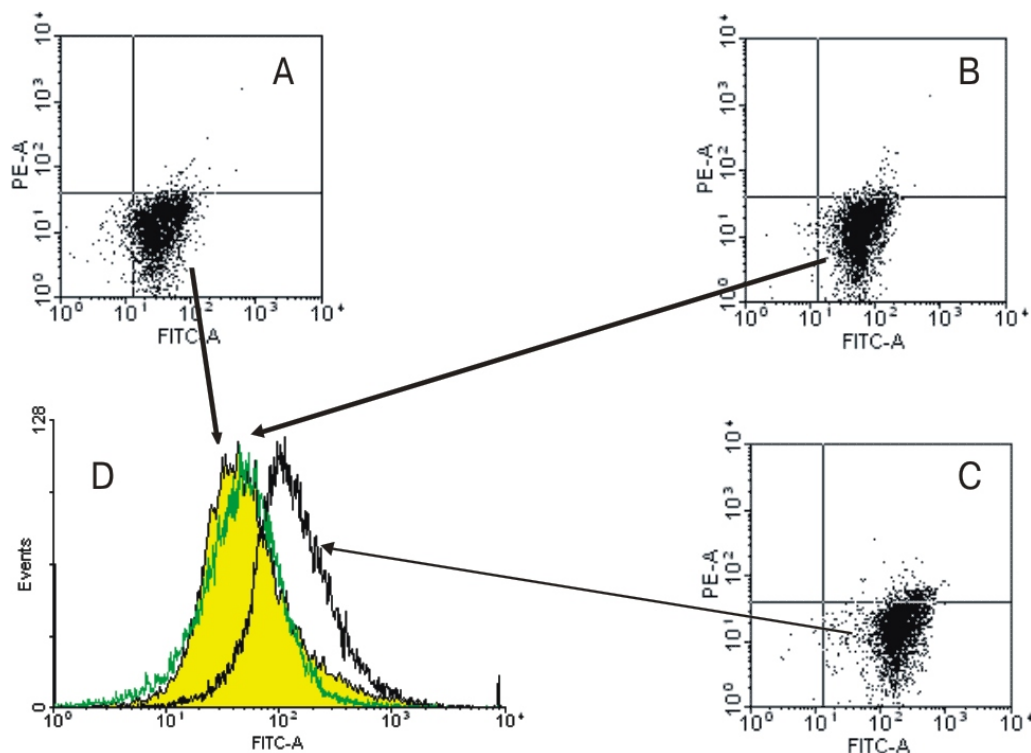


Рис. 5. Экспрессия белка теплового шока DNAJC15/MCJ в нейтрофилах периферической крови. Представлены данные проточной цитометрии по экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах крови здорового донора (A), больного с atopическим дерматитом без установленной бактериальной контаминации кожи (B), больного atopическим дерматитом с верифицированной бактериальной контаминацией кожи. Гистограммы экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах (D).

Экспрессия белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах

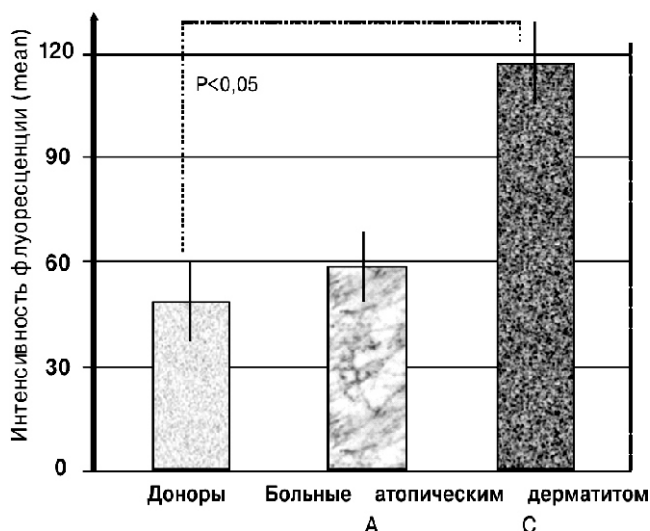


Рис. 6. Интенсивность флуоресценции белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах периферической крови доноров и больных с atopическим дерматитом в зависимости от бактериальной контаминации кожи. Представлены данные проточной цитометрии по экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах крови здоровых доноров (n = 32) и больных с atopическим дерматитом (A) без установленной бактериальной контаминации кожи (n = 27) и (C) с верифицированной бактериальной контаминацией кожи (n = 41).

Апоптоз нейтрофилов

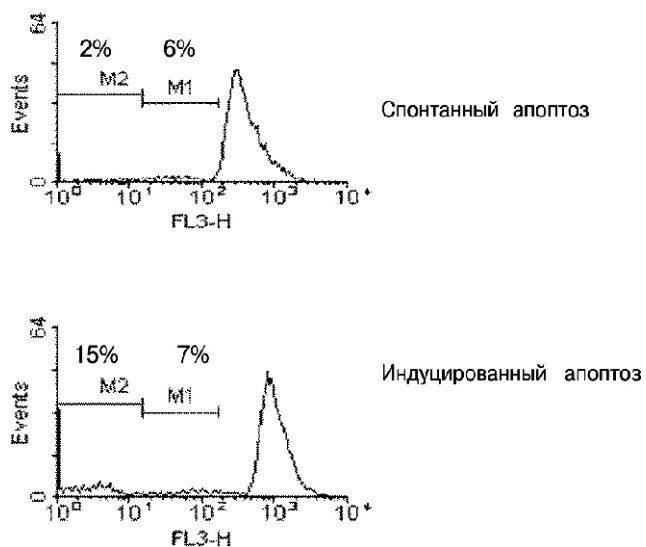


Рис. 7. Примеры апоптоза нейтрофилов. Правый (диплоидный) пик соответствует живым клеткам. Слева от диплоидного пика курсором M1 обозначен пик, отражающий уровень апоптоза. Крайний левый пик, обозначенный курсором M2, отражает уровень распавшихся в результате некроза клеток.

Уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов составлял $5 \pm 3\%$ у доноров и $7 \pm 4\%$ у больных с АД. Обработка фракционированных нейтрофилов С2-церамидом вызвала гибель $21 \pm 6\%$ нейтрофилов доноров и $38 \pm 5\%$ нейтрофилов больных с АД. У больных с АД с верифицированной методом ПЦР бактериальной контаминацией уровень индуцированной гибели нейтрофилов был статистически значим ($29 \pm 5\%$ против $44 \pm 5\%$), при этом большая часть нейтрофилов больных АД с бактериальной инфекцией кожи распадалась в результате некроза. Полученные данные указывают на связь между экспрессией митохондриального репрессора — молекулярного шаперона DNAJC15/MCJ, с нарушениями метаболизма клеток крови при atopическом дерматите.

Выводы

1. У больных atopическим дерматитом повышена экспрессия молекулярного шаперона DNAJC15/MCJ в CD8+ цитотоксических лимфоцитах периферической крови по сравнению со здоровыми донорами.
2. При наличии бактериальной контаминации кожи выявлено статистически значимое увеличение экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах больных АД.
3. Экспрессия белка DNAJC15/MCJ взаимосвязана с чувствительностью нейтрофилов к индукторам апоптоза.

References

1. 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. *Russian J. Skin Ven. Diseases*, 2016, (1): 53-57. (in Russian)
2. HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee), Available at www.genenames.org/genefamilies/HSP#HSP40.
3. Hatle K., Gummadidala P., Navasa N., Bernardo E., Dodge J., Silverstrim B. et al. MCJ/DnaJC15, an endogenous mitochondrial repressor of the respiratory chain that controls metabolic alterations. *Mol. Cell. Biol.*, 2013, 33(11): 2302-14.
4. Feng P., Lin H., Chen W., Zuo Y. Predicting the types of J-proteins using clustered amino acids. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 2014: 935719.
5. Zhao Q., Wang J., Levichkin I., Stasinopoulos S., Ryan M., Hoogenraad N. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.*, 2002, 21(17): 4411-9.

6. Sinha D., D'Silva P. Chaperoning mitochondrial permeability transition: regulation of transition pore complex by a J-protein DnaJC15. *Cell. Death Dis.*, 2014, 5: e1101.

7. Sinha D., Srivastava S., Krishna L., D'Silva P. Unraveling the intricate organization of mammalian mitochondrial presequence translocases: existence of multiple translocases for maintenance of mitochondrial function. *Mol. Cell. Biol.*, 2014, 34(10): 1757-75.

8. Schusdziarra C., Blanowska M., Azem A., Hell K. Methylation-controlled J-protein MCJ acts in the import of proteins into human mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22(7): 1348-57.

9. Hijnen D., Knol E., Gent Y., Giovannone B., Beijin S., Kupper T. et al. CD8+ T cells in the lesional skin of atopical dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- γ , IL-13, IL-17, and IL-22. *J. Invest. Dermatol.* 2013, 133(4): 973-9.

10. Navasa N., Martin-Ruiz I., Atondo E., Sutherland J., Pascual-Itoiz M., Carreras-Gonzalez A. et al. Ikaros mediates the DNA methylation-independent silencing of MCJ/DNAJC15 gene expression in macrophages. *Sci. Rep.* 2015, 5(1): 4692-9.

11. Navasa N., Martin I., Iglesias-Pedraz J., Beraza N., Atondo E., Izadi H. et al. Regulation of oxidative stress by methylation-controlled J protein controls macrophage responses to inflammatory insults. *J. Infect. Dis.* 2015, 211(1):135-45.

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

13. 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 protocols. A guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press, 1990; 315-24.

14. 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): E271-277.

15. Kandalova O.V., Taratutina N.V., Martinova E.A. Spontaneous and ceramide-induced apoptosis in the skin cells obtained from patients with atopical dermatitis, eczema, and psoriasis, compared with donors. *Pathogenesis*. 2012, 10(4): 60-5. (in Russian)

16. Zhang B., Lyu J., Liu H., Feng D., Zhang D., Bi X. et al. Attenuation of peripheral regulatory T-cell suppression of skin-homing CD8+T cells in atopical dermatitis. *Yonsei. Med. J.* 2015, 56(1): 196-203.

17. Ahmed K., Wang L., Griebel P., Mousseau D., Xiang J. Differential expression of mannose-6-phosphate receptor regulates T cell contraction. *J. Leukoc. Biol.* 2015, 98(3): 313-8.

18. Barnes P. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens. *Clin. Exp. Allergy*. 2009; 39(8): 1145-51.

19. Elistratova I.V., Morozov S.G., Zakharova I.A., Tarasova M.V. Peripheral blood cells luminol-dependent chemiluminescence at the different stages of atopical dermatitis. *Path. Physiol. Exp. Therapy*. 2015, 59(4): 35-40. (in Russian)

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 кафедры химии и биотехнологии ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, институт «Торгово-экономический университет»

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

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

Бажанова Е.Д.¹, Козлова Ю.О.¹, Анисимов В.Н.², Суханов Д.С.³, Теплый Д.Л.⁴

Пути апоптоза нейронов и функциональные возможности коры головного мозга при старении — роль некоторых препаратов (ангиоген, цитофлавин, пирацетам)

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН», 194223, Санкт-Петербург

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург

³ — «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», 191015, Санкт-Петербург

⁴ — Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Астраханский государственный университет», 414056, Астрахань

Цель исследования — изучение механизма апоптоза нейронов сенсомоторной коры головного мозга при старении и связанных со структурными изменениями нарушений функции коры, исследование роли экзогенных нейрометаболитов (сукцинат-содержащих препаратов «ангиоген» и «цитофлавин» и ноотропного препарата «пирацетам») в регуляции гибели нейронов у старых животных. **Методика.** Исследованы молодые и старые трансгенные мыши HER2/peu (ускоренно стареющие мыши), контроль — мыши дикого типа FVB. Определяли уровень апоптоза нейронов сенсомоторной зоны коры головного мозга (TUNEL), экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2, Mcl-1 и проапоптотических белков caspase-3, p53 (Western blotting). **Результаты и обсуждение.** Выявлено, что «ангиоген», «цитофлавин», «пирацетам» оказывают выраженный нейропротективный эффект на нейроны сенсомоторной коры старых мышей разных генетических линий (FVB, HER2). Изученные препараты участвуют в регуляции апоптоза нейронов, воздействуя на p53-зависимый сигнальный путь апоптоза, с активацией caspase-3. Участие этих препаратов в регуляции апоптоза нейронов зависит от различного морфофункционального и биохимического статуса клеток, что определяется генетической линией — сверхэкспрессия HER2 значительно изменяет протекание биохимических процессов и активацию сигнальных каскадов в клетках.

Ключевые слова: ангиоген; цитофлавин; пирацетам; апоптоз; старение; нейроны; сенсомоторная кора; трансгенные мыши HER2/peu.

Для цитирования: Бажанова Е.Д., Козлова Ю.О., Анисимов В.Н., Суханов Д.С., Теплый Д.Л. Пути апоптоза нейронов и функциональные возможности коры головного мозга при старении — роль некоторых препаратов (ангиоген, цитофлавин, пирацетам). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 13–19.

Для корреспонденции: Бажанова Елена Давыдовна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. сравнительной биохимии клеточных функций, ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук», e-mail: bazhanovae@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.02.16

Bazhanova E.D.¹, Kozlova Yu.O.¹, Anisimov V.N.², Sukhanov D.S.³, Teply D.L.⁴

Pathways of neuronal apoptosis and functionality of the brain cortex during aging — the role of some drugs (angiogen, cytoflavin, piracetam)

¹ — Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, 194223, St.-Petersburg, Russia

² — N.N. Petrov Research Institute of Oncology, 197758, St.-Petersburg, Russia

³ — Northwestern State Medical Mechnikov University, 191015, St.-Petersburg, Russia

⁴ — Astrakhan State University, 414056, Astrakhan, Russia

Decrease of cognitive capabilities, behavior change in aging is associated with age-dependent loss of brain neurons. An important issue in this situation is creation of a new therapeutic strategy for neurodegeneration associated with aging. The aim of work was to investigate mechanism of neuronal apoptosis in brain sensorimotor cortex during aging and the dysfunction of cortex, which associated with structural changes, and to investigate role of exogenous neurometabolites (succinate-containing

drugs: angiogen and cytoflavin, nootropic drug piracetam) in the regulation of neuronal cell death in old animals. **Materials and methods.** We investigated young and old transgenic mice HER2/neu, control — wild-type mice FVB. We detected the neuron apoptosis levels in sensorimotor cortex (TUNEL), the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and pro-apoptotic protein caspase-3, p53 (Western blotting). **Results and discussion.** It was revealed that angiogen, cytoflavin, piracetam have marked neuroprotective effect on neurons of sensorimotor cortex of aged mice FVB and HER2. Studied products are involved in regulation of neuronal apoptosis by acting on p53 signaling pathway with caspase-3 activation. Involvement of these drugs in regulating of neuronal apoptosis depends on various morphofunctional and biochemical status of cells, as determined by genetic line — HER2 overexpression significantly alters biochemical processes and activation of signaling cascades in cells.

Keywords: angiogen; cytoflavin; piracetam; apoptosis; aging; neurons; sensorimotor cortex; transgenic mice HER2/neu.

For citation: Bazhanova E.D., Kozlova Yu.O., Anisimov V.N., Sukhanov D.S., Teply D.L. Pathways of neuronal apoptosis and functionality of the brain cortex during aging — the role of some drugs (angiogen, cytoflavin, piracetam). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 13–19. (in Russ).

For correspondence: Elena D. Bazhanova, Doctor of Biological Science, Leading Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Group Molecular mechanisms of neuronal function regulation, 194223, St. Petersburg, Russia. E-mail: bazhanovae@mail.ru

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

Funding. The study had not sponsorship.

Received 20.02.16

Введение

Старение — это закономерно наступающий этап онтогенеза, характеризующийся нарастающим расстройством функций организма и значительными структурными нарушениями в органах и тканях. Важной причиной морфологических изменений является апоптоз. В первую очередь это апоптоз клеток нервной системы, поскольку гибель нейронов приводит к морфофункциональным нарушениям и дисрегуляции нервной ткани и органов-мишеней. Характерным признаком старения является снижение когнитивных возможностей, памяти, изменение поведения [1]. Причиной этого, возможно, является показанное многими авторами увеличение количества нейронов, подвергшихся апоптозу, при этом возрастает синтез апоптоз-ассоциированных молекул, в том числе caspase-3 [2]. В настоящее время доказана роль оксидативного стресса в инициации и реализации нейродегенеративных изменений, в том числе связанных с возрастом [3, 4]. Таким образом, особое значение имеют все клеточные процессы и субстраты, связанные с кислородом, — биохимические каскады, обеспечивающие дыхание клетки, митохондриальная активность и т.д. Показано, что митохондриальная дисфункция играет ведущую роль в развитии возрастной патологии, нейродегенеративных состояний, в частности, апоптоза нейронов [1,5]. Актуальным вопросом в такой ситуации является создание новой терапевтической стратегии для связанных со старением нейродегенеративных процессов.

Целью исследования было изучение сигнальных каскадов апоптоза нейронов коры головного мозга при старении и связанные со структурными изменениями возраст-зависимые нарушения функции коры, а также исследование роли экзогенных нейрометаболитов (сукцинат-содержащих препаратов «ангиоген» и «цитофлавин» и ноотропного препарата «пирacetам») в регуляции гибели нейронов старых животных.

Методика

Эксперимент проведен на трансгенных мышцах HER2/neu (ускоренно стареющие мыши с повышенным уровнем канцерогенеза) молодых и старых (2 и 10 мес), полученных из Italian National Research Center for Aging, разведение поддерживается в НИИ онкологии им. Петрова (Санкт-Петербург), контроль — мыши дикого типа FVB (2 и 18 мес.). Препараты вводили ежедневно внутривентриально один раз в сутки в течение 10 дней в следующих дозах: ангиоген и цитофлавин по 1,4 мл/кг, пирacetам — 5 мл/1 кг. Дозы препаратов рассчитывали, исходя из действующих терапевтических доз, контрольным животным каждой линии и каждого возраста водили соответствующий объем растворителя — 5% глюкозы.

Уровень апоптоза нейронов сенсомоторной зоны коры головного мозга определяли с помощью TUNEL (нерадиоактивное мечение биотином, выявление диаминобензидином) с использованием терминальной дезоксирибонуклеотидил-трансферазы для выяв-

ления разрывов ДНК (кит для TUNEL Sileks, Россия). Изображения срезов получены с помощью микроскопа PFM (WPI, USA) и цветной видеокамеры camera DIC-E (WPI, USA), Leica DFC 300 FX (Германия), разрешение 1392x1040 пикселей (увеличение x40). Для оценки интенсивности уровня апоптоза использовали программу VideoTest Software. Экспрессию апоптоз-ассоциированных молекул в нейронах коры выявляли методом Western blotting с антителами к антиапоптотическим белкам Bcl-2 и Mcl-1 (Abcam) и проапоптотическим белкам caspase-3 (Cell Signaling) и p53 (Abcam), с последующей денситометрией (ImageJ). В качестве контроля количества белка был сделан Western blotting с антителами к GAPDH (Abcam).

Для статистических расчетов использовали программу Microsoft Excel 2003 ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Ранее в наших экспериментах было показано, что для старых животных дикого типа характерно снижение локомоторной активности, исследовательского поведения, и повышение тревожности, по сравнению с молодыми животными (тест Открытое поле, Suok-тест). У мышей HER2 моторные функции и ориентировочно-исследовательское поведение были ниже по сравнению с диким типом, и не обнаружено изменений при старении. По своему психоэмоциональному статусу трансгенные мыши не показали значительных различий с животными дикого типа, включая возрастную динамику, молодые мыши были достаточно психологически устойчивы, и наблюдалось повышение напряжения вегетативной системы, тревожности на поздних этапах онтогенеза [6].

Ежедневное введение в течение 10 сут «ангиогена», «цитофлавина» и «пирацетама» улучшает локомоторные функции, психоэмоциональное состояние, снижает напряженность вегетативной системы, степень тревожности и устойчивость к стрессу. Механизмом подобного изменения функциональных возможностей может быть способность экзогенной янтарной кислоты (в нашем эксперименте это «ангиоген» и цитофлавин) усиливать насыщение тканей кислородом, что приводит к активации метаболизма в нейронах [5]. Так, ангиоген улучшает локомоторные функции животных, основную активность и ориентационно-исследовательское поведение во всех изученных группах (мыши FVB, HER2, молодые и старые). Кроме того, ангиоген улучшает поведенческую активность, регистрируемую в Suok-тесте, у трансгенных мышей обоих возрастов. Цитофлавин и пирацетам также оказывают позитивное действие на поведенческую активность и ориентационно-исследова-

тельское поведение, но в более ограниченном объеме — только у старых мышей FVB (цитофлавин) или трансгенных мышей HER2 с повышенным канцерогенезом (пирацетам). Цитофлавин повышает основную активность у старых мышей FVB, а пирацетам — у старых мышей HER2. Кроме того, выявлено, что цитофлавин несколько снижает основную активность у старых, а пирацетам у молодых трансгенных животных, ангиоген и пирацетам снижают поведенческую активность у мышей FVB обоих возрастов, а цитофлавин — у молодых мышей FVB [6].

Причиной изменения функциональной активности коры головного мозга могут быть морфологические изменения нейронов, связанные со старением. У молодых мышей обеих линий количество гибнущих нейронов сенсомоторной коры было незначительным (рис. 1). При старении наблюдается повышение уровня апоптоза у мышей дикого типа, но не у трансгенных животных. Введение ангиогена снижает возраст-зависимый апоптоз у старых мышей FVB при некотором повышении его в группе молодых животных; у трансгенных мышей ангиоген индуцирует клеточную гибель независимо от возраста, что имеет позитивное клиническое значение, поскольку низкий уровень апоптоза у данной линии мышей приводит к канцерогенезу. Цитофлавин также несколько повышает уровень апоптоза нейронов у молодых и снижает его у старых мышей дикого типа, при этом индуцирует апоптоз у старых мышей HER2. По данным литературы, введение дериватов янтарной кислоты предупреждает потерю нейронов и астроцитов коры мозга и паравентрикулярного ядра, оказывая нейропротективный эффект [7]. Вероятно, входящая в состав цитофлавина и ангиогена янтарная кислота стабилизирует тканевое дыхание, улучшая метаболизм нейронов [8]. Пирацетам не влияет на клеточную гибель нейронов у молодых мышей дикого типа, действуя аналогично ангиогену у старых мышей дикого типа (ингибирование) и у мышей HER2 обоих возрастов (индукция). По некоторым данным, пирацетам стабилизирует мембраны митохондрий и, таким образом, улучшает синтез АТФ [9]. Ингибирующее действие препаратов на уровень апоптоза у старых мышей FVB является положительным эффектом, поскольку снижается риск возраст-зависимой нейродегенерации (рис. 1). Данные, полученные в нашем эксперименте, указывают на то, что участие изученных препаратов в регуляции апоптоза нейронов зависит от различного морфофункционального и биохимического статуса клеток, что определяется генетической линией — сверхэкспрессия HER2 значительно изменяет протекание биохимических процессов и активацию сигнальных каскадов в клетках.

Данные литературы, свидетельствующие о влиянии изучаемых метаболитов на регуляцию апоптоза, крайне немногочисленны. В нашем эксперименте показано, что у мышей дикого типа при старении происходит индукция апоптоза нейронов коры головного мозга посредством внешнерецепторного пути с активацией CD95 (Fas) и, далее, caspase-8. Эти результаты подтверждаются и другими авторами. Так, ранее показано, что уровень Fas и FasL возрастает при старении [10], кроме того, есть данные, что стареющие эндотелиальные клетки подвергаются TNF- α -опосредованной клеточной смерти, при этом выявлена сверхэкспрессия FAS-рецептора [11]. Митохондриальная дисфункция, наблюдаемая при старении, вызывает потерю нейронов путем апоптоза через TNF-зависимый путь, с активацией caspase-8 [12].

У молодых трансгенных животных низкий уровень экспрессии данных проапоптотических белков не изменяется при старении, что соответствует динамике апоптоза нейронов [6]. Ранее мы показали, что введение ангиогена, цитофлавина и пирацетама приводит к сверхэкспрессии CD95 и caspase-8 в нейронах сенсомоторной коры головного мозга молодых мышей FVB, при этом при действии первых 2 препаратов наблюдается индукция апоптоза нейронов [6, 13]. Не обнаружено изменений в уровне синтеза caspase-8

в коре старых мышей FVB, хотя экспрессия CD95 повышается после инъекций ангиогена и цитофлавина. Активация внешнерецепторного пути показана у старых трансгенных животных, получавших ангиоген и цитофлавин, а у молодых — после введения всех препаратов.

Как известно, проапоптотический белок p53 активирует апоптоз при повреждении ДНК, что определяет его роль в инициации клеточной гибели при старении. Зависимость клеточного контроля стабильности генома от p53 была впервые показана в опытах по индукции генной амплификации супрессорами p53 [14]. В реализации клеточной смерти по p53-зависимому каскаду участвует также эффекторная caspase-3, в связи с чем изменения синтеза данных белков в эксперименте будут рассмотрены вместе. Синтез p53 в нейронах коры молодых и старых мышей обеих линий невысок, как и caspase-3. Исключение представляет группа старых мышей FVB, у которых наблюдается значительное повышение синтеза caspase-3, что соответствует повышенному уровню апоптоза (рис. 1).

Обнаружено, что ангиоген, цитофлавин и пирацетам активируют апоптоз нейронов коры по p53-зависимому пути, с активацией caspase-3, во всех группах исследуемых животных. Повышение уровня апоптоза

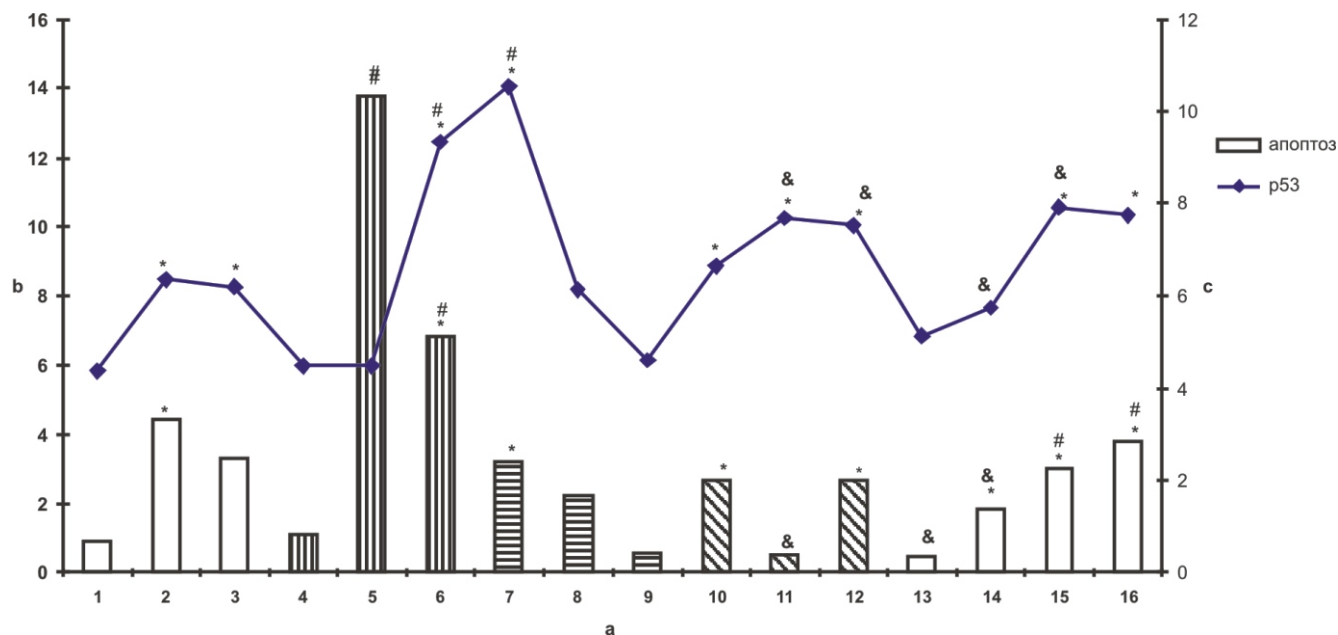


Рис. 1. Влияние препаратов ангиоген, цитофлавин и пирацетам на уровень апоптоза и экспрессию p53 в сенсомоторной зоне коры головного мозга у мышей дикого типа (линия FVB) и трансгенных мышей HER2 разного возраста:

ось a — группы экспериментальных животных, ось b — уровень апоптоза, усл.ед., ось c — экспрессия p53, оптическая плотность, усл. ед.; * — статистически значимые различия по сравнению с контрольными животными того же возраста; # — значимость по сравнению с молодыми животными той же группы; & — значимость различий по сравнению с аналогичной группой FVB; к — контроль, ц — группа животных, получавших цитофлавин, п — группа животных, получавших пирацетам, м — молодые мыши, с — старые мыши; 1 — кFBVm, 2 — аFBVm, 3 — цFBVm, 4 — пFBVm, 5 — кFBVc, 6 — аFBVc, 7 — цFBVm, 8 — пFBVm, 9 — кHER2м, 10 — аHER2м, 11 — цHER2м, 12 — пHER2м, 13 — кHER2с, 14 — аHER2с, 15 — цHER2с, 16 — пHER2с.

у молодых мышей FVB было незначительным, в отличие от группы старых животных. Исключение представляет группа молодых мышей дикого типа, получавших пирацетам, и группа молодых трансгенных мышей, получавших цитофлавин, где не было обнаружено повышения уровня апоптоза нейронов (рис. 1, 2). При введении изучаемых препаратов наблюдается сверхэкспрессия *p53* и *caspase-3*, что сопровождается увеличе-

нием доли нейронов, подвергшихся апоптозу, в сенсомоторной коре головного мозга. Нужно отметить, что пирацетам действовал наименее эффективно у мышей дикого типа (рис. 1, 2).

Была изучена экспрессия антиапоптотических белков *Mcl-1* и *Bcl-2*, обеспечивающих клеточное выживание [15, 16]. У мышей обеих линий синтез *Mcl-1* и *Bcl-2* в нейронах коры невисок, независимо от воз-

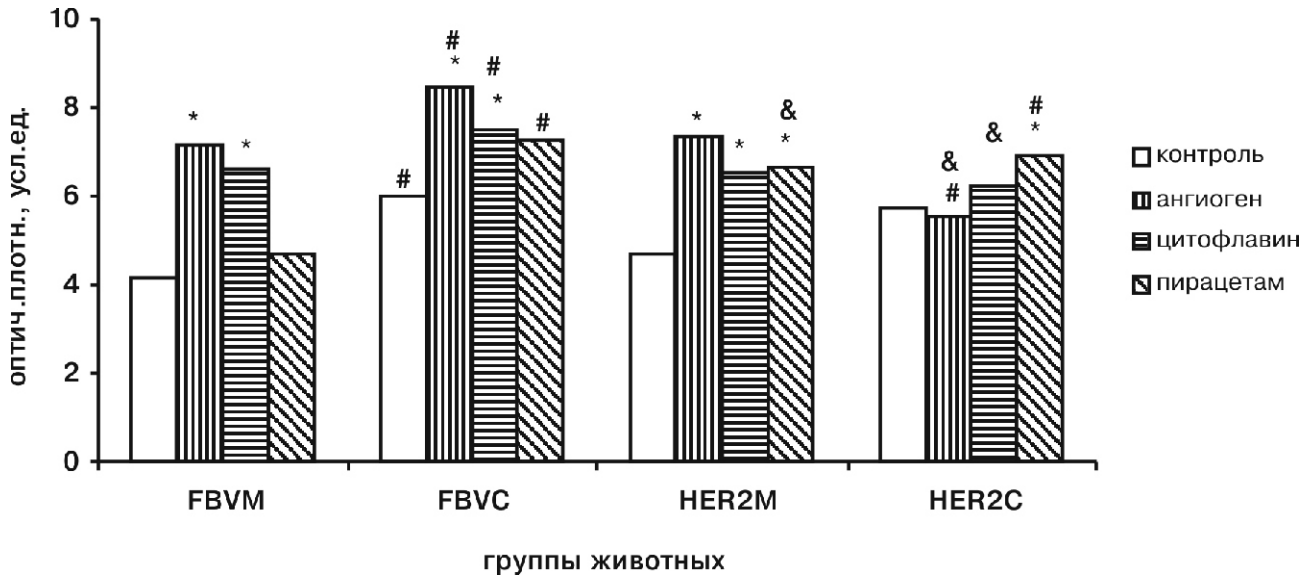


Рис. 2. Влияние препаратов ангиоген, цитофлавин и пирацетам на экспрессию *caspase-3* в нейронах сенсомоторной зоны коры головного мозга у мышей дикого типа (линия FVB) и трансгенных мышей HER2 разного возраста: ось а — группы экспериментальных животных, ось b — оптическая плотность, далее см. обозначения к рис. 1.

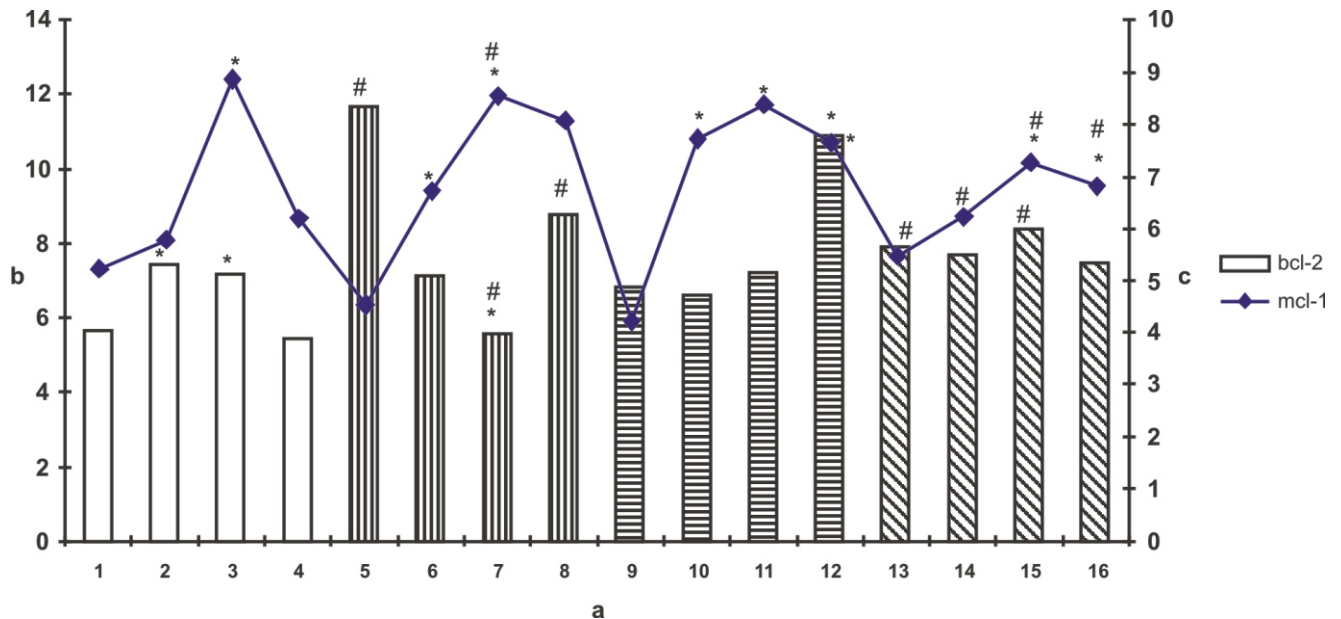


Рис. 3. Влияние препаратов ангиоген, цитофлавин и пирацетам на экспрессию *Mcl-1* и *Bcl-2* в нейронах сенсомоторной зоны коры головного мозга у мышей дикого типа (линия FVB) и трансгенных мышей HER2 разного возраста: ось а — группы экспериментальных животных, ось b — экспрессия *Bcl-2*, оптическая плотность, усл.ед., ось с — экспрессия *Mcl-1*, оптическая плотность, усл.ед.; далее см. обозначения к рис. 1.

раста. Данные об экспрессии этих белков при старении противоречивы, отдельные авторы сообщают о снижении экспрессии Mcl-1 [16] и Bcl-2 при старении [17]. Только в одной группе — у мышей дикого типа наблюдается повышение синтеза Bcl-2 при старении, что, вероятно, обусловлено интенсификацией нейронального апоптоза. В данном эксперименте наблюдалось усиление экспрессии Mcl-1 в группах животных, получавших цитофлавин (все группы), ангиоген и пирарцетам во всех группах мышей, кроме молодых мышей дикого типа. Экспрессия Bcl-2 не коррелирует однозначно с уровнем клеточной гибели. Так, сверхэкспрессия Bcl-2 отмечена в группах молодых мышей FVB, получавших ангиоген и цитофлавин, и в группе молодых мышей HER2, получавших пирарцетам, возможно, как реакция на интенсификацию апоптоза. Нет изменений в синтезе Bcl-2 в нейронах старых мышей HER2, возможно, это способствует повышению уровня апоптоза нейронов при действии изучаемых нейрометаболитов. Снижение экспрессии Bcl-2 наблюдается у старых мышей FVB при введении всех изученных препаратов (рис. 3), однако действие Mcl-1 достаточно сильно для супрессии апоптотических процессов в коре головного мозга старых мышей дикого типа.

Таким образом, изученные нейрометаболиты (ангиоген, цитофлавин, пирарцетам) оказывают выраженный нейропротективный эффект на нейроны сенсомоторной коры старых мышей разных генетических линий (FVB, HER2). Данные препараты участвуют в регуляции апоптоза нейронов, воздействуя на внешнерецепторный и p53-зависимый сигнальные пути апоптоза, а также на каспазный каскад (caspase-8, -3). Можно отметить, что антиапоптотический белок Mcl-1 принимает более активное участие в подавлении апоптоза нейронов, чем Bcl-2, уровень синтеза которого не коррелирует с динамикой апоптоза нейронов в различных группах животных.

References

1. Xia W.W., Zheng X., Pan Q., Wei H.P., Ruan D.H., Wang H. et al. The distribution of caspase-3 positive apoptotic cells in 18 months old SD rat's brainstem compared with that in 3 months rat. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2014; 45(6); 928-32.
2. Volchegorskii I.A., Rassokhina L.M., Miroshnichenko I.Y. Cerebroprotective effects of emoxipin, reamberin, and mexidol in alloxan diabetes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 155(1); 56-64. (in Russian)

3. Lana D., Melani A., Pugliese A.M., Cipriani S., Nosi D., Pedata F. et al. The neuron-astrocyte-microglia triad in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion: protective effect of dipyrindamole. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6; 322; 1-17.

4. Yang W.P., Xu Y., Guo W.W., Liu H.Z., Hu B.H. Modulation of Mcl-1 expression reduces age-related cochlear degeneration. *Neurobiol. of Aging.* 2013; 34(11); 2647-58.

5. Leuner K., Schulz K., Schutt T., Pantel J., Prvulovic D., Rhein V. et al. Peripheral mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: focus on lymphocytes. *Molecular Neurobiol.* 2012; 46; 194-204.

6. Bazhanova E.D., Anisimov V.N., Sukhanov D.S., Teply D.L. Comparative study of influence of drugs that improve brain metabolism (angiogen, cytoflavin) on neuron apoptosis and function of cerebral cortex during aging in experiment. *Exp. Clin. Pharmacol.* 2015; 78(2); 58-64. (in Russian)

7. Tang X.L., Liu J.X., Li P., Dong W., Li L., Zheng Y.Q. et al. Protective effect of succinic acid on primary cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation injury. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2013; 21; 3742-6.

8. Kamppa N., Makela K.M., Lyytikainen L.P., Peltonen N., Hautamaki J., Seppala I. et al. Vascular cell adhesion molecule 1, soluble Fas and hepatocyte growth factor as predictors of mortality in nonagenarians: the Vitality 90+ study. *Exp. Gerontol.* 2013; 48(11); 1167-72.

9. Doll D.N., Rellick S.L., Barr T.L., Ren X., Simpkins J.W. Rapid mitochondrial dysfunction mediates TNF-alpha-induced neurotoxicity. *J. Neurochemistry.* 2015; 132(4); 443-51.

10. Podda M.V., Leone L., Barbati S.A., Mastrodonato A., Li Puma D.D., Piacentini R. et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields enhance the survival of newborn neurons in the mouse hippocampus. *European J. Neuroscience.* 2014; 39(6); 893-903.

11. Dorszewska J. Cell biology of normal brain aging: synaptic plasticity-cell death. *Aging Clinical and Experimental Research.* 2013; 25(1); 25-34.

12. Calvo M., Sanz-Blasco S., Caballero E., Villalobos C., Nunez L. Susceptibility to excitotoxicity in aged hippocampal cultures and neuroprotection by non-steroidal anti-inflammatory drugs: role of mitochondrial calcium. *J. Neurochemistry.* 2015; 132(4); 403-17.

13. Bazhanova E.D., Kozlova Yu.O., Anisimov V.N., Sukhanov D.S., Teply D.L. Influence of cytoflavin and piracetam on neuron apoptosis of sensomotor cortex and locomotor and psychoemotional status in aged mice. *J. Evol. Bioch. Physiol.* 2016; 52(1); 58-66.

14. Yin Y., Tainsky M.A., Bischoff F.Z., Strong L.C., Wahl G.M. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell.* 1992; 709(6); 937-48.

15. Jeon H., Boo Y.C. Senescent endothelial cells are prone to TNF-alpha-induced cell death due to expression of FAS receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2013; 438(2); 277-82.

16. Lazarev V.V., Khelimskaia I.A., Tsypin L.E., Mikhail'son V.A., Popova T.G. Oxygenation state of brain in children upon reamberin infusion during post-anesthesia recovery. *Eksp. Klin. Farmakol.* 2012; 75(2); 38-41.

17. Choi M.S., Nakamura T., Cho S.J., Han X.3., Holland E.A., Qu J. et al. Transnitrosylation from DJ-1 to PTEN attenuates neuronal cell death in parkinson's disease models. *J. Neurosci.* 2014; 34(45); 15123-31.

Сведения об авторах:

Козлова Юлия Олеговна, аспирант ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук

Анисимов Владимир Николаевич, доктор биол. наук, проф., член-кор. РАН, зав. лаб. канцерогенеза и старения ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России

Суханов Дмитрий Сергеевич, доктор мед. наук, доцент каф. фтизиопульмонологии и торакальной хирургии «Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова»

Теплый Давид Львович, доктор биол. наук, акад. РАЕН, проф., зав. каф. физиологии и морфологии человека и животных «Астраханского государственного университета»

Шурыгина Л.В., Злищева Э.И., Кравцов А.А., Полецук Л.А., Абрамова Н.О.

Влияние комената калия на антиоксидантную глутатионовую систему головного мозга стрессированных мышей

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Отдел биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, 350040, г.Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149

Цель исследования. Изучение влияния комената калия на содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в головном мозге мышей при иммобилизационном стрессовом воздействии. **Методика.** Эксперименты выполнены на 62 белых беспородных мышцах-самцах массой 23—25 г. Иммобилизационный стресс у мышей вызывали путем подвешивания их за шейную складку в течение пяти часов. Через 5 ч мышей декапитировали, головной мозг помещали в жидкий азот и затем в ткани мозга определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность ферментов: глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР). Коменат калия вводили в дозах 2, 4 и 8 мг/кг массы тела внутривентрикулярно через зонд, до стрессирования, натощак, в течение трёх сут. Животные были разделены на 4 группы: 1-я — контроль, 2-я — получавшие коменат калия, 3-я — стрессированные и 4-я — стрессированные, получавшие коменат калия. **Результаты.** Установлено, что применение комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг способствует сохранению активности ГПО, ГР и содержания GSH в мозге стрессированных мышей на уровне интактного контроля. То есть, наблюдается поддержание ресурса антиоксидантной глутатионовой системы на уровне физиологической нормы, что свидетельствует о выраженной антиоксидантной, стресспротекторной активности комената калия. Доза 2 мг/кг способствовала поддержанию содержания GSH на уровне физиологической нормы, но на активность ГР и ГПО существенного влияния не оказала. **Заключение.** Профилактическое (до стресса) применение комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг сохраняет активность ферментов ГПО, ГР и содержание GSH в головном мозге стрессированных мышей на уровне физиологической нормы, что свидетельствует о его антиоксидантной, стресспротекторной активности.

Ключевые слова: коменат калия, мыши, окислительный стресс, головной мозг, GSH, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза

Для корреспонденции: Шурыгина Людмила Васильевна, канд. сельхоз. наук, ст. науч. сотр., зав. отделом биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», www.kubsu.ru, e-mail: baliz-farm@mail.ru

Для цитирования: Шурыгина Л.В., Злищева Э.И., Кравцов А.А., Полецук Л.А., Абрамова Н.О. Влияние комената калия на антиоксидантную глутатионовую систему головного мозга стрессированных мышей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 20—23.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (государственное задание, проект № 847).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила 15.08.15

Shurygina L.V., Zlischeva E.I., Kravtsov A.A., Poleschuk L.A., Abramova N.O.

Effect of potassium comenate on antioxidant glutathione system in brain of stressed mice

Kuban State University, A.Ya. Shurygin Department of biologically active substances, Russia, 350040, Krasnodar, Stavropolskaya st., 149

The purpose. This work is devoted to study of potassium comenate influence on the content of reduced glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in the brain of mice exposed to immobilization stress. **Methods.** The experiments were performed on 62 white mongrel male mice weighing 23—25 g. Immobilization stress in mice was induced by suspending them for cervical crease for five hours. After 5 hours the mice were decapitated, the brain was placed in liquid nitrogen and then in the brain tissue was determined by the content of reduced glutathione (GSH), the activity of glutathione peroxidase (GPO) and glutathione reductase (GR). Potassium comenate was administered intragastrically (gavage) in doses of 2, 4 and 8 mg/kg body weight, before of stressing, fasting for three days, once per day. The animals were divided into groups: control; treated with potassium comenate; stressed; stressed treated with potassium comenate. **Results.** It is found that the use of potassium comenate at doses of 4 and 8 mg / kg contributes to maintaining, GPO and GR activ-

ity and GSH content in the brain of stressed mice to intact control levels. That is, there is the maintenance of the resource of the antioxidant glutathione system at the level of the physiological norm, indicating a pronounced antioxidant, stress-protective activity of potassium comenate. The dose of 2 mg / kg contributed to keeping the content of GSH at the physiological norm, but the activity of the GR and GPO had no significant effect. **Conclusion.** Prestress application of potassium comenate in doses of 4 and 8 mg / kg retains GR and GPO activity and GSH content in the brain of stressed mice at physiological norm that indicates its antioxidant, stress-protective activity.

Keywords: potassium comenate, mice, oxidative stress, brain, GSH, glutathione peroxidase, glutathione reductase.

For citation: Shurygina L.V., Zlischeva E.I., Kravtsov A.A., Poleshchuk L.A., Abramova N.O. Effect of potassium comenate on antioxidant glutathione system in brain of stressed mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 20–23. (in Russ).

For correspondence: Shurygina Lyudmila Vasil'evna, e-mail: balizfarm@mail.ru

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

Funding. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (state assignment, project number 847).

Received 15.08.15

Введение

Окислительный стресс играет важную роль в развитии нейродегенеративных процессов, наблюдающихся при инсультах, черепно-мозговых травмах и других патологиях головного мозга [1]. Развитие окислительного стресса характеризуется гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), возрастанием интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также нарушением функционального состояния антиоксидантных защитных систем [2]. В соответствии с этим для успешной терапии патологических состояний головного мозга, развитие которых связано с окислительным стрессом, актуален поиск и применение лекарственных средств, препятствующих накоплению радикалов и поддерживающих собственную антиоксидантную систему организма, способную защитить мозговую ткань от повреждения [3].

Коменовая (5-гидрокси- γ -пирон-2-карбоновая) кислота — основной физиологически активный компонент высокоэффективного лекарственного препарата бализ-2 — обладает антиоксидантной активностью, оказывает выраженное ростстимулирующее действие на культивируемые нейроны коры головного мозга, снижает гибель нейронов при глутаматной нейротоксичности, одном из ключевых факторов развития ишемических состояний и нейродегенеративных заболеваний [4, 5].

Ввиду того, что биологическая активность производных коеновой кислоты может в значительной степени отличаться, а по некоторым параметрам и превосходить действие коеновой кислоты [6], представляется целесообразным исследование их биологических свойств, в том числе, антиоксидантных и нейропротекторных. Ранее нами была установлена высокая антиоксидантная активность коената калия *in vitro* в модельной системе, генерирующей радикалы

[7]. Известно, что влияние различных негативных факторов, в том числе физическая нагрузка, стресс, сопровождается повышенным образованием свободных радикалов, а также нарушением антиоксидантной защиты в ткани головного мозга [2].

Целью работы было исследование влияния коената калия на содержание восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в головном мозге мышей при иммобилизационном стрессе.

Методика

Коенат калия синтезирован в отделе биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет» (патент РФ № 2514632, опубл. 27.04.2014), препарат представляет собой кристаллический порошок желтого цвета, растворим в воде и спирте, молекулярная масса — 194.18.

Эксперименты выполнены на 62 белых беспородных мышах-самцах массой 23—25 г, полученных из питомника «Столбовая». Животных содержали в виварии при естественном освещении, свободном доступе к пище и воде в клетках размером 30 x 20 x 15 см. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики»).

Иммобилизационный стресс у мышей вызывали путем подвешивания их за шейную складку в течение 5 ч., после чего мышей декапитировали, головной мозг помещали в жидкий азот и затем в ткани мозга определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность ферментов: глутатионпероксида-

зы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР). Водные растворы комената калия вводили мышам внутривентрикулярно, через зонд до стрессирования, натошак, 1 раз в сутки в течение трёх сут. Коменат калия вводили в дозах 2, 4 и 8 мг/кг массы тела, животные были разделены на 4 группы: 1-я — контроль, 2-я получавшие коменат калия, 3-я — стрессированные, 4-я — стрессированные, получавшие коменат калия.

Определение GSH (свободных небелковых сульфгидрильных групп) проводили в кислоторастворимом насадке после осаждения белков [8]. Активность ГПО определяли по скорости окисления GSH в присутствии гидроперекиси третичного бутила [9]. Активность ГР определяли по скорости окисления НАДФН в реакции, катализируемой ГР из супернатанта, во время инкубации с окисленным глутатионом [10].

Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программы Statistica 10. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение в группе, m — стандартная ошибка.

Результаты и обсуждение

Полученные данные представлены в таблице. Как видно из таблицы, коменат калия в дозах 4 и 8 мг/кг в отсутствие стрессового воздействия не оказывал влияния на содержание GSH и активность ГПО и ГР в головном мозге мышей. Незначительные изменения глутатионового обмена отмечались при применении комената калия в дозе 2 мг/кг.

Иммобилизационное стрессовое воздействие способствовало статистически значимому снижению уровня GSH и повышению активности ферментов ГПО и ГР. В тоже время после применения комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг в течение 3 сут до стрессирования в головном мозге мышей наблюдалось сохранение содержания

GSH и активности глутатионовых ферментов на уровне контрольных значений. Доза 2 мг/кг способствовала поддержанию содержания GSH на уровне физиологической нормы, но на активность ГР и ГПО существенного влияния не оказала.

Известно, что окислительный стресс сопровождается повышением содержания АФК и продуктов ПОЛ, а также истощением эндогенных антиоксидантов и нарушением ферментных систем защиты. Одно из основных мест в системах, обеспечивающих ингибирование образования радикалов кислорода и окисления липидов, отводят глутатиону и сопряжённым с ним ферментам [2, 11].

Наблюдаемое нами постстрессовое возрастание активности ГПО и ГР является физиологическим ответом организма на повышенную генерацию АФК и интенсификацию ПОЛ, предотвращающим чрезмерное развитие этих процессов. Снижение содержания восстановленного глутатиона свидетельствует, что скорость окисления GSH в результате взаимодействия с АФК и ферментами, использующими его в качестве донора при нейтрализации радикалов и для поддержания восстановительной силы других антиоксидантов, превышает скорость его восстановления, осуществляемого ГР. Таким образом, в ответ на стрессовое воздействие мы наблюдали, с одной стороны, повышение активности глутатионовых ферментов и, с другой стороны, снижение восстановительного ресурса антиоксидантной глутатионовой системы в виде падения уровня GSH.

Применение комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг способствует сохранению активности ГПО, ГР и содержания GSH в мозге стрессированных мышей на уровне интактного контроля, то есть, наблюдается поддержание ресурса антиоксидантной глутатионовой системы на уровне физиологической нормы, что свидетельствует о выраженной антиоксидантной, стресс-протекторной активности комената калия.

Таблица

Влияние комената калия на состояние глутатионовой системы в головном мозге мышей при стрессе

Группы животных	Содержание GSH, мкмоль/1 г белка	Активность ГПО, мкМ GSH/мин x1 г белка	Активность ГР, мкМ НАДФН/1 с x1 г белка
Контроль	1,98 ± 0,04	631 ± 10	1,30 ± 0,07
Коменат калия 2 мг/кг	1,92 ± 0,04	677 ± 54	1,45 ± 0,05
Коменат калия 4 мг/кг	1,89 ± 0,04	627 ± 23	1,27 ± 0,09
Коменат калия 8 мг/кг	2,07 ± 0,06	612 ± 24	1,18 ± 0,16
Стресс	1,79 ± 0,02***	741 ± 25***	1,57 ± 0,04**
Стресс, коменат калия 2 мг/кг	1,93 ± 0,02###	706 ± 25**	1,49 ± 0,05
Стресс, коменат калия 4 мг/кг	1,89 ± 0,04#	619 ± 21##	1,20 ± 0,06###
Стресс, коменат калия 8 мг/кг	2,04 ± 0,08###	619 ± 22#	1,24 ± 0,10##

Примечание. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ в сравнении с группой «контроль»; # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$, ### — $p < 0,001$ в сравнении с группой «стресс».

Все вышеизложенное, а также полученные нами ранее данные о статистически значимо более высоком в сравнении с коленовой кислотой нейропротекторном действии комената калия при глутаматной цитотоксичности [6], указывают на перспективность проведения дальнейших исследований комената калия как антиоксидантного, стресс- и нейропротекторного средства.

Таким образом, дострессовое применение комената калия в дозах 4 и 8 мг/кг оказывает протекторное действие на антиоксидантный глутатионовый обмен в головном мозге стрессированных животных, сохраняет активность ферментов ГПО, ГР и содержание GSH в головном мозге мышей на уровне физиологической нормы, что свидетельствует о её антиоксидантной, стресспротекторной активности.

References

1. Gusev E.I., Skvorcova V.I. *Brain ischemia*, Moscow: Meditsina; 2001. (in Russian)
2. Zozulja Yu.A., Baraboj V.A., Sutkovoij D.A. *Free radical oxidation and antioxidant protection in the pathology of the brain*, Moscow: Znanie; 2000. (in Russian)
3. Katunina E.A., Malyhina E.A., Kuznecov N.V. et al. The antioxidants in the complex therapy of Parkinson's disease. *Nevrologiya i Psikhatriya*. 2006; 9: 22-8. (in Russian)

4. Shurygin A.Ya. *The drug Baliz*. Krasnodar: Periodika Kubani; 2002. (in Russian)

5. Shurygin A.Ya., Kravtsov A.A., Skorokhod N.S. et al. Influence of comenic acid on cultured granule cells of cerebellum under glutamate neurotoxicity. in: *Materials of the III international scientific conference Traditional medicine: A current situation and perspectives of development*. 2008, August 18-22; Russia. Ulan-Ude. 2008: 73.

6. Shurygina L.V., Kravtsov A.A., Zlishheva E.I. et al. Neuroprotective effect of potassium comenate against glutamate toxicity on the model of cultured rat cerebellar neurons. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2014; 158(7): 56-9. (in Russian)

7. Kravtsov A.A., Shurygin A.Ya. A comparative study of antioxidant properties comenic acid and its salts. In: *Sbornik nauchnyh dokladov I Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Nauchno-tehnicheskoe tvorchestvo molodjozhi — put' k obshhestvu, osnovannomu na znanijah»*. Moscow; 2009. (in Russian)

8. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem*. 1968; 25(1): 192-205.

9. Moin V.M. A simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Laboratornoe Delo*. 1986; 12: 724-9. (in Russian)

10. Jusupova L.B. About increase accuracy of determining the erythrocyte glutathione reductase activity. *Laboratornoe Delo*. 1989; 4: 19-21. (in Russian)

11. Dickinson D.A., Forman H.J. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 2002; 64(5-6): 1019-26.

Сведения об авторах

Злищева Энна Ивановна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., вед. науч. сотр. отдела биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», e-mail: www.kubsu.ru, balizfarm@mail.ru

Кравцов Александр Анатольевич, канд. биол. наук, науч. сотр. отдела биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», e-mail: www.kubsu.ru, aakravtsov@mail.ru

Полещук Лариса Афанасьевна, науч. сотр. отдела биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», e-mail: www.kubsu.ru, balizfarm@mail.ru

Абрамова Наталья Олеговна, науч. сотр. отдела биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина, ФГБОУ ВО «КубГУ», e-mail: www.kubsu.ru, balizfarm@mail.ru

Игнатъева Г.А.¹, Корнилаева Г.В.², Мельникова Т.М.³, Сорокина Е.Г.⁴, Батенева Е.И.¹

Экспериментальное исследование индукции гуморального ответа на синтетический мультимерный пептидный антиген, потенциально имитирующий конформационный эпитоп нейтрализации ВИЧ-1

¹ — ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, Москва, Каширское ш., д. 24

² — ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18

³ — ФГБУ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., д. 47

⁴ — ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, Ломоносовский проспект, 2/62

Цель исследования — исследование возможности получения антител против линейного синтетического пептида, состоящего из повторов 3-аминокислотного эпитопа, потенциально имитирующего конформационный эпитоп нейтрализации ВИЧ-1 — NEQ (аспарагин, глутамин, глутамат). Наша авторская идея состояла в мультипликации такого 3-аминокислотного эпитопа в 15-аминокислотном линейном синтетическом пептиде (NEQ)₅. **Методика.** Пептид был синтезирован в компании Bioreptide Co. (USA). Степень очистки искомого продукта составляла 95%. Для создания иммуногенного препарата данный пептид ковалентно конъюгировали с высокомолекулярным пептидогликаном растительного происхождения ИммуномаксTM отечественного производства в качестве иммуoadъюванта. Сшивающим агентом служил реагент SMCC (сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат). Искомый продукт выделяли на колонке Zeba® Desalt Spin Columns. Полученным конъюгатом иммунизировали двухмесячных мышей-самок (СВА х С57Bl)F1. Иммунизацию производили трижды с интервалами в 30—45 сут. Все манипуляции с животными выполняли по стандартам SOP. Наличие антипептидных антител и их титр в сыворотках крови мышей оценивали методом ИФА. Оценивали также *in vivo* влияние внутрибрюшинного введения чистого адъюванта на транскрипцию информационной РНК первичного провоспалительного цитокина TNF в клетках перитонеального экссудата. Исследования проводили методом ПЦР в динамике, начиная с 30 мин до 48 ч после введения препарата. Взаимодействие полученных антипептидных антител с репликационно способным ВИЧ-1 оценивали в заражаемой культуре клеток MT4 по уровню вирусного белка p24 в супернатанте. Последний измеряли в указанные сроки методом ИФА в тест-системе «Вектор бест». **Результаты.** Пептид в чистом виде при введении *in vivo* мышам не индуцировал биосинтез антител в определяемых количествах. При иммунизации мышей конъюгатом пептида с ИммуномаксTM титры антипептидных антител составляли 10^{5–6}. ИммуномаксTM сам по себе при введении *in vivo* индуцировал транскрипцию иРНК TNF импульсно: в одном опыте в течении шестого часа, в другом — восьмого часа, без реактивации транскрипции в более поздние сроки. При добавлении антипептидной сыворотки в разведении 1/10 в культуру клеток MT4, инфицированных изолятом ВИЧ-1/ПВ, выявлена нейтрализация репликации вируса примерно на 90%. В больших разведениях эффект нейтрализации отсутствовал. Та же антипептидная сыворотка в отношении другого изолята ВИЧ-1/899 в культуре тех же клеток MT4 в разведении 1/20 усиливала репликацию вируса, что было воспроизведено в четырех повторных опытах. Реакции пептида с глутаматным рецептором мозга в ИФА тест-системе зарегистрировано не было. **Заключение.** Синтетический пептид — мультимер триплета (NEQ)₅, ковалентно конъюгированный с растительным пептидогликаном ИммуномаксTM в качестве адъюванта, индуцирует антительный ответ у мышей в титрах 10^{5–6}, по данным ИФА. Введение мышам чистого адъюванта в той же дозе индуцирует в клетках перитонеального экссудата импульсную транскрипцию иРНК первичного провоспалительного цитокина TNF в течение 6-го или 8-го часа после введения препарата. В культуре клеток MT4 антипептидная сыворотка в малых разведениях проявляла вирус-нейтрализующую активность в отношении изолята ВИЧ-1/ПВ, но усиливала репликацию в тех же клетках другого изолята ВИЧ-1/899. Такое расхождение результатов — нейтрализация вирусной инфекции или усиление инфекции — объясняет одну из трудностей при разработке анти-ВИЧ вакцин.

Ключевые слова: ВИЧ-1, синтетический пептидный антиген (NEQ)₅, иммуoadъювант ИммуномаксTM, ВИЧ-1/ПВ-нейтрализация, ВИЧ-1/899 усиление инфекции

Для корреспонденции: Игнатъева Галина Алексеевна, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, e-mail: gaiti2007@mail.ru

Для цитирования: Игнатъева Галина Алексеевна¹, Корнилаева Галина Владимировна², Мельникова Татьяна Михайловна³, Сорокина Елена Геннадьевна⁴, Батенева Елена Ильинична. Экспериментальное исследование индук-

ции гуморального ответа на синтетический мультимерный пептидный антиген, потенциально имитирующий конформационный эпитоп нейтрализации ВИЧ-1. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60 (2): 24–28.

Финансирование: работа выполнена за счет средств государственного бюджета Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность: авторы благодарны руководству ФМБА России за поддержку исследовательской работы.

Поступила 28.01.16

Ignateva G.A.¹, Kornilaeva G.V.², Melnikova T.M.³, Sorokina E.G.⁴, Bateneva E.I.¹

Experimental study of antibody's response on synthetic multimeric peptide wich potentially imitate conformational neutralizing epitope of HIV-1

¹ — State research center «Institute of Immunology», Federal medical and biological agency of Russia, Moscow, Kashirskoe shosse, 24

² — State research N.F. Gamalea' center of epidemiology and microbiology, Moscow, Gamalea Str, 18

³ — State N.D. Zelinsky' Institute of organic chemistry of Russian academy of sciences, Leninsky prospect, 47

⁴ — State «Research center of children' health» Ministry of public health of Russia, Moscow, Lomonosov' prospect, 2

The purpose: We elaborate original synthetic peptide (NEQ)₅ wich is linear multiplication up to 15 amino acids of conformational neutralizing epitope of HIV-1 N, E, Q (asparagine, glutamate, glutamine) and investigate its immunogenicity and biological properties. **Methods.** Peptide was synthesized in Biopeptete Co. (US) with purity nearly 95%. This peptide was covalently bound with plant peptidoglycan ImmunomaxTM by SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat). Conjugate was purified on Zeba® Desalt Spin Columns. Female mice (CBA x C57BL)F1, 2 month old in the beginning of experiments was immunized intraperitoneally 3 times with intervals of 30—45 days. All manipulation with animals was done according SOP. By real-time PCR we measured transcription of TNF mRNA in peritoneal exudates cells since 0, 5 h to 48 h after injection pure adjuvant. Interaction of this synthetic peptide with brain glutamate receptor was investigated in NR₂-GoldDot ELISA test system (US). Interaction of anti-peptide antibodies with replicating HIV-1 was investigated in MT4 cell culture by measuring p24 in culture supernatants. **Results.** Pure peptide don't induce detectable antibodies production, but conjugate «peptide-ImmunomaxTM» induced anti-peptide antibodies production in ELISA titres 10^{5–6}. Pure adjuvant induced transcription of TNF mRNA in peritoneal cells only impulsive at 6 or 8 h after i.p. injection. Peptide (NEQ)₅ don't react with brain glutamate receptor in ELISA system NR₂-GoldDot. Anti-peptide serum in 1/10 dilution inhibite HIV-1/IIIB replication on nearly 90%. But the same sera in the dilution 1/20 enchanced replication of other isolate of HIV-1/899 in the same cells MT4. **Conclusion.** Multiepitopic synthetic peptide (NEQ)₅ can induce antibodies production if would be conjugated with adjuvant for example ImmunomaxTM. This adjuvant *per se* induce transcription of primary proinflammatory cytokine TNF mRNA only impulsive at 6 or 8 h after *in vivo* injection. Anti-peptide antiserum inhibit replication of one isolate of HIV-1/IIIB, but enhance replication of other isolate HIV-1/899 in the same cells MT4. Such dilemma is one of the troubles in vaccine elaboration.

Keywords: Synthetic multimeric peptide (NEQ)₅; HIV1/IIIB neutralization; HIV-1/899 enchancement; immunoadjuvant ImmunomaxTM

For citation: Ignateva G.A.¹, Kornilaeva G.V.², Melnikova T.M.³, Sorokina E.G.⁴, Bateneva E.I.¹ Experimental study of antibody's response on synthetic multimeric peptide wich potentially imitate conformational neutralizing epitope of HIV-1. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 24–28. (in Russ).

For correspondence: Galina A. Ignateva, professor, doctor of medical science, 115478 Moscow, Kashirskoye shosse, 24, Russian Federation, e-mail: gaiti2007@mail.ru

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

Funding: federal funding by Federal medical and biological agency of Russian Federation

Received 28.01.16

Введение

Как следует из анализа истории развития технологий производства вакцинных препаратов [1—4], на сегодня единственной методологией, не содержащей рисков присутствия в препаратах технологических примесных микробных патогенов, является химический синтез отдельных протективных эпитопов микроорганизмов-возбудителей заболеваний. Эпитопы — пептиды и их производные, как правило это низкомолекулярные вещества, не вызывающие *per se* иммунный ответ на себя при введении в организм животных. Чтобы получить иммунный ответ на них, необходимы иммуноадъюванты [5, 6].

Целью исследования было решение нескольких задач:

- разработка состава синтетического пептидного антигена,
- получение его конъюгата с адъювантом и получение гуморального иммунного ответа на синтетический антиген,
- исследование эффектов чистого адъюванта *in vivo* на транскрипцию информационной РНК провоспалительного цитокина TNF — фактора некроза опухолей.

Методика

Разработка состава

*синтетического пептидного антигена,
синтез ковалентного конъюгата с адъювантом*

В литературе описан трехаминокислотный конформационный эпитоп (аспарагин, глутамат, глутамин — N-E-Q), который связывают нейтрализующие антитела из крови ВИЧ-инфицированных пациентов [7]. Наша авторская идея состояла в том, чтобы синтезировать линейный пептид из повторов NEQ, в расчете на то, что в таком мультимере может реализоваться некая вероятность воспроизведения *in vivo* при иммунизации животных конформационного эпитопа нейтрализации. По нашему заказу в Bioreptide Co., Inc. (USA) был синтезирован мультимерный пептид с 5-кратно повторяющимся эпитопом NEQ. Степень чистоты пептидного препарата, по данным жидкостной хроматографии, составила 95%, молекулярная масса — 1857 Да.

В качестве адъюванта использовали препарат Иммуномакс™ — высокомолекулярный пептидогликан из растительного сырья. Синтез пептида с адъювантом выполняли с применением сшивающего агента SMCC — сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат — по стандартизованной методике. Реакцию проводили в фосфатном солевом буфере с pH 7, 2 с 1—5 mM EDTA и концентрацией сшивающего агента 0,436 мг/мл. Время

реакции 30 мин при комнатной температуре. Искомый продукт синтеза отделяли от непрореагировавших составляющих на колонке Zeba™ Desalt Spin Columns (US, Pierce, Rockford, IL).

*Исследование эффектов введения *in vivo* чистого адъюванта на динамику экспрессии гена первичного провоспалительного цитокина TNF*

Биологические свойства синтетического пептида, адъюванта и их конъюгата исследовали на двухмесячных мышках-самках (CBA x C57Bl)F1. Все манипуляции с животными проводили по международным стандартам операционных процедур (СОП, SOP): животные при этом клинически выглядели здоровыми, локомоторно подвижными, принимали корм и воду в нормальном режиме.

Биологическое воздействие адъювантов на организм животных оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по маркерному признаку доиммунного воспаления — экспрессии информационной РНК гена фактора некроза опухолей. опыты проводили в реальном времени в динамике на протяжении 48 ч от момента введения в организм препарата. Животным вводили внутривентриально 10 мкг препарата пептидогликана. Клетки брали из брюшной полости мышей («места введения» препарата) через 30 мин после инъекции, и далее каждые 30 мин в течение первых 2 ч, затем 1 раз в час до 8-го часа, и, наконец, через каждые 2 ч до 48-го ч после введения в организм препарата адъюванта. На каждую экспериментальную «точку» брали 2 животных. Из взятых суспензий клеток брали аликвоту, содержащую 2×10^6 ядродержащих клеток, выделяли из клеток РНК и ставили ПЦР в реальном времени с праймерами на TNF.

Иммунизация экспериментальных животных

Мышей иммунизировали внутривентриально, трижды с интервалом между процедурами иммунизации 50—60 сут. Дозы по пептиду составляли 10 и 100 мкг на мыш. В каждой группе было по 10 животных, каждый опыт повторяли трижды. При иммунизации конъюгатом пептида с пептидогликаном доза препарата на мыш составляла 10 мкг по пептидогликану. Антисыворотки для определения содержания антипептидных антител брали на 10-е — 12-е сут. после последней иммунизации. Наличие и титры антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Титрование антисывороток методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА)

Сыворотки титровали в твердофазном ИФА с сорбированными на твердой фазе пептидами из раствора в фосфатном солевом буфере с концентрацией

пептида 10 мкг/мл и с использованием высокочувствительного варианта детекции с субстратом тетраметилбензидином. Сыворотки титровали, начиная с разведения 1:10 и до 10^7 с шагом 1:10, каждое разведение сыворотки закапывали в 2 лунки планшета для ИФА.

Исследование возможной реактивности данного синтетического пептида с глутаматными рецепторами мозга

Растворы пептида с концентрациями 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл вносили в сыворотку положительного контроля, то есть использовали в качестве конкурентного реагента в тест-системе Gold Dot (USA), предназначенной для выявления антител к NR₂-субъединице глутаматного рецептора (NMDA)RcGlu мозга человека. После инкубации с конкурирующими пептидами анализ проводили по протоколу тест-системы.

Исследование вирус-нейтрализующей активности антипептидных сывороток в культуре клеток in vitro

Исследование выполнено в сертифицированной для работы с ретровирусами лаборатории Института вирусологии им Д.И. Ивановского.

В качестве культивируемых клеток использовали линию МТ4, в качестве вируса иммунодефицита — 2 лабораторных штамма ВИЧ-1/ШВ и ВИЧ-1/899. Заражающая доза вируса ВИЧ-1/ШВ составляла 10 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose — 50%). В качестве положительного контроля использовали высокотитражную сыворотку ВИЧ-1-инфицированного человека, в качестве отрицательного контроля — сыворотку интактных мышей (пул от 10 животных). Сыворотки разводили 1/10; 1/20; 1/40; 1/80; 1/160. При работе с новым штаммом ВИЧ-1/899 исследовали ряд разведений вируса от 5^1 до 5^8 с шагом в показателе степени «1» и одно разведение антисыворотки 1/20. Количественным показателем интенсивности репликации вируса служила концентрация вирусного белка p24 в супернатанте культур клеток: чем выше уровень p24 — тем больше репликация вируса. P24 измеряли методом ловушечного ИФА в тест-системе «Вектор бест» (Новосибирск).

Результаты и обсуждение

Исследование экспрессии иРНК TNF в клетках перитонеального экссудата в течение 48 часов после введения Иммуномакса™

Результаты показали, что на протяжении 6 часов после введения препарата-индуктора доиммунного воспаления транскрипция иРНК провоспалительного

цитокина TNF в измеряемых количествах не обнаружена, поскольку «сигнал» ПЦР в клетках мышей, которым ввели индуктор, не отличался от сигнала в клетках интактных контрольных мышей. Скачок сигнала ПЦР-РВ, отражающий возрастающее количество информационной РНК для биосинтеза TNF в клетках наблюдали при дозе пептидогликана 10 мкг на мышь в одном опыте в течение 6-го часа, во втором — 8-го часа после введения препарата. В обоих опытах импульсно, после чего количество иРНК резко снижалось и до 48 ч (срок наблюдения) реэкспрессии иРНК TNF не наблюдалось.

Титрование антисывороток

Результаты титрования антисывороток методом ИФА показали, что чистый 15-членный пептид без адьюванта не индуцирует антительный ответ ни в дозе 10 мкг, ни в дозе 100 мкг на мышь. Ковалентный конъюгат этого пептида с Иммуномаксом™ в дозе 10 мкг по адьюванту индуцирует антительный ответ после 3-й иммунизации в титрах 10^5 — 10^6 .

Исследование возможной реактивности синтетического пептида с глутаматными рецепторами мозга

Мы исследовали наш 15-членный пептидный антиген в качестве конкурента в коммерческой иммуноферментной тест-системе Gold Dot, предназначенной для выявления антител к глутаматным рецепторам мозга. Растворы пептида в конечных концентрациях 0,1 мкг/мл; 1 мкг/мл; 10 мкг/мл; 100 мкг/мл использовали в качестве конкурентного реагента, добавляя их к сыворотке положительного контроля за 30 мин и 12 ч до внесения проб в лунки тест-системы. Результаты показали, что наш пептид не конкурировал за связывание с антителами позитивного контроля к глутаматному рецептору мозга.

Исследование вирус-нейтрализующих свойств антипептидных сывороток

Антипептидная сыворотка в разведении 1/10 показала нейтрализацию репликации вируса штамма ВИЧ-1/ШВ примерно на 90%. В более высоких разведениях эффекта нейтрализации зарегистрировано не было.

В отношении штамма ВИЧ-1/899 эффект нейтрализации вирусной инфекции антисывороткой в разведении 1/20 отсутствовал, напротив, был зарегистрирован эффект усиления репликации вируса в присутствии антисыворотки.

Краткосрочный импульсный характер индукции экспрессии гена такого сильного провоспалительного цитокина как TNF после введения *in vivo* препарата адьюванта Иммуномакса™, по крайней мере, в тече-

ние двух суток, является благоприятным результатом, позволяющим предполагать невысокий риск генерализации доиммунного воспаления от введения *in vivo* адьюванта как такового. В перспективе было бы правильнее проводить скрининг потенциальных адьювантных препаратов, а за ними и вакцинных, по экспрессии не одного гена, а по крайней мере нескольких, и лучше исследовать полногеномный транскриптом в динамике, включая более отдаленные сроки наблюдения (неделя, месяц и т.д.). Это позволит объективно обосновывать био-безопасность потенциальных иммуногенных композиций для целей вакцинации людей.

Чистый пептид с мол. массой 1857 Да при введении животным *in vivo* в дозах 10 и 100 мкг на мышь не индуцировал продукцию противопептидных антител. Ковалентный конъюгат этого пептида с высокомолекулярным препаратом пептидогликана ИммуномаксTM позволяет получить антительный ответ до титров 10^{5-6} при детекции в ИФА.

Исследование возможной реактивности данного синтетического пептида с глутаматным рецептором мозга мы предприняли в связи с тем, что в данном пептиде 75% аминокислотного состава — это как раз глутамин и глутамат. В ткани мозга человека известны рецепторы к глутамату, антитела к которым имеют диагностическое и патогенетическое значение при травмах мозга и/или аутоиммунных воспалительных процессах в мозге. Поскольку для относительно низкомолекулярного пептида гематоэнцефалический барьер может быть проницаем, мы оценили возможность реакции нашего пептида хотя бы в ИФА тест-системе Gold Dot (USA), предназначенной для выявления антител к NR₂-субъединице глутаматного рецептора (NMDA)RcGlu мозга человека. В данном анализе заинтересованность нашего пептида не зарегистрирована. Эти данные позволяют надеяться, по крайней мере, что введение в организм млекопитающих данного пептидного антигена не затронет одну из рецепторных систем мозга — глутаматные рецепторы.

Исследование взаимодействия антипептидных антител с ВИЧ-1 в культуре клеток МТ4 показало рас-

ходящиеся результаты на двух разных изолятах ВИЧ-1. Антипептидная сыворотка в разведении 1/10 нейтрализовала активную репликацию изолята ВИЧ-1/ШВ, в больших разведениях эффект нейтрализации не проявлялся. Та же антипептидная сыворотка в разведении 1/20 усиливала репликацию другого изолята вируса ВИЧ-1/899 в тех же клетках МТ4. Интерпретировать такой результат можно по-разному. Во-первых, как артефакт, однако сходные результаты были получены в 4 постановках эксперимента. Во-вторых, возможно это действительно эффект усиления вирусной инфекции антителами и наш синтетический пептид на самом деле «угадал» вирусный эпитоп, но желаемый эффект нейтрализации инфекции антителами не распространяется на разные изоляты вируса. Эффект усиления вирусной инфекции противовирусными антителами, как раз на примере ВИЧ-1, мы впервые наблюдали в 1985 г. [8], поэтому и в данной работе совсем неожиданным такой результат для нас не стал.

References

1. Wen P., Ellis R., Pujar N.S. eds. *Vaccine Development and Manufacturing*. Hoboken, New Jersey: WILEY; 2015. 523 pp.
2. Miller N.Z. *Vaccines: are they really safe and effective*. Santa Fe, New Mexico: New Atlantean Press; 2015.
3. Largent M.A. *Vaccine*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2012.
4. B.R. Bloom, P-H Lambert, eds. *The Vaccine Book*. San Diego, London: Academic Press; 2003, 436 pp.
5. S. Zolla-Pazner, T. Cadozo Structure-Function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat. rev. Immunology*. 2010; v. 10 (7): 527-35.
6. Ignateva G.A., Maksutov A.Z., Lvov V.L., Kolobov A.A. Experimental research the vaccines to fast modifying pathogens: multiepitope antigens and new adjuvants. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; (2): 2011; 3: 40-2. (in Russian)
7. Ignateva G.A., Ignatev T.I. Biological properties of immunoadjuvants: historical and modern knowleges. *Fiziologiya i patologiya o Immunnoy systemy*. 2010; 1: 15-21. (in Russian).
8. Ignateva G.A., Sidorovich I.G., Nesterchuk S.L., Barinsky I.F. Anti-HIV monoclonal antibodies can enhance the virus infection. *Doklady Akademii nauk SSSR*. 1989; 306 (5): 1272-5. (in Russian)

Сведения об авторах:

Корнилаева Галина Владимировна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. «Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, kornilaeva@yandex.ru

Мельникова Татьяна Михайловна, канд. хим. наук, науч. сотр. ФГБУ «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН», loboda1950@mail.ru

Сорокина Елена Геннадьевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, sorokelena@mail.ru

Батенева Елена Ильинична, науч. сотр. ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Хамнагдаева Н.В.¹, Семенова Л.Ю.¹, Обрубов С.А.¹,
Салмаси Ж.М.¹, Порядин Г.В.¹, Рогожина И.В.²

Характеристика популяций Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и активационных маркеров у детей с близорукостью в зависимости от исходного уровня иммунного статуса

¹ — ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

² — ФГБУ «Детский медицинский центр» УДП РФ, 129075, Москва, ул. Цандера, д. 5

Цель исследования: изучить характеристику популяций Т и В-лимфоцитов, НК-клеток и активационных маркеров у детей с близорукостью в зависимости от исходного уровня иммунного статуса. **Методика.** Обследовано 30 пациентов. Определяли офтальмологический статус и содержание в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD 16, CD56, CD 20, CD 72, CD 38, CD 25, CD 71, HLA-DR, CD 95, CD 54, mIgM, mIgG. **Результаты.** У больных с простой миопией отмечается повышение содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих CD20 и ICAM-1 антигены на мембране лейкоцитов, что может быть связано с продукцией свободных радикалов, генератором которых является транс-ретиаль. **Выводы.** Угнетение экспрессии субпопуляционных антигенов лимфоцитов при миопии у детей на фоне вторичного иммунодефицитного состояния отражает вовлеченность иммунной системы в патологический процесс и, по-видимому, не связано с миопией.

Ключевые слова: миопия; иммунитет

Для корреспонденции: Хамнагдаева Надежда Вениаминовна, аспирант кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: Lyssa_ash@mail.ru

Для цитирования: Хамнагдаева Н.В., Семенова Л.Ю., Обрубов С.А., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Рогожина И.В. Характеристика популяций Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и активационных маркеров у детей с близорукостью в зависимости от исходного уровня иммунного статуса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 29–33.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.01.16

Khamnagdaeva N.V.¹, Semenova L.Y.¹, Obrubov S.A.¹,
Salmasi J.M.¹, Poryadin G.V.¹, Rogozhina I.V.²

Characteristic populations of T and B lymphocytes, NK-cell and activation markers in children with myopia depending on the starting level of the immune status

¹ — N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1, ul. Ostrovityanova, Moscow, 117997, Russian Federation

² — Child medical center Office of the president RF; 5, ul. Tsandera, Moscow, 129075, Russian Federation

The purpose: To study the characteristics of populations of T and B lymphocytes, NK-cells and activation markers in children with myopia, depending on the initial level of immune status. **Methods.** The study involved 30 patients. Determined ophthalmology status and the peripheral blood of patients content determined lymphocytes expressing antigens CD3, CD4, CD8, CD 16, CD56, CD 20, CD 72, CD 38, CD 25, CD 71, HLA-DR, CD 95, CD 54, mIgM, mIgG. **Results.** There is increased lymphocyte expression of CD20 and ICAM-1 antigens in peripheral blood in patient with myopia, that can be associated with production of free radical generator which is a trans-retinal. Inhibition of the expression of antigens lymphocyte subpopulation of myopia in children with secondary immunodeficiency reflects the involvement of the immune system in the disease process, and apparently not associated with myopia.

Keywords: myopia; immunity

For citation: Khamnagdaeva N.V., Semenova L.Y., Obrubov S.A., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Rogozhina I.V. characteristic populations of T and B lymphocytes, NK-cell and activation markers in children with myopia depending on

the starting level of the immune status. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 29–33. (in Russ).

For correspondence: Nadezhda V. Khamnagdaeva, assistant of Department of pathophysiology and clinical pathophysiology of medical faculty «N.I. Pirogov Russian National Research Medical University». 1, ul. Ostrovityanova, Moscow, 117997, Russian Federation, e-mail: Lyssa_ash@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors. Khamnagdaeva N.V.: <http://orcid.org/0000-0003-1167-9226>

Received 20.01.16

Введение

Известно, что подавляющее большинство случаев приобретенной близорукости у детей школьного возраста сочетается с разнообразной экстраокулярной патологией [1]. Имеются также данные, что у лиц с близорукостью в 58,5—70,0% случаев отмечены клинические признаки вторичного иммунодефицитного состояния, а в 75% случаев выявлению близорукости предшествовали заболевания, ассоциированные с вторичным иммунодефицитом [2—4]. При склерально-дегенеративном типе близорукости у всех пациентов выявлены признаки вторичного иммунодефицитного состояния (ВИДС) [5].

Угнетение иммунной системы вызывает деструктивные изменения фибробластов и дезорганизацию коллагеновых волокон склеры [6, 7]. В последние годы в эксперименте на животных получены данные о влиянии ретиноевой кислоты на фибробласты склеры [8, 9]. All-trans ретиноевая кислота способна ингибировать пролиферативную способность фибробластов склеры [9, 10], изменять морфологию клеток [9], а также снижать уровень синтеза гликозаминогликанов [10].

Биоактивный метаболит ретинола имеет важное значение для иммунной системы. Ретиноевая кислота усиливает антительный ответ [11], приводит к снижению Т-хелперов 1, и увеличению числа Т-хелперов 2 [12], стимулирует выработку противовоспалительных цитокинов [13].

Цель исследования — изучение зависимости популяции Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и активационных маркеров у детей с близорукостью от исходного уровня иммунного статуса.

Методика

В клиническом исследовании участвовало 30 школьников в возрасте от 10 до 18 лет, из них 17 мальчиков (59,3%) и 13 девочек (40,7%). Все наблюдаемые дети были разделены на 2 группы. В контрольную группу вошло 10 детей (20 глаз) с эмметропией.

В 1-ю группу, основную, вошло 20 пациентов (40 глаз) с верифицированным диагнозом осевой средней миопии, поставленным в консультативно-диагностическом отделении ФГБУ «ДМЦ» УДП РФ, а также состоящие на диспансерном учете в детской поликлинике, с наличием или отсутствием клинических признаков вторичной иммунной недостаточности (ВИН). В зависимости от наличия и отсутствия клинических признаков вторичной иммунной недостаточности выделены 2 подгруппы. В подгруппу 1 «а» вошло 8 школьников (16 глаз) с осевой средней миопией и клиническими признаками вторичной иммунной недостаточности. У детей подгруппы 1 «б» (12 чел., 24 глаза) с простой осевой средней близорукостью. Признаки вторичной иммунной недостаточности отсутствовали.

Все дети проходили стандартное офтальмологическое обследование, включающее визометрию (проектор знаков ОАП-250 «Carl Zeiss»), авторефрактометрию (KR-8900 «Торсон»), биомикроскопию (SL 120, «Carl Zeiss»), определение запасов относительной аккомодации по методике Э.С. Аветисова, офтальмоскопию, эхобиометрию (HiScan, «ОРТИСОН»).

Анализ наличия у детей школьного возраста заболеваний, ассоциированных с ВИДС, проводился путем выкопировки из медицинской документации (учетная форма 112У и форма № 26/у-2000), также проводилось анкетирование родителей или доверенных лиц. На каждого ребенка заполняли индивидуальную анкету, предназначенную для выявления клинических проявлений инфекционного синдрома. Для выделения детей, страдающих частыми респираторными заболеваниями, был использован современный критерий, согласно которому в эту группу относят детей с повторами ОРВИ от 6 и до 12—15 раз в году. Заключение о наличии инфекционного синдрома выставлялось при положительном ответе на 2 и более вопроса.

Разделение детей по степени миопии (от 3,25 до 6,0 дптр.) осуществлялось по общепринятой классификации [14].

Содержание в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD 20, CD 72, CD 38, CD 25, CD 71, HLA-DR, CD 95, CD 54, mIgM, mIgG определяли методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител серий ИКО и ЛТ (Россия).

Результаты обработаны методом вариационной статистики с помощью пакета прикладных программ Statistica, статистическую значимость различий оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным, 8 детей (26,6%) за год переносят больше 6 случаев острого респираторного заболевания. У 22 детей (73,3%) в анамнезе не больше 4 случаев острых респираторных заболеваний за год.

Данные о содержании популяции и субпопуляции Т-лимфоцитов и НК-клеток представлены в табл. 1.

У детей с простой близорукостью (1 «б» подгруппа) в периферической крови выявлена тенденция к повышению показателей Т-клеточного звена по сравнению с группой контроля (табл. 1). Однако у детей из 1 «а» подгруппы наблюдалось снижение количества лимфоцитов с фенотипом CD4+ и CD8+ соответственно, и общее количество Т-лимфоцитов (CD3+) было статистически значимо снижено по сравнению с тем же показателем у детей с эмметропией и миопией (табл. 1).

У детей с простой миопией содержание субпопуляции естественных киллеров CD16+ и естественных киллеров, реализующих свою цитотоксическую функцию CD56+ не отличалось от группы контроля. При этом отмечалась тенденция к снижению числа лимфоцитов с поверхностным фенотипом CD16+ у детей из

1 «а» подгруппы, при неизменном уровне CD56+ антигена (табл. 1).

Характеристика популяции и субпопуляции В-лимфоцитов у детей с эмметропией и различными нозологическими формами близорукости представлена в табл. 2.

Содержание лимфоцитов с фенотипом CD20+ у лиц с простой близорукостью было статистически значимо выше, чем у детей с миопией, имеющих клинические признаки вторичной иммунной недостаточности, и чем в группе контроля. Уровень CD72+ лимфоцитов у детей с простой близорукостью оказался выше, чем в группе контроля и статистически значимо выше, чем у детей с миопией, сочетающейся с клиническими признаками ВИДС. Наряду с этим имелась тенденция к снижению CD38+ лимфоцитов у лиц с миопией и клиническими проявлениями ВИДС, и тенденция к повышению у детей с простой миопией по сравнению с показателем CD38+ лимфоцитов у детей с эмметропией (табл. 2).

Обнаружено, что у детей 1 «а» подгруппы наблюдалось статистически значимое снижение зрелых В-лимфоцитов, экспрессирующих иммуноглобулины IgM на клеточной мембране по сравнению с данным показателем у детей 1б подгруппы и контролем (табл. 2). Существенных различий относительно количества лимфоцитов, экспрессирующих IgG во всех наблюдаемых группах не отмечено (табл. 2).

Анализ основных активационных маркеров представлен в табл. 3. Количество лимфоцитов, экспрессирующих CD25+ (рецептор для интерлейкина-2) и CD71+ (рецептор для трансферрина) существенно не отличалось от группы контроля.

В основной группе детей различий в уровне лимфоцитов, экспрессирующих поздние активационные маркеры не выявлено. В количестве лимфоцитов, экспрессирующих CD95+, в данной группе также не выявлено существенных различий. Статистически значимое снижение уровня ICAM-1 наблюдалось в 1

Таблица 1

Популяции и субпопуляции Т-лимфоцитов и НК-клеток у детей с эмметропией и различными нозологическими формами близорукости

Популяции и субпопуляции Т-лимфоцитов и НК-клеток	Нозологические формы близорукости, 1-я группа		Контроль, 2-я группа
	Близорукость с клиническими признаками ВИДС, подгруппа 1 "а"	Близорукость простая, подгруппа 1 "б"	
CD3, %	39,97 ± 2,01	55,4 ± 2,88	56,58 ± 2,82
CD4, %	29,81 ± 4,38	39,52 ± 1,31	36,46 ± 1,23
CD8, %	22,66 ± 2,49	29,7 ± 2,19	25,72 ± 0,91
CD16, %	19,01 ± 3,12	24,94 ± 2,65	20,75 ± 2,78
CD56, %	18,28 ± 4,62	20,14 ± 2,06	17,01 ± 1,41

«а» подгруппе по сравнению с контролем. Также мы наблюдали значимое повышение уровня ICAM-1 у детей 1б подгруппы (табл. 3).

Таким образом, в опытной группе детей со средней степенью близорукости (1 «а» и 1 «б» подгруппы) не обнаружено значимых изменений экспрессии активационных антигенов, что отражает отсутствие активного воспалительного процесса в организме.

У детей с простой близорукостью средней величины без клинических признаков ВИС отмечалось статистически значимое повышение количества лимфоцитов, экспрессирующих CD20+ и ICAM-1. Выявлялась также тенденция к повышению CD4+, CD8+, CD56+, CD72+, IgM лимфоцитов.

В настоящее время развитие близорукости связывают с токсическим эффектом перекисных соединений на склеру и увеличением продольных размеров глазного яблока [15]. Известно также, что оксиданты могут оказывать влияние на лимфоциты, в первую очередь на экспрессию молекул адгезии [16, 17]. Вероятнее всего, выявленные в наших исследованиях изменения поверхностных антигенов лимфоцитов связаны именно с продукцией свобод-

ных радикалов, генератором которых является транс-ретиаль.

У детей с близорукостью и клиническими признаками ВИС отмечается статистически значимое уменьшение общего количества Т-лимфоцитов, уровня экспрессии IgM и молекул адгезии ICAM-1, по сравнению с группой контроля. Кроме того, наблюдается тенденция к снижению CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD72+, CD38+ лимфоцитов. Поскольку аналогичные изменения наблюдаются и у детей с иммунодефицитами без миопии [18], мы связываем выявленные нарушения иммунного статуса в группе детей с миопией и клиническими признаками ВИС именно с иммунодефицитным состоянием.

Таким образом, у детей со средней осевой близорукостью повышение содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих CD20+ и ICAM-1 антигены на мембране лейкоцитов, может быть связано с продукцией свободных радикалов, генератором которых является транс-ретиаль. Угнетение экспрессии субпопуляционных антигенов лимфоцитов при миопии у детей с клиническими признаками вторичной иммунодефицитной недостаточности отражает вовлеченность иммунной системы в патологический процесс, и по-видимому, не связано с близорукостью.

Таблица 2

Популяции и субпопуляции В-лимфоцитов у детей с эмметропией и различными нозологическими формами близорукости

Популяции и субпопуляции В-клеточного звена	Нозологические формы близорукости, 1-я группа		Контроль, 2-я группа
	Близорукость с клиническими признаками ВИС, подгруппа 1 "а"	Близорукость простая, подгруппа 1 "б"	
CD20, %	14,54 ± 2,36	28,03 ± 1,9	20,48 ± 1,63
CD72, %	15,08 ± 1,63	25,15 ± 2,57	19,05 ± 1,96
CD38, %	16,17 ± 3,16	26,9 ± 1,92	22,04 ± 1,96
IgM, %	10,69 ± 1,73	22,34 ± 2,4	17,86 ± 1,72
IgG, %	16,29 ± 3,67	16,1 ± 1,56	17,63 ± 2,3

Таблица 3

Активационные маркеры лимфоцитов у детей с эмметропией и различными нозологическими формами близорукости

Активационные маркеры лимфоцитов	Нозологические формы близорукости, 1-я группа		Контроль, 2-я группа
	Близорукость с клиническими признаками ВИС, подгруппа 1 "а"	Близорукость простая, подгруппа 1 "б"	
CD25, %	17,11 ± 2,13	20,23 ± 1,61	19,98 ± 3,38
CD71, %	18,73 ± 4,14	20,17 ± 2,36	17,8 ± 2,84
HLA-DR, %	22,27 ± 2,06	24,51 ± 2,5	21,35 ± 1,7
CD95, %	15,88 ± 2,68	20,3 ± 1,8	15,13 ± 1,4
ICAM-1, %	6,69 ± 0,70	23,59 ± 1,65	12,96 ± 1,5

References

1. Aubakirova A.ZH., Kenzhebaeva K.S., Iskakbaeva Zh.S., Botabekova T.K. Clinical and statistical characteristics of myopia in schoolchildren Almaty and especially its treatment. *Oftal'mologicheskij zhurnal*. Moscow. 2001; 4: 8-10. (in Russian)
2. Okovitev V. V. Value of inflammatory diseases of upper respiratory tract in the etiopathogenesis of myopia in the Air Force flight personnel. *Voенно-медитсинский журнал*. 2000; 321 (11): 43-6. (in Russian)
3. Rabadanova M.G. *Questions pathogenesis of progressive myopia, the choice of treatment. Myopia, violation of refraction, accommodation and the oculomotor system: sbornik nauchnykh trudov mezhdunarodnogo simpoziuma*. Moscow; 2001. 69-1. (in Russian)
4. Petrov, R. V. *Immunology [Immunologiya]*. Moscow: Medicina; 1987. 414 s. (in Russian)
5. McFadden SA, Howlett MH, Mertz JR, Wallman J. Acute effects of dietary retinoic acid on ocular components in the growing chick. *Exp Eye Res*. 2006; 83 (4): 949-61.
6. Huo L, Cui D, Yang X, Gao Z, Trier K, Zeng J. All-trans retinoids acid modulates mitogen-activated protein kinase pathway activation in human scleral fibroblasts through retinoids acid receptor beta. *Mol. Vis*. 2013. 1795-803.
7. Li C, McFadden SA, Morgan I, Cui D, Hu J, Wan W, Zeng J. All-trans retinoic acid regulates the expression of the extra-cellular matrix protein fibulin-1 in the guinea pig sclera and human scleral fibroblasts. *Mol. Vis*. 2010; 16: 689-97.
8. Watson D.S., Huang Z, Szoka F.C. Jr. All-trans retinoic acid potentiates the antibody response in mice to a lipopeptide antigen adjuvanted with liposomal lipid A. *Immunol. Cell Biol*. 2008; 87(8): 630-3.
9. Xie XI, Mu L, Yao X, Li N, Sun B, Li Y, Zhan X, Wang X, Kang X, Wang J, Liu Y, Zhang Y, Wang G, Wang D, Liu X, Kong Q, Li H. ATRA alters humoral responses associated with amelioration of EAMG symptoms by balancing Tfh/Tfr helper cell profiles. *Clin Immunol*. 2013; 148(2): 162-76.
10. Wojtal KA1, Wolfram L, Frey-Wagner I, Lang S, Scharl M, Vavricka SR, Rogler G. The effects of vitamin A on cells of innate immunity in vitro. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27(5): 1525-32.
11. Petrov S.A., Suhovej YU.G., Argunova G.A. Immunological mechanisms in the pathogenesis of myopia. *Тууменский медицинский журнал*. 2000; 1: 8-12. (in Russian)
12. Avetisov EH.S. *Myopia [Miopiya]*. Moscow: Meditsina; 2002. 286p. (in Russian)
13. Viita H, Sen CK, Roy S, Siljamaki T, Nikkari T, Yla-Herttuala S. High expression of human 15-lipoxygenase induces NF-kappa B-mediated expression of vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and T-cell adhesion on human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 1999; 1(1): 83-96.
14. Tyagi S, Nicholson-Weller A, Barbashov SF, Tas SW, Klickstein LB. Intercellular adhesion molecule 1 and beta2 integrins in C1q-stimulated superoxide production by human neutrophils: an example of a general regulatory mechanism governing acute inflammation. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(10): 2248-59.

Сведения об авторах:

Семенова Людмила Юрьевна, доктор мед. наук, проф., каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: Semenovaly@mail.ru

Обрубов Сергей Анатольевич, доктор мед. наук, проф. кафедры офтальмологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: Obrubovs@yandex.ru

Порядин Геннадий Васильевич, доктор мед. наук, чл.-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: gen@rsmu.ru

Салмаси Жан Мустафаевич, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, e-mail: Profjms@yandex.ru

Рогожина Инна Владимировна, канд. мед. наук, зав. консультативно-диагностическим отделением ФГБУ «ДМЦ» УДП РФ.

Топол И.А., Камышный А.М.

Закономерности и направленность изменений в иммунной системе кишечника в условиях хронического социального стресса

Запорожский государственный медицинский университет, 69035, Украина, г.Запорожье, проспект Маяковского, д. 26

Исследовано влияние хронического социального стресса на распределение TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, Rorγt⁺, Foxp3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺-лимфоцитов в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани. **Цель исследования.** Изучить особенности распределения TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, Rorγt⁺, Foxp3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺-лимфоцитов в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани крыс в условиях ХСС. **Методика.** Исследования проводились на 60 крысах (самки) Вистар, которые были разделены на 3 экспериментальные группы: контрольные крысы (группа 1); крысы, которым моделировали ХСС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия (группа 2); крысы, которым моделировали ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках с ежедневной сменой группировки (группа 3). Структуру популяции TLR2⁺, TLR4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, Rorγt⁺, Foxp3⁺, LMP2⁺ и XBP1⁺-клеток было изучено путем анализа серийных гистологических срезов с использованием метода прямой и непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител к TLR2, TLR4, NF-κB, T-bet, GATA3, Rorγt, Foxp3, LMP2 и XBP1. **Результаты.** Установлено, что развитие ХСС приводит к значительной активации врожденной иммунной системы и сопровождается дисбалансом T-bet⁺/GATA3⁺ и Foxp3⁺/Rorγt⁺-клеток, свидетельствуя о доминировании Th1- и Th17-дифференцировки и повышении уровня про-воспалительной сигнализации в кишечнике. Кроме того, показано, что на фоне хронического социального стресса развивается иммунопротеасомный дефект и стресс эндоплазматического ретикулума, который сопровождается однонаправленной тенденцией по увеличению общего количества LMP2⁺-лимфоцитов и снижению количества XBP1⁺-клеток, а изменение концентрации LMP2 и XBP1 в иммунных клетках зависит от вида стресса. **Заключение.** Полученные результаты показали, что хронический социальный стресс может выступать в роли триггера развития воспалительных и АИЗ.

Ключевые слова: стресс, КАЛТ, TLR, T-хелперы, T_{reg}, LMP2 и XBP1

Для корреспонденции: Топол Инна Александровна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ, e-mail: innatopol@yandex.ua

Для цитирования: Топол И.А., Камышный А.М. Закономерности и направленность изменений в иммунной системе кишечника в условиях хронического социального стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 34–38.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.06.15

Топол И.А., Камышный А.М.

Regularities and direction of change in the gut immune system in conditions of chronic social stress

Zaporozhye State Medical University, 26, avenue Mayakovsky, Zaporozhye, 69035, Ukraine

Investigated the influence of chronic social stress (CSS) on the distribution of TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, Rorγt⁺, Foxp3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺-lymphocytes in the gut-associated lymphoid tissue. **The purpose.** Identify the features of the distribution of TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, Rorγt⁺, Foxp3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺ lymphocytes in the gut-associated lymphoid tissue of rats with CSS. **Methods.** Researches have been conducted on 60 rats (female) of Wistar line, which were divided on 3 experimental groups: control rats (group 1); rats, which were modeled CSS1 by means of three weeks social isolation and prolong psychoemotional influence (group 2); rats, which having CSS 2 modeling by means of keeping animals in over populated cages with every day change of grouping (group 3). Structure of population of TLR2⁺, TLR4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, Rorγt⁺, Foxp3⁺, LMP2⁺ — and XBP1⁺ — cells has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of direct and indirect

immunofluorescence with monoclonal antibodies to TLR2, TLR4, Nf- κ B, T-bet, GATA3, Ror γ t, Foxp3, LMP2 and XBP1. **Results.** It has been established that the CSS development leads to a significant activation of the innate immune system and accompanied by an imbalance of T-helper subsets in GALT, leads to an increase in ratio of T-bet⁺/GATA3⁺ and reduce Foxp3⁺/Ror γ t⁺ cells, indicating dominance Th1- and Th17-differentiation in conditions of CSS and raising the level of pro-inflammatory signaling in the gut. In addition, it has been shown that on the background of chronic social stress develops immunoproteasomny defect and endoplasmic reticulum stress, which is accompanied by a unidirectional trend to increase the total number of LMP2⁺ lymphocytes and reduce the total number of XBP1⁺ cells, and the concentration change LMP2 and XBP1 immune cells depends on the type of stress. **Conclusion.** The results showed that chronic social stress may be one of the triggers for development of inflammatory and AID.

Keywords: stress, GALT, TLR, T-helper cells, T_{reg}, LMP2, XBP1

For citation: Topol I.A., Kamyshny A.M. Regularities and direction of change in the gut immune system in conditions of chronic social stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 34–38. (in Russ).

For correspondence: Inna A. Topol, e-mail: innatopol@yandex.ua

Funding. The study had no sponsorship.

Received 15.06.15

Введение

В условиях длительной социально-экономической нестабильности и высокого уровня социального напряжения в обществе как никогда остро стоит вопрос влияния хронического социального стресса (ХСС) на здоровье индивидуума. В свою очередь, риск развития инфекционных, хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний (АИЗ) обусловлен стресс-индуцированной иммунной дисрегуляцией [1]. Так, ХСС является патогенетическим фактором развития многих социально-значимых заболеваний, включая сахарный диабет 1 типа и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), в механизмах развития которых, в свою очередь, важную роль играют нарушения экспрессии паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета TLR2/4, а также дисбаланс Th1/Th2 и T_{reg}/Th17-клеток. Тонкий кишечник является одним из основных мест генерации индуцибельных T_{reg}-клеток (iT_{reg}) и резервуаре пула Th17-клеток, так как именно здесь происходит индукция их дифференцировки из наивных T-лимфоцитов с участием кишечной микрофлоры [2-4]. Ключевыми регуляторами образования Th1, Th2 и Th17 являются транскрипционные факторы T-bet, GATA3 и Ror γ t, нокаут по генам которых (*TBX21*, *GATA3* и *ROR γ t*) блокирует развитие соответствующих лимфоцитов [5, 2]. Дифференцировка T_{reg}-клеток, в свою очередь, зависит от экспрессии транскрипционного фактора Foxp3. Трансдукция Foxp3 в не регуляторные Foxp3-CD25CD4⁺ «наивные» T-клетки человека или мышей присваивает последним функциональные свойства и фенотип T_{reg} [3]. Кроме того, важную роль в функционировании адаптивного звена иммунитета в условиях ХСС играют иммунные протеасомы и система ответа на несвернутые белки (un-

folded protein response — UPR). В частности, иммунная протеасома LMP2 принимает участие в образовании антигенных эпитопов из собственных и чужеродных белков, их презентации вместе с молекулами MHC-II классов T-лимфоцитам, а транскрипционный фактор XBP1 является одним из ключевых участников UPR при стрессе эндоплазматического ретикулума (СЭР).

Цель исследования — выявление особенностей распределения TLR2⁺/4⁺, NF- κ B⁺, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Ror γ t⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺-, XBP1⁺-лимфоцитов в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) крыс в условиях ХСС.

Методика

Исследования проведены на 60 самках крыс Wistar. Животные были разделены на 3 экспериментальные группы [6]: контрольные крысы (группа 1); крысы, которым моделировали ХСС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия (ПЭВ), предпологавший перманентное проживание самок в «агрессивной среде», а именно, через перфорированную перегородку в клетке с агрессивным самцом, который ежедневно вступал в конфронтации с подсаженным к нему другим самцом (группа 2); крысы, которым моделировали ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках (20 крыс на клетку) в течение 3 нед. с ежедневной сменой группировки, при котором подопытную самку каждый день помещали в новую сбалансированную и перенаселенную колонию (группа 3) [7].

Структуру популяции TLR2⁺/4⁺, NF- κ B⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Ror γ t⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺-, XBP1⁺-клеток изучали на основании анализа серийных

гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Серийные 5-микронные срезы подвздошной кишки после депарафинизации и регидратации отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (рН = 7,4) и окрашивали реактивами с первичными моноклональными антителами (МКАТ) к соответствующим антигенам крысы (SantaCruzBiotechnology, США) в течение 18 ч во влажной камере при 4°C. После отмывания избытка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 мин при 37°C с вторичными антителами (SantaCruzBiotechnology, США), конъюгированными с FITC. После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (1:9) для последующей люминесцентной микроскопии. Препараты изучали с помощью компьютерной программы ImageJ (НИН, США). Изображение, получаемое на микроскопе PrimoStar (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью высокочувствительной камеры AxioCam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображений к публикации AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводилось в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флуоресценцией, характерной для клеток, экспрессирующих TLR2/4, NF-κB, T-bet, GATA3, Rorγt, Foxp3, LMP2 и XBP1. Рассчитывались морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитивных клеток. При окраске МКАТ исследовали TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, Rorγt⁺, Foxp3⁺, LMP2⁺ и XBP1⁺- лимфоциты, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки заполненных лимфоцитами ворсинок (Lymphocyte-filled villi, LFV, ЗЛВ), являющиеся отдельным компартментом КАЛТ у крыс и в субэпителиальной зоне сгруппированных лимфоидных узелков (СЭЗ).

Все полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ EXCEL из пакета MS Office 2010 (MicrosoftCorp.США), Statistica 6.0 (Stat — Soft, 2001).

Результаты и обсуждение

Установлено, что развитие ХСС сопровождалось увеличением общего количества лимфоцитов, экспрессирующих TLR 2-го и 4-го типа в КАЛТ крыс, наиболее выраженным в ЗЛВ (TLR2⁺-лимфоциты), приводило к возрастанию числа Nf-κB⁺-клеток: в ЗЛВ в 1,8—2 раза (p<0,05); в СЭЗ — на 52—91% (p<0,05); а также влияло на плотность TLR2, TLR4 и концентрацию Nf-κB в иммуноцитах (рисунок). Изучение баланса между TLR2⁺/TLR4⁺-лимфоцитами в КАЛТ свидетель-

ствовали, что развитие ХСС приводило к достоверному росту соотношения TLR2⁺/TLR4⁺-клеток в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс с преобладанием популяции TLR2⁺-лимфоцитов. Так, коэффициент распределения TLR2⁺/TLR4⁺-клеток увеличился в ЗЛВ на 97% (p<0,05) в случае ХСС1 и на 66% (p<0,05) при ХСС2; в СЭЗ — на 39% (p<0,05) при ХСС1 и на 41% (p<0,05) в случае ХСС2, по сравнению с контролем. Данные показывают, что ХСС приводит к значительной активации врожденной иммунной системы и усилению провоспалительной сигнализации в КАЛТ. Это, в свою очередь, может влиять на уровень включения адаптивного иммунного ответа и характер дифференцировки субпопуляций Т-лимфоцитов и, в конечном итоге, инициировать развитие воспалительных заболеваний кишечника и аутоиммунных заболеваний (АИЗ).

Подтверждением этого предположения стали данные о том, что развитие стресса сопровождается увеличением количества T-bet⁺ клеток (рис.) в обеих исследуемых нами зонах КАЛТ на 39—92% (p<0,05), GATA3⁺-лимфоцитов в ЗЛВ (на 61—74%, p<0,05), уменьшает плотность Th2 в СЭЗ при ХСС1 (на 21%, p<0,05), преимущественно повышает концентрацию T-bet и GATA3 в лимфоцитах.

Развитие ХСС не влияло на соотношение T-bet⁺/GATA3⁺-клеток в ЗЛВ подвздошной кишки крыс и приводило к статистически значимому повышению данного коэффициента в СЭЗ (на 75% (p<0,05) при ХСС1 и на 46% (p<0,05) в случае ХСС2) по сравнению с контролем. Выявленные изменения экспрессии T-bet и GATA-3 и, соответственно, баланса Th1/Th2-клеток в условиях ХСС могут существенно влиять на риск развития иммунопатологии, и данный факт был подтвержден рядом других экспериментальных исследований. Так, было установлено, что развитие ХСС у мышей сопровождается дисбалансом Th1/Th2-клеток в периферических лимфатических узлах в сторону превалирования Th1 и приводит к спонтанному развитию воспалительного заболевания кишечника [8]. Вместе с тем, было показано, что хронический стресс может вызывать и сдвиг от Th1 к Th2-ответу, а также провоцировать развитие не только воспаления, но и опухолей толстого кишечника [5]. Это подтверждается также данными относительно сдвига Th1/Th2 баланса в сторону Th2-клеток в условиях индуцированной социальным стрессом бронхиальной астмы и воспаления дыхательных путей [9].

Кроме того, развитие ХСС приводило к увеличению количества Rorγt⁺ лимфоцитов (на 94% — в 2,1 раза в ЗЛВ, в 2,3 раза в СЭЗ только в случае

ХСС2) по сравнению с контролем и сопровождалось ростом концентрации Ror γ t. Эти изменения происходили на фоне уменьшения количества CD25⁺ (на 41% — в 2,1 раза), Foxp3⁺-лимфоцитов (на 44—49% в ЗЛВ, 20—39% в СЭЗ) и свидетельствовали о доминировании в условиях ХСС Th17- и Th1-дифференцировки и повышении уровня провоспалительной сигнализации в кишечнике (рисунок). Полученные нами результаты совпадают с данными, демонстрирующими, что при развитии стресса и стресс-индуцированной депрессии в лимфоидных органах у мышей изменяется количество Th17-лимфоцитов, и нарушается баланс между T_{reg}/Th17-клетками [10]. Это подтверждается и обнаруженной нами общей тенденцией к существенному снижению соотношения T_{reg}/Th17-лимфоцитов в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс. Так, коэффициент распределения Foxp3⁺/Ror γ t⁺-клеток уменьшился в ЗЛВ в 4,1 раза ($p < 0,05$) на фоне ХСС1 и в 3,5 раза ($p < 0,05$) при ХСС2; в СЭЗ — на 39% ($p < 0,05$) при ХСС1 и в 3,8 раза ($p < 0,05$) в случае ХСС2, по сравнению с контролем.

Нами установлено, что развитие ХСС сопровождалось однонаправленной тенденцией по увеличению общего количества LMP2⁺-лимфоцитов в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс, наиболее выраженной в ЗЛВ, а изменение концентрации LMP2 в иммунных клетках зависело от вида стресса. Так, суммарная плотность LMP2⁺-клеток в ЗЛВ выросла в 3,2 раза ($p < 0,05$) в условиях ХСС1 и в 2,5 раза ($p < 0,05$) при ХСС2; в СЭЗ — в 2,6 раза ($p < 0,05$) при ХСС1 и на 46% ($p < 0,05$) на фоне ХСС2 (рисунок). Повышенная экспрессия LMP2 может способствовать развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности, СД1 типа, ревматоидного артрита, неспецифического язвенного колита [11], болезни Крона [12], воспалительных заболеваний кишечника [13]. Кроме того, иммунные протеасомы влияют на дифференцировку, выживание и пролиферацию Т-лимфоцитов, а их ингибирование приводит к уменьшению экспансии Th1 и Th17-клеток и способствует развитию T_{reg} при экспериментальном колите, индуцированном DSS [14].

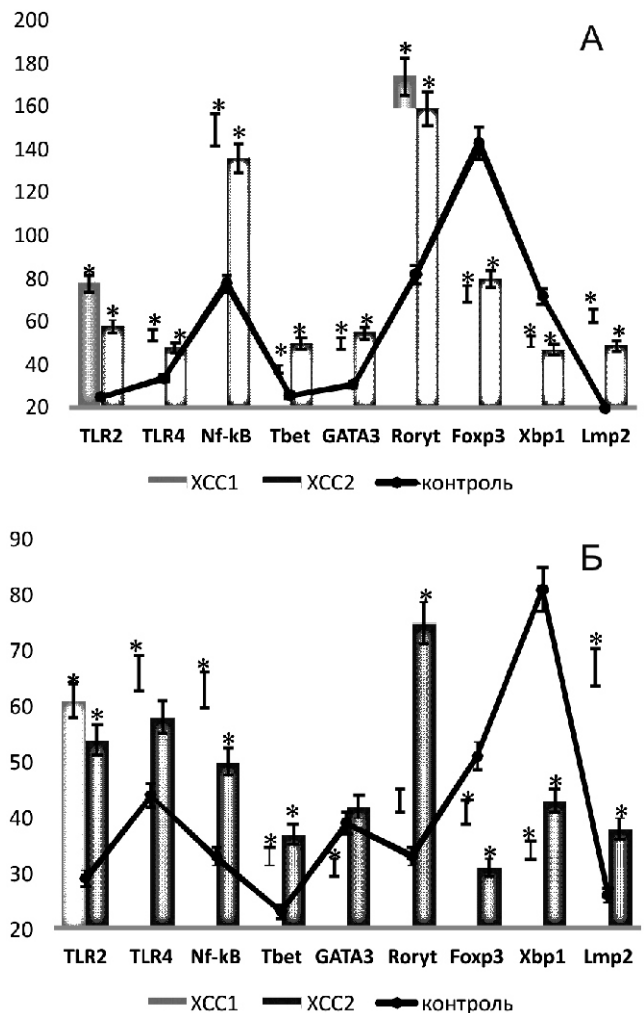
Развитие ХСС сопровождалось однонаправленной тенденцией по снижению общего количества ХВР1⁺ лимфоцитов в ЗЛВ на 31% (ХСС1) — 35% (ХСС2) ($p < 0,05$), в СЭЗ — на 47% (ХСС2) — 58% (ХСС1) ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Известно, что изменение экспрессии ХВР1 может являться триггером развития воспалительных и АИЗ [15, 16], а ХВР1-дефицитные В-лимфоциты демонстрируют нарушенную дифференцировку в плазмощиты и изменения продукции антител [17].

Следовательно, согласно вышеизложенному, события, происходящие в КАЛТ в условиях ХСС, явно противоречат классической парадигме стресса и провоцируют не иммуносупрессию, а выраженную активацию иммунной системы и воспалительный процесс.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что развитие ХСС сопровождается увеличением количества TLR2⁺- и TLR4⁺-лимфоцитов в КАЛТ, изменяет баланс TLR2⁺/TLR4⁺-клеток, усиливает экспрессию Nf-kB, что свидетельствует об активации врожденной иммунной системы.

В условиях ХСС наблюдается дисбаланс субпопуляций Т-хелперов в КАЛТ, приводящий к увеличению соотношения T-bet⁺/GATA3⁺ и снижению



Количество иммунопозитивных клеток в ЗЛВ (А) и СЭЗ сгруппированных лимфоидных узлов (Б) в условиях ХСС: * — $p < 0,05$ по отношению к контролю (А–Б).

Foxp3⁺/Rorγt⁺-клеток, свидетельствуя о доминировании в условиях ХСС Th1- и Th17-дифференцировки, повышении уровня про-воспалительной сигнализации в кишечнике на фоне супрессорной недостаточности.

Развивающийся на фоне ХСС иммунопротеасомный дефект и стресс эндоплазматической сети, влияя на уровень процессинга антигенов, активацию «наивных» Т-лимфоцитов и направление их дифференцировки могут быть одними из триггеров развития АИЗ и ВЗК.

References

1. Powell N. Psychosocial stress and inflammation in cancer. *Brain, Behavior and Immunity*. 2013; 30: 41-7.
2. Littman D., Rudensky A. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010; 140: 845-58.
3. Martins M. Functional stability of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Trends Mol Med*. 2012; 18 (8): 454-62.
4. Reber S. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25: 1153-61.
5. Hou N. Zhang X., Zhao L. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. *BiochemBiophys Res Commun*. 2013; 439 (4): 471- 76.
6. Avgustinovich D., Kovalenko I. Gender-related characteristics of responding to prolonged psychoemotional stress in mice. *Neurosc. Behav. Physiol*. 2009; 40(3): 858-67.

7. Kaluyev A.V. *Stress and grooming*. Moscow: Aviks. 2002.

8. Schmidt D. Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th17 cell responses. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(7): 1097 — 104.

9. Ohno I. Bronchial asthma and psychological stress. *RinshoByori*. 2010; 58(3): 292 — 99.

10. Hong M. Imbalance between Th17 and T-reg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice. *Neuroimmunomodulation*. 2013; 20(1): 39-50.

11. Basler M., Kirk C., Groettrup M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol*. 2013; 1: 74 — 80.

12. Visekruna A., Slavova N., Dullat S. et al. Expression of catalytic proteasome subunits in the gut of patients with Crohn's disease. *Int J ColorectDis*. 2009; 10: 1133 — 39.

13. Fitzpatrick L., Khare V., Small J., Koltun W. Dextran-sulfate sodium-induced colitis is associated with enhanced low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) expression and is attenuated in LMP2 knockout-mice. *DigDisSci*. 2006; 51: 1269 — 76.

14. Kalim K., Basler M., Kirk C., Groettrup M. Immunoproteasome Subunit LMP7 Deficiency and Inhibition Suppresses Th1 and Th17 but Enhances Regulatory T Cell Differentiation. *The J. of Immunology*. 2012; 189: 4182 — 93.

15. Glimcher L. XBP1: the last two decades. *Ann. Rheum. Dis*. 2010; 69: 67 — 1.

16. Kaser A., Blumberg R. Survive an innate immune response through XBP1. *Cell Research*. 2010; 20: 506 — 7.

17. Todd D., Lee A., Glimcher L. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and auto immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2008; 9: 663 — 74.

Сведения об авторах:

Камышный Александр Михайлович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ

Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В.

Гуморальный иммунный ответ на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц в зависимости от стажа курения

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

Цель исследования: изучение гуморального иммунного ответа на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц с различным стажем курения. **Методика.** Исследование проводилось на 2-х группах добровольцев мужского пола, средний возраст которых составил 22 ± 1 год, не имеющих сопутствующей соматической патологии. В 1-ю группу вошли — курящие ($n = 36$), во 2-ю группу (контрольную, $n = 10$) — некурящие молодые люди. В свою очередь группа курящих была разбита на 3 подгруппы: 1.1. — стаж курения до 5 лет, 1.2. — стаж курения от 5 до 10 лет, 1.3. — стаж курения 10 лет и более. В образцах сыворотки определяли концентрации гомоцистеина, окисленных ЛПНП, МДА окисленных липопротеидов, иммунные комплексы и комплексы, содержащие холестерин и триглицериды. **Результаты.** Показано увеличение количества окисленных ЛПНП, МДА окисленных липопротеидов и аутоантител к ним в зависимости от стажа курения. Концентрация иммунных комплексов и аутоантител к окисленным ЛПНП максимальна у никотинзависимых лиц со стажем курения более 10 лет. Содержание гомоцистеина имело значимые различия только между группой контроля и группой курящих молодых людей, зависимости от стажа курения не выявлено. **Заключение.** Полученные данные могут свидетельствовать о недостаточности механизмов элиминации повреждающих факторов у никотинзависимых лиц посредством аутоантител, а следовательно, о развитии дисфункции эндотелия и инициации развития атеросклероза.

Ключевые слова: курение, гомоцистеин, окисленные липопротеиды, аутоантитела к окисленным липопротеидам

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

Для цитирования: Фефелова Е.В., Терешков П.П., Цыбиков Н.Н., Максименя М.В. Гуморальный иммунный ответ на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц в зависимости от стажа курения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 39—43.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.02.15

Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V.

Humeral immune response to the oxidation of lipoproteins in nicotine addicted patients according to their smoking history

Chita State Medical Academy, 672000, Russia, Chita, ul. Gorky 39a

The purpose. To investigate the humoral immune response to oxidized lipoproteins in nicotine addictive patients with different experience of smoking. **Methods:** 2 groups of male volunteers aged 22 ± 1 without any somatic pathology have been examined. The first group included the smokers ($n = 36$), the second control one ($n = 10$) comprised non smoking young people. The group of smokers was divided into three subgroups: 1.1. — period of smoking under 5 years; 1.2. — period of smoking from 5 to 10 years; 1.3. — period of smoking more than 10 years. Common immune complexes, cholesterol and triglycerides complexes, MDA of the oxidized lipoproteins, oxidized LDL as well as homocysteine levels were registered in blood serum of the smokers. **Results.** Increased LDL oxidized index, MDA of the oxidized lipoproteins level and autoantibodies to them have been detected to be dependant on the smokers' experience. The concentration of immune complexes and auto antibodies to oxidized lipoproteins of low density (LPLD) turned to be the maximum in nicotine addictive patients with the period of smoking more than 10 years. Homocysteine level was characterized by marked difference only between the control ones and young smokers; smokers experience at the same time proved to be of no value. **Conclusion.** The data obtained may testify to the failure of mechanism of elimination of damaging factors in nicotine addictive patients by means of autoantibodies, and, consequently, the development of endothelial dysfunction as well as the beginning of atherosclerosis.

Keywords: smoking, homocysteine, oxidized lipoproteins, auto antibodies to oxidized lipoproteins.

For citation: Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Tsybikov N.N., Maximenya M.V. Humeral immune response to the oxidation of lipoproteins in nicotine addicted patients according to their smoking history. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 39—43. (in Russian).

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

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

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

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

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

Maximenya M.V., <http://orcid.org/0000-0001-6308-3411>

Received 04.02.15

Введение

Несмотря на достижения современной медицины, атеросклероз по-прежнему является ведущей причиной широкого спектра кардио- и цереброваскулярных заболеваний, а причины и механизмы развития его остаются дискуссионными. Это обусловлено наличием многолетней преclinical стадии развития данного патологического процесса и недостатком методов его обнаружения. К факторам, ведущим к развитию атеросклероза, относят избыточное потребление холестерина, аутоиммунные реакции, гипергомоцистеинемию, дефекты генов рецепторов липопротеинов, курение, артериальную гипертензию и др. [1—3]. Установлено, что развитие атеросклероза среди бывших курильщиков протекает более активно по сравнению с никогда не курившими людьми, а результат влияния курения на формирование атеросклеротических поражений может быть кумулятивным и, возможно, необратимым [4]. Одной из привлекательных на настоящий момент теорий о причинах и механизмах развития атеросклероза, является гипотеза, согласно которой окисление липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) приводит к их модификации и развитию на них аутоиммунной реакции [5], нарушению выработки межклеточных медиаторов, и развитию вторичной альтерации [6—10].

Однако, имеющиеся данные об уровне аутоантител к окисленным ЛПНП (оЛПНП) у больных атеросклерозом и здоровых людей противоречивы, однозначной связи между уровнем аутоантител к модифицированным ЛПНП и развитием атеросклеротического процесса не обнаружено [5, 11—13].

Цель исследования — изучение гуморального иммунного ответа на окисленные липопротеиды у никотинзависимых лиц с различным стажем курения.

Методика

Исследование проведено на двух группах добровольцев мужского пола, средний возраст которых составил 22 ± 1 год, не имеющих сопутствующей соматической патологии. В 1-ю основную группу вошли — курящие молодые люди ($n = 36$). Контрольную группу составили некурящие лица ($n = 10$). Группа курящих была разбита на 3 подгруппы: 1-я — стаж курения до 5 лет, 2-я — от 5 до 10 лет, 3-я — 10 лет и более.

Концентрацию гомоцистеина в образцах крови из локтевой вены определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией при 330 нм и разделением на колонке Chromolith 100 Ч 4,6 мм с использованием в качестве элюента ацетонитрил — 0,05 М лимонная кислота (10:90, v/v) [14].

Уровень оЛПНП, МДА окисленных ЛПНП (МДА ЛПНП) и аутоантител к ним определяли методом ИФА с использованием тест-наборов «Biomedica» (Германия), содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) — методом преципитации с 3,5% раствором полиэтиленгликоля (молекулярный вес 6000) (В.В. Меньшиков, 1987). Иммунные комплексы, содержащие холестерин и триглицериды, определяли по методу Шойбонова [15].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.1. Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом (25-го; 75-го перцентилей); сравнение независимых выборок проводили с помощью U-критерия Манна—Уитни, сравнение зависимых переменных — с использованием критерия Вилкоксона. Различия двух сравниваемых величин считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Данные зависимости уровня оЛПНП от стажа курения представлена в табл. 1. Как видно из таблицы при стаже курения до 5 лет количество оЛПНП увеличивается в 7 раз, от 5 до 10 лет — более чем в 20 раз, а при стаже 10 лет и более — в 200 раз.

Максимальная концентрация окисленных липопротеидов малонового диальдегидом зафиксирована у никотинзависимых лиц со стажем курения 10 лет и более и составила около 80% от всех оЛПНП. В содержании гомоцистеина значимые различия выявлены только между группой контроля и курящими молодыми людьми. Повышение концентрации этого тилола в зависимости от стажа курения не выявлено (табл. 1).

Увеличение количества окисленных малоновым диальдегидом ЛПНП у молодых людей со стажем курения 5 и более лет свидетельствует об активном течении процессов перекисного окисления липидов [16] и срыве механизмов антиоксидантной защиты. В то же время наблюдалось повышение содержания иммунных комплексов: в 4 раза у лиц 1-й и 2-й подгрупп основной группы и в 8 раз — у лиц со стажем курения более 10 лет. Уровень аутоантител к окисленным ЛПНП возрастал только при стаже курения 5 лет и более: во 2-й подгруппе — в 1,5 раза, а в 3-й — в 6 раз (табл. 2).

На следующем этапе исследования оценивали качественный состав иммунных комплексов. Для этой цели кровь брали на исследование у никотинзависимых лиц до курения и через 10 мин после. Результаты показали, что у никотинзависимых лиц со стажем курения 5 лет, возрастал уровень иммунных комплексов, содержащих как холестерин, так и триглицериды.

Причем после курения изменения оказались более выраженными. В дальнейшем количество иммунных комплексов снижалось, достигая значений контрольной группы. Характер снижения уровня иммунных комплексов был различен: у лиц со стажем курения от 5 до 10 лет резко уменьшалось количество иммунных комплексов, содержащих холестерин, в подгруппе со стажем курения 10 лет и более их уровень приближается к контрольным значениям. Максимальное количество иммунных комплексов, содержащих триглицериды, отмечено у лиц 2-й подгруппы (табл. 3).

Таким образом, у лиц со стажем курения до 5 лет иммунный ответ направлен против избыточного количества холестерина и триглицеридов, а у людей со стажем курения более 5 лет — против окисленных липопротеидов. Но, при этом, концентрация антител к окисленным липопротеидам нарастает с гораздо меньшей скоростью, по сравнению с увеличением уровня оЛПНП. Так в 1-й подгруппе количество антител не увеличивалось, а уровень окисленных липопротеидов возрастал в 7 раз, во 2-й подгруппе — в 1,5 и 23 раза, а в 3-й — в 6 и 20 раз соответственно по сравнению с группой контроля.

Полученные данные могут свидетельствовать о недостаточности механизмов элиминации повреждающих факторов посредством аутоантител, а следовательно, о развитии дисфункции эндотелия и инициации развития атеросклероза.

Выводы

1. Уровень окисленных ЛПНП, окисленных липопротеидов малоновым диальдегидом и гомоцистеином в сыворотке крови возрастает в зависимости от стажа курения.

Таблица 1

Содержание окисленных липопротеидов в сыворотке крови у молодых людей в зависимости от стажа курения (Ме (25-й; 75-й))

Группа	оЛПНП мкг/мл	МДА ЛПНП, мкг/мл	Соотношение МДА ЛПНП / оЛПНП, %	Гомоцистеин, мкмоль/л
Контрольная группа (n = 10)	0,36 [0,25; 0,37]	0,00 [0,00; 0,12]	0,0085 [0,0026; 32,61]	5,7 [5,00; 6,46]
Стаж курения до 5 лет (n = 12)	2,493 [2,41; 2,50] p1 = 0,00009	0,4 [0,4; 0,578] p1 = 0,00010	16,40 [12,21; 17,23] p1 = 0,55	11,20 [10,49; 17,18] p1 = 0,00009
Стаж курения 5—10 лет (n = 12)	8,537 [6,47; 9,04] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000	4,819 [3,94; 4,84] p1 = 0,00009 p2 = 0,00000	56,68 [50,22; 74,45] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000	13,40 [12,94; 13,40] p1 = 0,00009 p2 = 0,35
Стаж курения 10 лет и более (n = 12)	74,19 [38,81; 77,49] p1 = 0,00009 p2 = 0,00000 p3 = 0,00000	60,08 [20,25; 70,90] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000 p3 = 0,00000	77,53 [57,99; 95,56] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000 p3 = 0,016	14,30 [11,50; 17,18] p1 = 0,00009 p2 = 0,37 p3 = 0,97

Примечание. n — число обследованных; p1 — уровень статистической значимости различий групп никотинзависимых лиц по сравнению с контрольной группой, p2 — уровень статистической значимости различий 1-й подгруппы обследуемых со 2-й и 3-й подгруппами, p3 — уровень статистической значимости различий 2-й подгруппы по сравнению с 3-й.

Концентрация иммунных комплексов и аутоантител к окисленным липопротеидам в сыворотке крови у молодых людей в зависимости от стажа курения (Ме (25-й; 75-й))

Группа	3,5% ПЭГ	АТ к оЛПНП, мЕд/мл
Контрольная группа (n = 10)	0,005 [0,001; 0,008]	243,40 [143,40; 348,80]
Стаж курения до 5 лет (n = 12)	0,022 [0,017; 0,036] p1 = 0,000089	203,2 [198,9; 855,2] p1 = 0,025
Стаж курения 5—10 лет (n = 12)	0,017 [0,001; 0,017] p1 = 0,0043 p2 = 0,00001	373,90 [373,90; 594,50] p1 = 0,0072 p2 = 0,06
Стаж курения 10 лет и более (n = 12)	0,040 [0,035; 0,046] p1 = 0,000089 p2 = 0,00000 p3 = 0,00000	1434,00 [885; 1674,00] p1 = 0,00089 p2 = 0,00000 p3 = 0,00000

Примечание. n — число обследованных; p1 — уровень статистической значимости различий у никотинзависимых лиц по сравнению с лицами контрольной группы, p2 — уровень статистической значимости различий 1-й подгруппы с 2-й и 3-й, p3 — уровень статистической значимости различий 2-й подгруппы по сравнению с 3-й.

Уровень холестерина и триглицеридов иммунных комплексов у никотинзависимых лиц (Ме (25-й; 75-й))

Группа	Холестерин ИК до курения, мг/дл	Холестерин ИК после курения, мг/дл	ТГ ИК до курения	ТГ ИК после курения
Контрольная группа (n = 10)	6,026 [4,44; 7,051]		5,26 [3,393; 5,789]	
Стаж курения до 5 лет (n = 12)	9,36 [6,03; 11,33] p1 = 0,0024	12,34 [7,81; 17,2] p4 = 0,051	7,19 [5,26; 8,07] p1 = 0,015	16,44 [6,32; 36,51] p4 = 0,012
Стаж курения 5—10 лет (n = 12)	4,44 [4,17; 6,01] p1 = 0,044 p2 = 0,00025	4,72 [2,92; 5,57] p1 = 0,00001 p4 = 0,059	9,21 [7,28; 18,59] p1 = 0,00002 p2 = 0,0031	8,64 [6,14; 13,29] p2 = 0,002 p4 = 0,117
Стаж курения 10 лет и более (n = 12)	5,51 [3,61; 10,02] p1 = 0,41 p2 = 0,07 p3 = 0,046	4,31 [3,75; 10,75] p2 = 0,0044 p3 = 0,0165 p4 = 0,133	5,53 [3,39; 5,88] p1 = 0,79 p2 = 0,041 p3 = 0,000012	6,27 [5,35; 9,74] p2 = 0,003 p3 = 0,154 p4 = 0,0035

Примечание. n — число обследованных; p1 — уровень статистической значимости различий групп никотинзависимых лиц по сравнению с контрольной группой, p2 — уровень статистической значимости различий 1-й подгруппы со 2-й и 3-й, p3 — уровень статистической значимости различий 2-й подгруппы по сравнению с 3-й, p4 — уровень статистической значимости различий показателей до и после курения.

2. Концентрация иммунных комплексов и аутоантител к окисленным ЛПНП максимальна у никотинзависимых лиц со стажем курения более 10 лет.

3. Содержание гомоцистеина увеличено у никотинзависимых лиц, но при этом не зависит от стажа курения.

References

1. Nagornev V.A., Voskan'janc A.N. Modern conceptions of the pathogenesis of atherosclerosis. *Vestn. RAMN.* 2006; 9-10: 66-74.
2. Tsybikov N.N., Tsybikova N.M. The role of homocysteine in human pathology. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2007; T.127, № 5: 471-482.
3. Hansson G. K., Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 2011; 12 (3): 204-212.

4. Parahonskij A.P. The effect of smoking on the development of atherosclerosis. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2009; 9: 165-166.

5. Zhdanova O.Ju. *Autoantibodies to modified lipoproteins rights and their role in atherogenesis.* avtoref. dis... k.b.n. Sankt-Peterburg., 2005.

6. Stepanov A.V., Tsepelev V.L., Melnikova S.L. Immunostimulator from the central body of humoral immunity — bursa of Fabricius // *Sibirskij Medicinskij Zhurnal.* — 2013. — № 2. — P. 32-34.

7. Stepanov A.V., Tsepelev V.L. Influence of synthetic peptides bursa of fabricius on the functional activity of macrophages // *Transbaikalian Medical Bulletin.* — 2014. — № 2. — P. 44-47.

8. Stepanov A.V., Tsepelev V.L., Tsepelev S.L., Tsybikov N.N., Byambaa A.B. The results of research on the effectiveness of synthetic immunostimulant new generation // *Fundamental research* — 2012. — №12 (1). — V.142-145.

9. Stepanov A.V. Vlijanie peptidov iz limfoidnoj tkani na immunitet i vospalenie: Avtoref. dis. ...dokt. med. nauk, Irkutsk, 1995 (in Russian)

10. Tsepelev V.L., Stepanov A.V. The impact of regulatory peptides on the proinflammatory cytokines production // *Transbaikalian Medical Bulletin*. — 2015. — № 2. — P. 147-150.
11. Mel'nichenko A.A., Orehov A.N., Sobenin I.A. *Atherogenic lipoprotein modification. Role in atherogenesis*. LAP LAMBERT Academic Publishing; 2013. 253 с.
12. Nikiforov N.G., Grachev A.N., Sobenin I.A. in dr. Interaction of native and modified LDL with the intimal cells in atherosclerosis. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja medicina*. 2013; 1: 109-117 (in Russian)
13. Maiolino G., Rossitto G., Caielli P. et al. The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013 (13). Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/714653>.
14. 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: 609-615 (in Russian).
15. Shojbonov B.B., Baronec V.Ju., Panchenko L.F., Kubatiev A.A. Express method for determining cholesterol in immune complexes. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2013; 4: 109-114 (in Russian).
16. Hyshiktuev B.S. Applied and fundamental aspects of the study of adaptation and disadaptation reactions in health and disease. *Zabajkal'skij medicinskij vestnik*. 2008; 2: 14-20. Available at: <http://medacadem.chita.ru/zmv> (in Russian).

Сведения об авторах:

Терешков Павел Петрович, канд. мед. наук, зав. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии
Цыбиков Намжил Нанзатович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ЧГМА
Максименя Мария Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО ЧГМА

Тропская Н.С., Шашкова И.Г., Черненко Т.В., Попова Т.С.

Влияние ванкомицина на мигрирующий миоэлектрический комплекс и видовой состав микрофлоры кишечника

ГБУЗ г.Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г.Москвы, 129090, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3

Цель исследования: Изучение влияния ванкомицина на миоэлектрическую активность тонкой кишки и видовой состав микробиоты кишечника у здоровых крыс. **Методика.** Исследования выполнены на 14 крысах самцах линии Вистар с массой тела 250—300 г. В мышечный слой тонкой кишки крыс были имплантированы электроды, а в антральную часть желудка вживлен зонд. До и после введения ванкомицина (в течение 7 сут) регистрировалась электрическая активность тонкой кишки и проводились микробиологические исследования содержимого тощей и слепой кишок, и кала. **Результаты.** Введение ванкомицина приводило к увеличению продолжительности цикла мигрирующего миоэлектрического комплекса (ММК) и уменьшению числа распространяющихся комплексов. Кроме того, наблюдалось увеличение длительности фазы II (нерегулярной активности) с уменьшением длительности фазы I (покоя) по сравнению с нормой. Выявлялось увеличение видового разнообразия микроорганизмов в тощей кишке и снижение его в слепой кишке и кале, а также умеренное снижение численности представителей нормальной микрофлоры в слепой кишке и кале, и появлении условно-патогенной грамотрицательной флоры в проксимальных отделах тощей кишки. **Заключение.** Введение ванкомицина приводит к нарушению генерации ММК и способствует возникновению синдрома избыточного бактериального роста, частично связанного, по-видимому, с миграцией фекальной микрофлоры в верхние отделы тонкой кишки.

Ключевые слова: моторика тонкой кишки; мигрирующий миоэлектрический комплекс; ванкомицин; кишечная микрофлора

Для корреспонденции: Тропская Наталья Сергеевна, e-mail: ntropskaya@mail.ru

Для цитирования: Тропская Н.С., Шашкова И.Г., Черненко Т.В., Попова Т.С. Влияние ванкомицина на мигрирующий миоэлектрический комплекс и видовой состав микрофлоры кишечника. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 44—50.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликта интересов.

Поступила: 17.06.15

Tropskaya N.S., Shashkova I.G., Chernen'kaya T.V., Popova T.S.

Effect of vancomycin on migrating myoelectric complex and intestinal microflora

State Budgetary Health Care Institution «N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Health Department»;
3, Bolshaya Sukharevskaya square, 129090, Moscow, Russia

The purpose. To study the effect of vancomycin on myoelectric activity of small intestine and species composition of the intestinal microbiota in healthy rats. **Methods.** The studies were performed on 14 male Wistar rats weighing 250—300 g. Three electrodes were implanted in the muscle layer of the small intestine and the probe was implanted in antral part of the stomach. Myoelectric recordings were measured from unanesthetized rats before and after administration of vancomycin (during 7 consecutive days). Jejunum, cecum and feces samples were cultured quantitatively. **Results.** Myoelectric recordings in vancomycin rats showed longer intervals between activity fronts of the migrating myoelectric complex (MMC) (phase III) compared with background recordings. In addition, number of propagating complexes was dramatically decreased. The duration of phase II was longer, and the duration of phase I was shorter than that of normal animals. It was identify an increase in species diversity of microorganisms in the jejunum and decreased it in the cecum and feces, as well as a moderate decrease in the number of members of the normal microflora in the cecum and feces and appears opportunistic gram-negative flora in the proximal jejunum. **Conclusion.** Thus, disruption of MMC with vancomycin promotes bacterial overgrowth that partly bound, apparently with the migration of the fecal microflora in the proximal jejunum.

Keywords: Small intestinal motility; migrating myoelectric complex; vancomycin; intestinal microflora

For correspondence: Nataliya S. Tropkaya, Doctor of biological Sciences, leading researcher of the experimental pathology laboratory, State Budgetary Health Care Institution «N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Health Department»; 3, Bolshaya Sukharevskaya square, Moscow, 129090, Russian Federation, e-mail: ntropkaya@mail.ru

For citation: Tropkaya N.S., Shashkova I.G., Chernen'kaya T.V., Popova T.S. Effect of vancomycin on migrating myoelectric complex and intestinal microflora. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 44–50. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 17.06.15

Введение

Хорошо известно, что мигрирующий миоэлектрический комплекс (ММК) является маркером нормальной координированной пропульсивной перистальтики тонкой кишки и играет важную роль в предотвращении избыточного бактериального роста и транслокации в кишечнике [1, 2]. Взаимосвязь между ММК и микрофлорой тонкой кишки была впервые установлена в 1977 г. [3]. В 1982 г. в экспериментах на крысах показано, что кратковременное введение морфина в высоких дозах приводит к исчезновению ММК и появлению избыточного бактериального роста в проксимальных отделах тонкой кишки [4]. Позднее было доказано, что и низкие дозы морфина вызывают нарушение генерации ММК и возникновение избыточного бактериального роста в двенадцатиперстной кишке и транслокацию бактерий [5]. Взаимоотношения кишечной моторики и микрофлоры изучены в основном на безмикробных животных. Так, у стерильных крыс было выявлено удлинение цикла ММК по сравнению с группой контрольных животных; введение безмикробным крысам нормальной кишечной микрофлоры приводило к восстановлению продолжительности цикла ММК [6]. Кроме того, в этом же исследовании показано, что анаэробы укорачивают, а аэробы удлиняют цикл ММК при введении их безмикробным животным [6]. В связи с тем, что представители грамположительной флоры являются ведущими патогенами, вызывающими большинство внебольничных инфекций, представляется актуальным оценить влияние широко применяемого антибиотика ванкомицина, активного преимущественно в отношении грамположительных бактерий, на моторику тонкой кишки у животных в естественных условиях.

Цель исследования — изучение изменений в генерации ММК и видового состава микробиоты кишечника в условиях селективной деконтаминации грамположительной микрофлоры у здоровых крыс.

Методика

Исследования выполнены на 14 крысах-самцах Вистар с массой тела 250—300 г. Для предварительной оперативной подготовки крыс опытной группы ($n = 7$) использовали раствор кетамина, который вводили внутривентриально из расчета 0,3 мл на 100 г массы тела. Проводили срединную лапаротомию, вживляли зонд в антральную часть желудка и три игольчатых электрода в стенку начальной части тонкой кишки (5, 10 и 15 см дистальнее связки Трейтца). После фиксации зонд и электроды проводили через мягкие ткани брюшной стенки и тазовой области и затем с помощью специального инструмента протаскивали под кожей хвоста и выводили наружу.

Эксперименты выполняли через 7 сут. после операции (индикатором начала экспериментов являлось наличие нормального ММК при регистрации электромиограмм). Для селективной деконтаминации грамположительной микрофлоры использовали несахаросвязывающийся в ЖКТ антибиотик ванкомицин.

Эксперименты выполняли ежедневно в течение 7 сут. после пищевой депривации. Пищевая депривация длилась 18 ч. Такое время необходимо, чтобы в фоновых записях электрической активности зарегистрировалась «голодная» межпищеварительная активность, которую отражает мигрирующий миоэлектрический комплекс. Исследования начинали с фоновой регистрации электрической активности (1 ч). Затем в желудочный зонд вводили 0,3 мл раствора ванкомицина в дозе 60 мг/кг и продолжали регистрацию электрической активности в течение 1 ч (общее время 2 ч). Затем крысам давали корм. Корм в клетках находился не менее 3 ч после проведения экспериментов. При этом количество съеденного корма соответствовало суточной норме. На 8-е сут. эксперимента у животных опытной и контрольной групп (7 крыс без введения ванкомицина) забирали кал для бактериологического анализа. Затем крыс взвешивали и усыпляли введением летальной дозы наркоза. Вскрывали брюшную полость, проводили забор содержимо-

го тощей кишки (20 см за связкой Трейтца) и слепой кишки для последующего бактериологического анализа.

Во время экспериментов температура воздуха в помещении, в котором находились животные, поддерживалась на уровне 20—24°C. Режим освещенности: с 8 до 20 часов — свет, с 20 до 8 часов — сумеречное освещение.

Электрофизиологические исследования

Записи электрической активности проводили с использованием электронного энцефалографа NVX-52 в полосе от 0,1 Гц до 30 Гц. Выходной сигнал поступал в компьютер IBM PC AT. При обработке данных производили фильтрацию сигналов в полосе 5—30 Гц для выявления спайковой активности.

При анализе электрической активности оценивали ММК. В норме ММК состоит из четко повторяющейся последовательности трех фаз (рис. 1, А): фаза покоя (фаза I) — более 95% медленных волн без пиковых потенциалов (сокращения отсутствуют), фаза нерегулярной активности (фаза II) — пиковые потенциалы возникают не на каждой медленной волне (сокращения происходят нерегулярно) и фаза регулярной ритмической активности (фаза III) — группы

пиковых потенциалов возникают на каждой медленной волне — более 95% медленных волн имеют группы пиковых потенциалов (сокращения происходят регулярно с частотой медленных волн) (рис. 1, Б).

Кроме того, необходимо подчеркнуть, что ММК возникает в проксимальных отделах тонкой кишки и распространяется в каудальном направлении. Достигнув терминальных отделов тонкой кишки, ММК возникает вновь в проксимальных отделах. Поэтому при оценке цикла ММК в одном конкретном месте тонкой кишки, важным является оценка распространения ММК вдоль тонкой кишки. В связи с тем, что основным ориентиром для оценки распространения ММК служит фаза III, а также тот факт, что окончание фазы III характеризуется внезапным исчезновением групп пиковых потенциалов (хотя единичные пиковые потенциалы могут наблюдаться), общепринято, что скорость распространения ММК рассчитывают по скорости распространения фазы III вдоль тонкой кишки.

Определяли следующие параметры ММК:

- количество ММК в 1 ч;
- процент времени каждой из фаз ММК. В часовых записях подсчитывали длительность каждой из

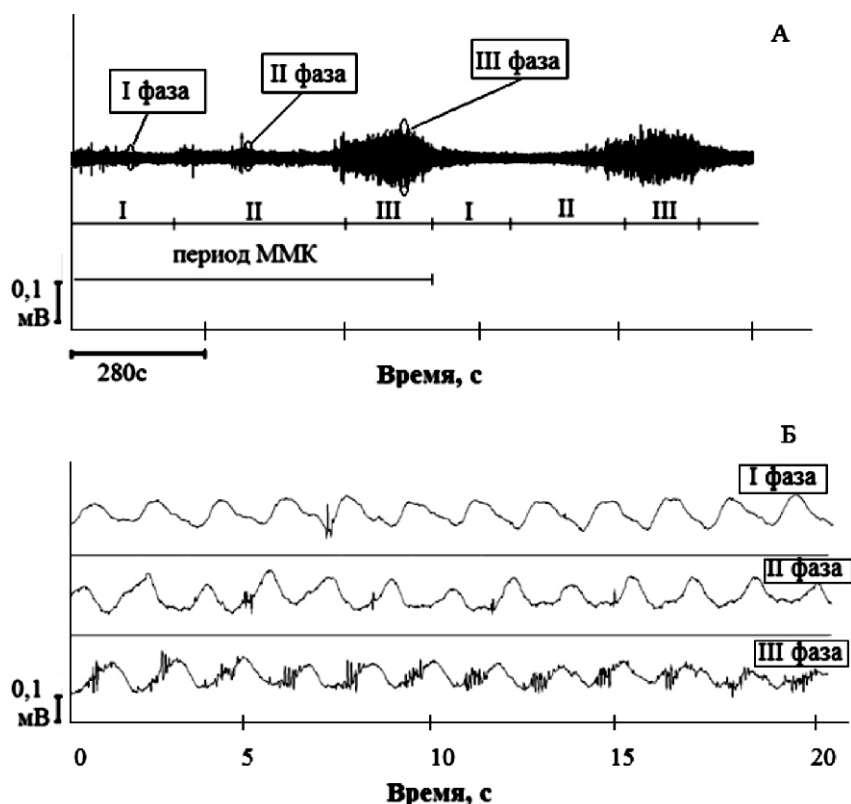


Рис. 1. А — фазы мигрирующего миоэлектрического комплекса (ММК) в норме; Б — медленные волны и пиковые потенциалы в различные фазы ММК (представлены выделенные овалом фрагменты записи из рис. 1 А).

фаз ММК в секундах, затем длительность каждой фазы умножали на 100 и делили на период ММК. При отсутствии какой-либо фазы ММК в часовых записях подсчитывали длительность регистрируемых фаз в секундах, затем длительность каждой фазы умножали на 100, и делили на 3600 с (длительность часовой записи);

- скорость распространения фазы III в тощей кишке — расстояние между двумя соседними вживленными электродами (в нашем случае — 5 см) деленное на время от окончания фазы III на проксимальном (1 (или) 2) электроде до окончания фазы III на дистальном (2 или 3) электроде.

Бактериологические исследования

Микробиологическое исследование кала и содержимого тощей и слепой кишок проводили в соответствии с нормативными документами, принятыми для исследования кала у людей: отраслевым стандартом 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Были изучены 9 групп микроорганизмов (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* (*E.coli*), *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ), *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp.).

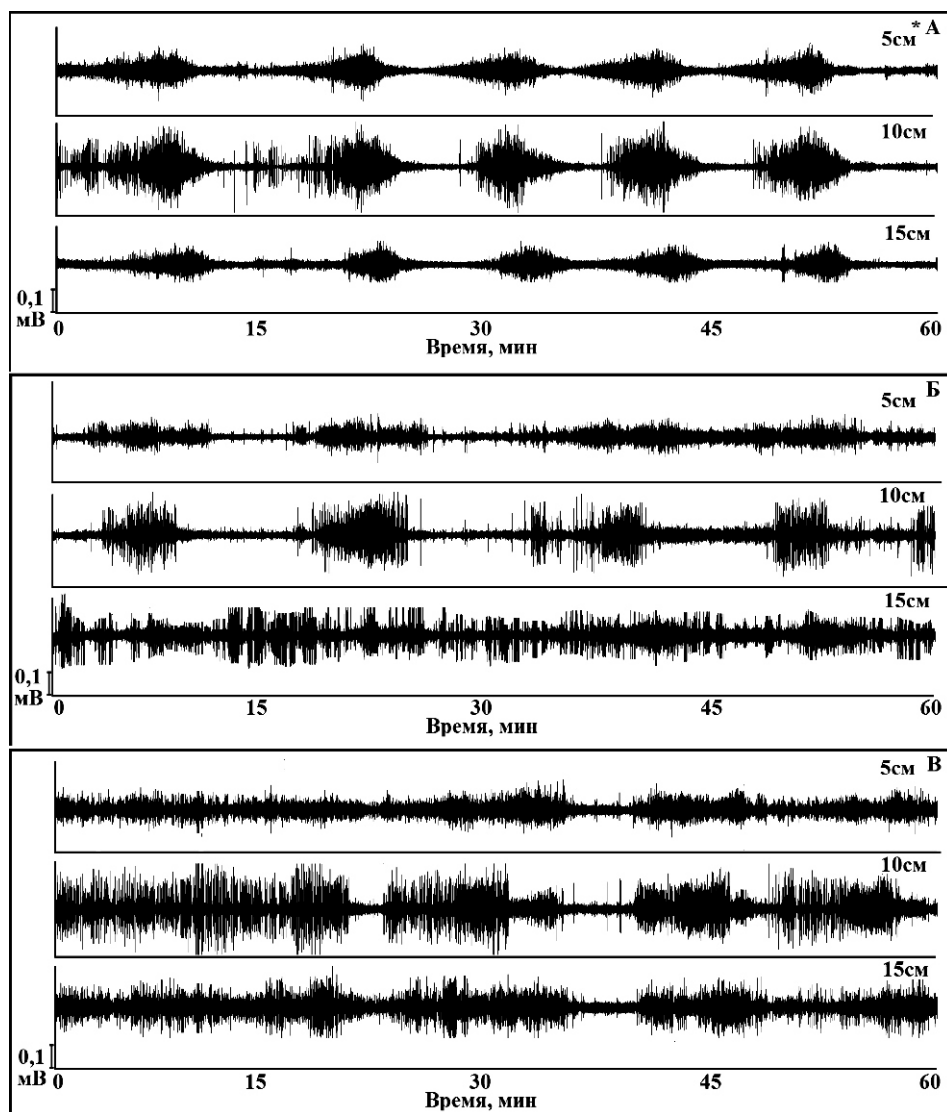


Рис. 2. Динамика изменений электрической активности различных участков тонкой кишки при курсовом введении ванкомицина. А — запись электрической активности различных участков тонкой кишки здоровых животных до введения ванкомицина; Б — фоновая запись электрической активности различных участков тонкой кишки после 4-го введения ванкомицина; В — фоновая запись электрической активности различных участков тонкой кишки после 7-го введения ванкомицина; 5, 10, 15 см — расположение электродов за связкой Трейтца.

Статистическая обработка
результатов исследований

У каждой группы животных для всех параметров рассчитывали медиану и перцентили — Ме (25;75)% и для статистического анализа использовали непараметрические критерии. При сравнении параметров электрической активности до введения ванкомицина с фоновыми значениями в 1—7 сутки введения ванкомицина применяли непараметрический критерий — Т-критерий Уилкоксона. При сравнении данных бактериологических исследований опытной группы с контрольной группой (интактные животные) использовали непараметрический U-критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считались значения с $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В динамике внутрижелудочного введения ванкомицина отмечались нарушения общего состояния животных, проявляющиеся внешней неопрятностью, снижением активности, отмечалось плохое поедание корма, полифекалия или, напротив, снижение количества фекалий по сравнению со здоровыми животными.

До введения ванкомицина в межпищеварительном периоде электрическая активность тощей кишки характеризовалась выраженной ритмичностью с наличием ММК, состоящего из трех последовательных фаз (I, II, III) (рис. 2,А). Регистрировалось 4—5 ММК в час. Скорость распространения фазы III по тощей кишке между 1—2 и 2—3 электродами составляла 2,7 (2,5; 2,8) см/мин и 2,7 (2,2; 2,7) см/мин соответственно. Зарегистрированные параметры ММК соответствовали показателям у здоровых крыс.

В 1-е сут. после введения ванкомицина и до 4-х сут. (включительно) каких-либо выраженных изменений электрической активности тощей кишки не выявлялось. Начиная с 5-х сут. (после 4-го введения ванкомицина), у большинства животных происходили нарастающие нарушения в генерации ММК (рис. 2,Б). Количество ММК уменьшалось до 3—4 в час.

При этом статистически значимо увеличивалась длительность фазы II нерегулярной активности с уменьшением длительности фазы покоя (рис. 3). Скорость распространения фазы III по тощей кишке между 1—2 и 2—3 электродами незначительно уменьшалась и составляла 2,4 (2,1; 3,0) см/мин и 2,3 (2,1; 2,5) см/мин соответственно.

На 8-е сут. (после 7-го введения ванкомицина) количество ММК статистически значимо уменьшалось до 1—2 в час (рис. 2, В). При этом длительность фазы II оставалась увеличенной, а фазы I уменьшенной по сравнению со здоровыми животными. Статистически значимо снижалась длительность фазы III ММК (рис. 3). Скорость распространения фазы III по тощей кишке между 1—2 и 2—3 электродами нарастала и составляла 2,9 (2,9; 2,9) см/мин и 3,3 (3,3; 3,3) см/мин соответственно.

Результаты бактериологических исследований представлены в табл 1 и 2. В контрольной группе у большинства животных в содержимом тощей кишки из 9 групп микроорганизмов присутствовали только *Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp.

Кроме того, у 3 из 7 животных высевались *E.coli* и *Enterococcus* spp. При анализе микрофлоры каждого отдельного животного было установлено, что микробиоценоз тощей кишки здоровых животных был представлен одним, двумя или тремя видами бактерий. В содержимом слепой кишки у всех животных выделяли *E.coli*, и *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacteri-*

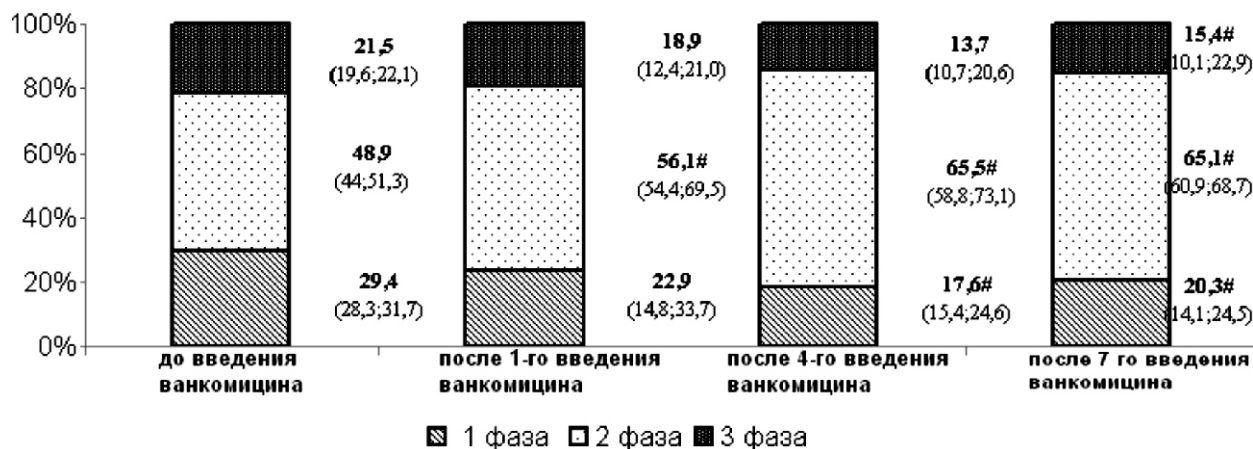


Рис. 3. Динамика длительности фаз ММК в различные сроки после введения ванкомицина. Представлены данные электромиограмм, зарегистрированных с электродов, расположенных на расстоянии 10 см за связкой Трейтца:

— $p < 0,05$, отличия значений параметров до введения и в различные сроки после введения ванкомицина статистически значимы.

um spp. У большинства присутствовали *Enterococcus* spp. У 3 из 7 крыс высевались *Streptococcus* spp., а у 2 из 7 — *Proteus mirabilis*. В целом, микробиоценоз слепой кишки каждого животного был представлен 4, 5 или 6 видами бактерий. В кале у всех животных были выделены *Enterococcus* spp., *E.coli*, *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. У большинства присутствовали *Streptococcus* spp. и *Proteus mirabilis*. У одного животного обнаружены *Staphylococcus* spp. Состав микрофлоры кала каждого животного включал от 4 до 7 видов бактерий.

В опытной группе введение ванкомицина на протяжении 7 сут. существенно изменяло качественный и количественный состав микрофлоры исследуемых от-

делов кишечника. Так, в содержимом тощей кишки у всех животных исчезли *Staphylococcus* spp. Количество *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. не изменилось. У всех животных выявлялись *E.coli*. Статистически значимо возрастало количество *E.coli*, *Proteus mirabilis* и НГОБ. У 2 из 7 животных наблюдалось появление *Klebsiella* spp. Видовое разнообразие микрофлоры тощей кишки у каждого животного увеличилось по сравнению с контролем и составляло от 2 до 4 видов микроорганизмов. В содержимом слепой кишки статистически незначимо уменьшалось количество *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. Количество *Proteus mirabilis* и *Klebsiella* spp., напротив, возрастало, но также было статистически незначимым. При

Таблица 1

Содержание различных видов микроорганизмов в тощей, слепой кишке и кале в контрольной группе (здоровые животные) и в опытной группе (животные после 7-суточного введения ванкомицина) КОЕ/мл, Ме (25; 75)%

Вид микроорганизмов	Тошья		Слепая		Кал	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
<i>Staphylococcus</i> spp.	10 ⁴ (0;10 ⁴)	0(0;0)#	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)
<i>Streptococcus</i> spp.	10 ⁴ (0;10 ⁴)	10 ⁴ (0;10 ⁵)	0(0;10 ³)	0(0;0)	10 ³ (0;10 ⁴)	0(0;0)#
<i>Enterococcus</i> spp.	0(0;10 ⁴)	0(0;10 ⁴)	10 ⁶ (0;10 ⁶)	10 ⁴ (0;10 ⁶)	10 ⁶ (10 ⁶ ;10 ⁶)	0(0;0)*
<i>E.coli</i>	0(0;10 ⁴)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁵)*	10 ⁶ (10 ⁵ ;10 ⁶)	10 ⁵ (10 ⁵ ;10 ⁷)	10 ⁶ (10 ⁵ ;10 ⁶)	10 ⁵ (10 ³ ;10 ⁷)
<i>Proteus mirabilis</i>	0(0;0)	10 ⁴ (0;10 ⁵)#	10 ⁴ (0;10 ⁵)	0(0;10 ⁷)	10 ⁴ (0;10 ⁵)	0(0;10 ⁴)
<i>Klebsiella</i> spp.	0(0;0)	0(0;10 ³)	0(0;0)	0(0;10 ⁵)	0(0;0)	0(0;10 ⁵)
НГОБ	0(0;0)	10 ³ (0;10 ⁴)#	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)
<i>Lactobacillus</i> spp.	0(0;0)	0(0;0)	10 ⁶ (10 ⁵ ;10 ⁶)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁵)*	10 ⁶ (10 ⁵ ;10 ⁶)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁵)*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0(0;0)	0(0;0)	10 ⁶ (10 ⁶ ;10 ⁶)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁵)*	10 ⁶ (10 ⁶ ;10 ⁶)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁵)*

Примечание. * — p<0,01; # — p<0,05 отличия опытной группы от контрольной статистически значимы.

Таблица 2

Представленность различных видов микроорганизмов в тощей, слепой кишке и кале в контрольной группе (здоровые животные) и в опытной группе (животные после 7-суточного введения ванкомицина) и изменение количества микроорганизмов в опытной группе по сравнению с контрольной

Тошья		Слепая		Кал		Вид микроорганизмов	Тошья	Слепая	Кал
Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт				
4/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	<i>Staphylococcus</i> spp.	#		
5/7	4/7	3/7	0/7	4/7	0/7	<i>Streptococcus</i> spp.			#
3/7	3/7	5/7	4/7	7/7	1/7	<i>Enterococcus</i> spp.			*
3/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	<i>E.coli</i>	*		
0/7	4/7	2/7	3/7	4/7	3/7	<i>Proteus mirabilis</i>	#		
0/7	2/7	0/7	3/7	0/7	3/7	<i>Klebsiella</i> spp.			
0/7	4/7	0/7	0/7	0/7	0/7	НГОБ	#		
0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7	<i>Lactobacillus</i> spp.		*	*
0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7	<i>Bifidobacterium</i> spp.		*	*
		↑	0	↓					

этом, статистически значимо уменьшилось количество *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. Видовое разнообразие микрофлоры слепой кишки у каждого животного уменьшалось по сравнению с контролем и составляло от 4 до 5 видов микроорганизмов. В кале статистически значимо уменьшалось количество *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. Статистически незначимо снижалось количество *E.coli* и *Proteus mirabilis*, у 3 из 7 животных обнаружены *Klebsiella* spp. Статистически значимо снижалось количество *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. Видовое разнообразие микрофлоры кала у каждого животного уменьшалось по сравнению с контролем и составляло от 3 до 5 видов микроорганизмов.

В проведенном исследовании селективная деконтаминация грамположительной микрофлоры ванкомицином в течение 7 сут. здоровым животным приводила к урежению цикла ММК и уменьшению числа распространяющихся комплексов и, следовательно, к частичному подавлению пропульсивной перистальтики с компенсаторным увеличением скорости распространения фазы III ММК. Кроме того, наблюдалось увеличение длительности нерегулярной активности с уменьшением времени покоя, что способствовало усилению некоординированных сокращений тонкой кишки. Выявлялось перераспределение состава микрофлоры, выражающееся в увеличении видового разнообразия микроорганизмов в тощей кишке и снижении его в слепой кишке и кале, а также в умеренном снижении численности представителей нормальной микрофлоры в слепой кишке и кале и появлении условно-патогенной грамотрицательной флоры в проксимальных отделах тощей кишки. Уменьшение количества лактобактерий у мышей после курсового введения ванкомицина показано также в исследовании и другими авторами [7]. Отметим, что в тощей кишке значимо возросло количество *E.coli*, *Proteus mirabilis* и НГОБ, при этом *E.coli* выявлялись у всех животных. Полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи увеличения грамотрицательной флоры в проксимальных участках тонкой кишки с нарушением генерации ММК, что согласуется с данными Husebye E. и соавт. [6, 8]. При радиационной энтеропатии у пациентов ими была выявлена высокая степень

колонизации проксимальных отделов тонкой кишки грамотрицательными бактериями с нарушениями цикла ММК [8]. Кроме того, урежение цикла ММК было продемонстрировано в экспериментах с введением *E.coli* безмикробным животным [6].

Таким образом, обнаруженное в настоящем исследовании частичное подавление пропульсивной перистальтики и увеличение числа некоординированных сокращений тонкой кишки под влиянием селективной деконтаминации грамположительной флоры способствует возникновению синдрома избыточного бактериального роста, частично связанного, по-видимому, с миграцией фекальной микрофлоры в верхние отделы тонкой кишки.

References

1. Gasbarrini A., Lauritano E.C., Garcovich M., Sparano L., Gasbarrini G. New insights into the pathophysiology of IBS: intestinal microflora, gas production and gut motility. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2008; 12 (Suppl. 1): 111-117.
2. Quigley E.M. Microflora Modulation of Motility. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2011; 17(2): 140-147.
3. Vantrappen G., Janssens J., Hellems J., Ghoo Y. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J. Clin. Invest.* 1977; 59 (6): 1158-1166.
4. Scott L.D., Cahall D.L. Influence of the interdigestive myoelectric complex on enteric flora in the rat. *Gastroenterology.* 1982; 82 (4):737-745.
5. Nieuwenhuijs V.B., Verheem A., van Duijvenbode-Beumer H., Visser M.R., Verhoef J., Gooszen H.G. et al. The Role of Interdigestive Small Bowel Motility in the Regulation of Gut Microflora, Bacterial Overgrowth, and Bacterial Translocation in Rats. *Ann. Surg.* 1998; 228(2): 188-193.
6. Husebye E., Hellstrom P.M., Sundler F., Chen J., Midtvedt T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001; 280 (3): G368-G380.
7. Ubeda C., Taur Y., Jenq R.R., Equinda M.J., Son T., Samstein M. et al Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J. Clin. Invest.* 2010; 120(12): 4332-4341.
8. Husebye E., Skar V., Hoverstad T., Iversen T., Melby K. Abnormal intestinal motor patterns explain enteric colonization with Gram-negative bacilli in late radiation enteropathy. *Gastroenterology.* 1995; 109 (4):1078-1089.

Сведения об авторах:

Шашкова Ирина Геннадьевна, лаборант-исследователь научной лаб. экспер. патологии ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

Черненко Татьяна Витальевна, канд. мед наук, завед. научной лаб. клин. микробиологии ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

Попова Тамара Сергеевна, доктор биол. наук, проф., завед. научной лаб. экспер. патологии ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

Чегодарь Д.В., Кубышкин А.В.

Влияние раствора наносеребра на процессы неспецифического протеолиза в слизистой желудка при профилактике и лечении экспериментальной язвы желудка

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»,
295006, Республика Крым, Симферополь, бульвар Ленина 5/7

Цель исследования: изучение на модели острой язвы желудка эффектов раствора наносеребра при профилактическом и лечебном пероральном применении. **Методика.** Экспериментальное исследование было проведено на 49 белых крысах-самцах Wistar. В 1-й серии экспериментов крысы 1-й группы ($n = 10$) в течение 21 сут. поили раствором наносеребра концентрация (0,01 г/л), во 2-й группе ($n = 10$) — дистиллированной водой. Через 21 сут. в обеих группах моделировали язву желудка подкожным введением животным индометацина в дозировке 35 мг/кг массы тела после 24 ч голодовки. Во 2-й серии сначала моделировали острую язву слизистой желудка вышеописанным способом, а затем в течение 21 сут. крысы 1-й группы ($n = 10$) поили раствором наносеребра концентрация (0,01 г/л), 2-й группы ($n = 10$) — дистиллированной водой. В качестве контроля использовали группу интактных животных ($n = 9$), которых в течение 21 сут. поили дистиллированной водой. Определяли показатели эластазаподобной, трипсинаподобной и антитриптической активностей, кислотостабильных ингибиторов в сыворотке крови и супернатанте гомогената слизистой желудка с использованием энзиматических методов. **Результаты.** Установлено, что профилактический пероральный прием раствора наносеребра при моделировании острой язвы желудка способствовал менее выраженной активации неспецифических протеиназ и сохранению в слизистой желудка антипротеиназного потенциала на достаточно высоком уровне. Применение раствора наносеребра с лечебной целью при моделировании острой язвы желудка сопровождалось на местном уровне существенным повышением активности ингибиторов протеиназ на фоне снижения активности неспецифических протеиназ. Отмечено уменьшение морфологических признаков воспаления в слизистой желудка на фоне профилактического и лечебного приема раствора наносеребра. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что раствор наносеребра при профилактическом и лечебном применении обладает способностью блокировать развитие язвенных дефектов в слизистой желудка, что подтверждается статистически значимым снижением степени активации протеолитических ферментов с одновременным увеличением антипротеиназного потенциала, а также интенсификацией репаративных процессов в поврежденных тканях.

Ключевые слова: язва желудка, наносеребро, протеиназы, ингибиторы протеиназ, воспаление

Для корреспонденции: Кубышкин Анатолий Владимирович, e-mail: Kubyshkin_av@mail.ru

Для цитирования: Чегодарь Д.В., Кубышкин А.В. Влияние раствора наносеребра на процессы неспецифического протеолиза в слизистой желудка при профилактике и лечении экспериментальной язвы желудка. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 51–56.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках базовой части госзадания по проекту №3884.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.02.16

Chegodar D.V., Kybushkin A.V.

The influence of nanosilver solution on nonspecific proteolysis processes in gastric mucosa in prophylactic and treatment of experimental gastric ulcer

Medical academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Department of general and clinical pathophysiology,
295006, Republic Crimea, Simferopol, Lenin Blvd. 5/7

The purpose: studying the effects of nanosilver solution in prophylactic and therapeutic oral application in the simulation of acute gastric ulcers based on assessment of reactions of non-specific proteases and their inhibitors at a systemic and local level. **Methods.** The experimental research was carried out on 49 white male rats of «Wistar» line. In the first series of experiments, nanosilver solution at the concentration of 0.01 g/l was given to drink to the rats of the first group ($n = 10$) during 21 days, distilled water — in the second group ($n = 10$). After 21 days in both groups was performed simulation of gastric

ulcers by subcutaneous administration of indomethacin at a dosage of 35 mg/kg body weight after 24 hours of hunger. In a second series of experiments, at first was performed simulation of gastric ulcers, and then for 21 days, nanosilver solution at the concentration of 0.01 g/l was given to drink to the first group of rats ($n = 10$), distilled water — to the second group ($n = 10$). Group of intact animals ($n = 9$) which drank a distilled water within 21 day was used as a control. Parameters of elastase like activity, trypsin like activity, antitrypsin like activity, acid-stable inhibitors in serum and supernatant of gastric mucosa homogenate was determined with the help of enzymatic methods. **Results.** It has been found out that prophylactic oral application of nanosilver in modeling acute gastric ulcer contributed less pronounced activation of non-specific proteases and preservation in the gastric mucosa of the inhibitory capacity at a sufficiently high level. The therapeutic use of nanosilver solution in modeling acute gastric ulcer was accompanied by significant increase of proteinase inhibitors on the background of decreased activity of non-specific proteases at the local level. Prophylactic and therapeutic application of nanosilver solution is accompanied by decrease in morphological signs of inflammation in gastric mucosa. **Conclusion.** The results showed that nanosilver solution has the ability to block the development of ulcers in the stomach mucosa in the prophylactic and therapeutic application, which was confirmed by a statistically significant reduction in the degree of activation of proteolytic enzymes while increasing antiproteinases potential as well as the intensification of reparative processes of damaged tissue.

Keywords: gastric ulcer, nanosilver, proteinases, proteinase inhibitors, inflammation.

For correspondence: Anatoliy V. Kubyshkin, Doctor of Medical Science, Professor, Head of General and Clinical Pathophysiology Department, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU; 5/7, Lenin Blvd., Simferopol, 295006, Republic Crimea, e-mail: anatology2802@gmail.com

For citation: Chegodar D.V., Kybushkin A.V. The influence of nanosilver solution on nonspecific proteolysis processes in gastric mucosa in prophylactic and treatment of experimental gastric ulcer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 51–56. (in Russ).

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

Funding. This work was supported by the RF Ministry of Education and Research as part of the project №3884.

Information about authors:

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

Chegodar D.V., <http://orcid.org/0000-0001-8067-6411>

Received 20.02.16

Введение

Наномедицина является одним из активно развивающихся научных направлений медицинской науки [1]. К числу наиболее приоритетных и перспективных задач наномедицины в настоящее время относят использование нанотехнологических подходов для трансформации структуры металлов, приобретающих в наноразмерном диапазоне выраженную биологическую активность [2—4]. В связи с этим особый интерес представляет возможность использования наночастиц серебра, обладающего среди металлов, как известно, наиболее сильным бактерицидным действием. Применение серебра в виде наночастиц имеет ряд преимуществ: во-первых, снижается в сотни раз концентрация металла при сохранении всех его бактерицидных свойств, во-вторых, увеличивается адсорбционная емкость наночастиц за счет большей удельной поверхности, что значительно усиливает способность наносеребра связываться с микроорганизмами [5].

Наносеребро обладает выраженным антибактериальным действием по отношению к широкому спектру патогенных бактерий [6], в том числе имеются указания на антихеликобактерную активность наносеребра [7]. В настоящее время продолжают исследования

по изучению противовоспалительных эффектов наносеребра, связанных, в первую очередь, с его антимикробной активностью [8, 9].

Цель исследования — изучение эффектов наносеребра при профилактическом и лечебном пероральном применении при моделировании острой язвы желудка.

Методика

Экспериментальное исследование проведено на 49 белых крысах-самцах Wistar с массой тела 180—210 г. Исследование было одобрено комитетом по биоэтике Крымского государственного медицинского университета. Проведение эксперимента осуществляли с соблюдением принципов Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1985 г.).

В 1-й серии изучали эффект перорального введения наносеребра в качестве профилактики формирования язвенного дефекта слизистой желудка. Лабораторных животных опытной группы ($n = 10$) в течение 21 сут. поили раствором наносеребра (концентрация

0,01 г/л). В качестве контроля ($n = 10$) использовали животных, содержащихся при свободном доступе к дистиллированной воде. По окончании указанного периода в обеих группах моделировали язву желудка подкожным введением животным индометацина в дозировке 35 мг/кг массы после 24 ч голодания. Эвтаназию животных осуществляли через 24 ч после моделирования язвы желудка под эфирным наркозом путем декапитации с последующим забором материала.

Во 2-й серии изучали эффекты наносеребра в качестве лечебного средства при язвенном повреждении слизистой желудка. В начале эксперимента у крыс опытной и контрольной группы моделировали острую индометациновую язву желудка. Затем в течение 21 сут. животных опытной группы ($n = 10$) поили только раствором наносеребра (концентрация 0,01 г/л), контрольной ($n = 10$) — дистиллированной водой. Эвтаназию животных осуществляли по окончании указанного времени путем декапитации под эфирным наркозом с последующим забором материала. В качестве контроля в 1-й и 2-й сериях экспериментов использовали группу интактных животных ($n = 9$), которых в течение 21 сут. поили исключительно дистиллированной водой.

Для работы использовали раствор наносеребра, разработанный в Таврическом национальном университете с участием сотрудников Института биологии южных морей [10]. В состав исследуемого раствора входят: наночастицы серебра размером 10—20 нм (0,1%), альгинат натрия (0,6%) и дистиллированная вода (99,3%). Исходный раствор до начала экспериментального исследования был разведен дистиллированной водой в соотношении 1:99.

Материалом для исследований служила сыворотка крови и супернатант гомогената слизистой желудка, который получали по методике Скоупс Р. [11]. Активность компонентов протеиназ-ингибиторной системы определяли энзиматическими методами [12] на спектрофотометре «Biomat 5» (Великобритания). Метод определения трипсиноподобной активности (ТПА) основан на спектрофотометрическом измерении скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата N-бензоил-L-аргинина этилового эфира (БАЭЭ). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) проводили на основании изучения скорости гидролиза синтетического субстрата N-t-ВОС-аланил-р-нитрофинилового эфира (БАНФЭ). Определение концентрации альфа-1-ингибитора протеиназ (АТА) проводили на основании торможения расщепления трипсином БАЭЭ. Аналогично определялась активность кислотостабильных ингибиторов (КСИ) после предварительной подготовки материала прогреванием в кислой

среде. Белок во всех образцах определяли методом Лоури.

Для оценки патоморфологических изменений в тканях желудка готовили парафиновые серийные срезы толщиной 4—5 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином. Просмотр и цифровые фотографии микропрепаратов осуществляли с помощью светового микроскопа «Olympus CX-41».

Статистическую обработку проводили методами вариационной статистики с оценкой статистической значимости изменений с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований представлены в табл. 1 и 2. В 1-й серии при профилактическом применении раствора наносеребра через 24 ч после моделирования язвы желудка в сыворотке крови животных существенных сдвигов в протеиназ-ингибиторной системе не наблюдалось, за исключением тенденции к повышению эластазоподобных и трипсиноподобных протеаз на фоне повышения антитриптической активности.

На местном уровне через 24 ч в супернатанте гомогената слизистой после моделирования язвенного повреждения слизистой желудка наблюдались более выраженные сдвиги показателей протеиназ-ингибиторной системы, о чем свидетельствовало статистически значимое увеличение уровней ЭПА на 160% и ТПА на 45% по сравнению с контролем. Причем на фоне роста активности протеиназ происходило значимое снижение уровня антитриптической активности и кислотостабильных ингибиторов на 40% и 33% соответственно.

Использование раствора наносеребра *per os* в течение 21 сут. в качестве профилактики приводило к менее выраженной активации протеиназ-ингибиторной системы. Причем, если на системном уровне отмечена лишь тенденция к снижению активности неспецифических протеиназ, то на местном уровне в слизистой оболочке желудка отмечалась существенно менее выраженная активация протеолитических ферментов с сохранением достаточно высокого ингибиторного потенциала. Уровень активации эластазоподобной и трипсиноподобной активностей был на 30% и 37% соответственно ниже средних показателей в группе с моделированием язвы желудка, при этом показатели трипсиноподобной активности были на уровне контрольных величин. Активность ингибиторов протеиназ сохранялись на относительно высоком уровне, о чем свидетельствовала более высокая антитриптическая активность (на 38% выше по сравнению с группой без применения наносеребра). При

этом и уровень кислотостабильных ингибиторов был на 21% выше (табл. 1).

Сдвиги в системе протеолиза в конце 1-х сут. после моделирования острой язвы желудка сопровождались выраженными воспалительно-деструктивными изменениями в слизистой оболочке. Отмечался выраженный отек, полнокровие сосудов, массивная нейтрофильная инфильтрация. Дном язвенного дефекта являлся мышечный слой, покрытый лейкоцитарно-тканевым детритом и фибринозным экссудатом.

В группе с пероральным профилактическим применением раствора наносеребра также обнаруживался язвенный дефект с воспалительной гиперемией и отеком, однако глубина язвы и выраженность лейкоцитарной инфильтрации были существенно менее выражены.

Во 2-й серии изучали лечебный эффект наносеребра при язвенном повреждении слизистой желудка. Результаты показали, что через 21 сут. после моделирования язвы желудка наиболее существенные сдвиги в системе протеолиза были отмечены только на местном уровне. В сыворотке крови наблюдались статистически незначительные колебания показателей активности протеиназ-ингибиторной системы, с тенденцией к повышению уровня антитриптической активности, что говорит об усилении на системном уровне ингибиторного потенциала.

На местном уровне в супернатанте гомогената слизистой желудка при моделировании язвы желудка, наблюдалась, как было отмечено выше, более существенная активация компонентов системы протеолиза, о чем свидетельствовало статистически значи-

мое увеличение эластазаподобной (на 115%) и трипсиноподобной (на 45%) активности по сравнению с контролем. Ингибиторный потенциал при этом характеризовался снижением показателей ниже уровня контроля, что проявлялось уменьшением антитриптической активности и уровня кислотостабильных ингибиторов на 44% и на 30% соответственно.

Следует отметить, что если моделирование язвы желудка приводило к существенной активации компонентов протеиназ-ингибиторной системы, то на фоне перорального применения раствора наносеребра при язвенном повреждении слизистой желудка активация системы протеолиза была менее выражена. В сыворотке крови существенной активации системы протеолиза не выявлено, средние значения показателей активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в группе с пероральным применением наносеребра практически не отличались от контроля.

На местном уровне в супернатанте слизистой желудка при пероральном лечении язвенного повреждения слизистой желудка раствором наносеребра, наблюдалось статистически значимое снижение степени активации протеолитических ферментов с одновременным увеличением ингибиторного потенциала. Об этих изменениях свидетельствовало снижение эластазаподобной активности на 30% и трипсиноподобной активности на 25% по сравнению с группой без применения наносеребра, причем значения трипсиноподобной активности соответствовали группе контроля. Показатели, характеризующие ингибиторный потенциал, при этом, напротив, повышались, о чем свидетельствовало статистически значимое увеличение ан-

Таблица 1

Изменение показателей протеиназ и их ингибиторов в супернатанте гомогената слизистой желудка при профилактике язвы желудка перорально раствором наносеребра

Показатели		Контроль	Язва желудка	Наносеребро + язва
Эластазаподобная активность, мкмоль/мг мин	n	9	10	10
	M ± m	29,60 ± 3,47	76,94 ± 7,34	54,00 ± 2,76
	p ₁		<0,001	<0,01
Трипсиноподобная активность, мкмоль/мг мин	p ₂			<0,001
	M ± m	29,09 ± 3,32	42,35 ± 6,25	26,72 ± 5,58
	p ₁		<0,05	>0,5
Антитриптическая активность, ИЕ/мг	p ₂			<0,05
	M ± m	78,74 ± 4,14	46,97 ± 6,94	65,06 ± 5,71
	p ₁		<0,001	<0,05
Кислотостабильные ингибиторы, ИЕ/мг	p ₂			<0,05
	M ± m	21,01 ± 2,66	14,07 ± 0,23	17,10 ± 1,03
	p ₁		<0,01	>0,25
	p ₂			<0,05

Примечание. p₁ — статистически значимые различия по отношению к контролю; p₂ — по отношению к группе с моделированием язвы желудка

титриптической активности (на 129%) по сравнению с группой с моделированием язвы желудка без применения наносеребра и на 27% в сравнении с контрольной группой. Значение показателей кислотостабильных ингибиторов оставалось на уровне контроля, вместе с тем, по сравнению с группой без применения наносеребра уровень кислотостабильных ингибиторов достоверно был выше на 33% (табл. 2).

Результаты биохимических методов исследования коррелировали с выраженностью морфологических изменений в тканях желудка. В контрольной группе через 21 сут. после моделирования язвы слизистая оболочка желудка крыс демонстрировала не резко выраженные изменения воспалительно-деструктивного характера. Определялся отек, очаговая нейтрофильная инфильтрация, полнокровие сосудов. В поверхностных отделах слизистой оболочки выявлялась неглубокая эрозия, покрытая лейкоцитарно-тканевым детритом и фибринозно-гнойным экссудатом.

На фоне перорального применения раствора наносеребра морфологическая картина характеризовалась присутствием неглубоких эрозий с сохранением части слизистой оболочки на фоне отека и полнокровия сосудов. В воспалительном инфильтрате обнаруживались лимфоциты, единичные эозинофилы, плазматические клетки и макрофаги, что говорит об усилении пролиферативных процессов в слизистой желудка.

Таким образом, противовоспалительные эффекты раствора наносеребра при моделировании острой язвы желудка проявлялись как при профилактическом, так и при лечебном применении наносеребра.

Показано, что моделирование острой язвы слизистой желудка, помимо характерных морфологических изменений, сопровождается активацией компонентов системы протеолиза на местном уровне с увеличением эластазаподобной и трипсиноподобной активности при одновременном снижении антитриптической активности и уровня кислотостабильных ингибиторов. Изменения проявлялись уже к концу 1-х суток и сохранялись в течение 21 сут. после моделирования язвы.

Превентивное использование раствора наносеребра в качестве профилактического средства снижало выраженность язвенного повреждения слизистой желудка по сравнению с группой контроля. Менее выраженной была активация неспецифических протеиназ, напротив, ингибиторный потенциал сохранялся на достаточно высоком уровне, что сопровождалось более выраженным противовоспалительным эффектом. Более высокий уровень ингибиторов протеиназ на местном уровне сопровождался снижением активности неспецифических протеиназ. Причем как при профилактическом, так и при лечебном применении наносеребра признаки воспалительной альтерации были менее выражены.

Следует отметить, что в предложенной композиции определенное влияние на формирование язвенного повреждения может оказывать и альгинат натрия. Известно, что фармацевтические препараты, имеющие в своем составе альгинат натрия, такие, как гевискон, гевискон форте, нашли широкое применение в гастроэнтерологической практике для купирования изжоги и лечения гастроэзофагеальной

Таблица 2

Изменение показателей протеиназ и их ингибиторов в супернатанте гомогената слизистой желудка при лечении язвы желудка перорально раствором наносеребра

Показатели	n	Контроль	Язва желудка	Язва + наносеребро
		9	10	10
Эластазаподобная активность, мкмоль/мг мин	M ± m	29,60 ± 3,47	63,79 ± 8,67	44,54 ± 5,64
	p ₁		<0,001	<0,001
	p ₂			<0,05
Трипсиноподобная активность, мкмоль/мг мин	M ± m	29,09 ± 3,32	42,28 ± 5,57	31,72 ± 1,66
	p ₁		<0,05	>0,5
	p ₂			<0,05
Антитриптическая активность, ИЕ/мг	M ± m	78,74 ± 4,14	43,68 ± 7,30	100,10 ± 7,32
	p ₁		<0,001	<0,01
	p ₂			<0,001
Кислотостабильные ингибиторы, ИЕ/мг	M ± m	21,01 ± 2,66	14,63 ± 0,76	19,52 ± 2,40
	p ₁		<0,001	>0,5
	p ₂			<0,001

Примечание. p₁ — статистически значимое по отношению к контролю; p₂ — статистически значимое по отношению к группе с моделированием язвы желудка.

References

рефлюксной болезни. Эффекты альгината натрия связывают, прежде всего, с антирефлюксным действием, который заключается в формировании механического барьера-плота, предупреждающего заброс содержимого желудка в пищевод, и ликвидации кислотной агрессии путем образования так называемого геля, который предохраняет слизистую оболочку пищевода [13—15]. Кроме того, ректальные суппозитории на основе альгината натрия, такие как альгинатол, натальсид, обладающие репаративным, гемостатическим, противовоспалительным действием, применяют при хроническом кровоточащем геморрое, анальных трещинах, проктосигмоидитах, воспалительных явлениях, присутствующих в прямой кишке после операции.

В любом случае, комплексный раствор на основе наночастиц серебра в матрице альгината натрия способствует формированию менее выраженных проявлений воспалительного процесса при профилактике формирования язвенного дефекта и лечения острой язвы желудка, что обосновывает возможность его использования для профилактики и лечения язв гастродуоденальной зоны.

Выводы

1. Превентивное пероральное использование раствора наносеребра уменьшает выраженность язвенных повреждений слизистой желудка при моделировании язвы желудка и низкий уровень активации неспецифических протеиназ с сохранением высокого ингибиторного потенциала по сравнению с группой без применения наносеребра.

2. Лечебное применение раствора наносеребра характеризуется выраженным противовоспалительным действием, статистически значимым снижением активности протеолитических ферментов с одновременным увеличением ингибиторного потенциала, а также интенсификацией репаративных процессов в поврежденных тканях.

3. Наносеребро в матрице альгината натрия обладает способностью блокировать развитие язвенных дефектов в слизистой желудка, что свидетельствует о его потенциальной эффективности в профилактике и лечении язвенных повреждений желудка.

Сведения об авторах:

Чегодарь Денис Владимирович, ассистент кафедры общей и клинической патофизиологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

Кубышкин Анатолий Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

1. Zharasova Zh.S., Kononets I.E. Perspectives of nanotechnology in medicine. *Vestnik KGMA im. I.K. Akunbaeva*. 2011; 2: 97-9. (in Russian)
2. Chen X., Schlusener H.J. Nanosilver: nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* 2008; 176(1): 1-12.
3. Zhang L, Gu F.X., Chan J.M. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008; 83(5): 761-9.
4. Egorova E.M., Kubatiev A.A., Shvec V.I. *Biological effects of metal nanoparticles [Biologicheskie efekty nanochastits metallov]*. Moscow: Nauka Publ.; 2014. (in Russian)
5. Chekman I.S., Movchan B.A., Zagorodnyj M.I., Gaponov Ju.V., Kurapov Ju.A., Krushinskaja L.A., Kardash M.V. Nanosilver: technologies of production, pharmacological properties, indications to application. *Iskusstvo lechenija*. 2008; 5(51): 32-4. (in Russian)
6. Bukina Ju.A., Sergeeva E.A. The antibacterial properties and mechanism of bactericidal action of silver nanoparticles and ions. *Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta*. 2012; 14: 170-2. (in Russian)
7. Amin M., F. Anwar, M. Ramzan Saeed Ashraf Janjua et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles through Reduction with Solanum xanthocarpum L. Berry Extract: Characterization, Antimicrobial and Urease Inhibitory Activities against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 9923-41.
8. Nadworny P., Wang J.F., Tredget E., Burrell R. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis. *Journal of Inflammation*. 2010; 7(13): 1-20.
9. Seung-Heon S., Mi-Kyung Y. The Effect of Nano-Silver on Allergic Rhinitis Model in Mice. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*. 2012; 5(4): 222-7.
10. Babanin A.A., Kubyshev A.V., Ermola Yu.A., Chegodar D.V., Yurkova I.N., Fedosov M.I. Changes of nonspecific proteinases and free-radical oxidation processes in treatment of experimental peritonitis with the nanobiosilver solution. *The New Armenian Medical Journal*. 2014; 8(1): 46-51.
11. Skoups R. Protein purification. [*Metody ochistki belkov*] Москва: Mir; 1985. (in Russian)
12. Kubyshev A.V., Fomochkina I.I. Elastolytic activity in bronchoalveolar lavage fluid in acute lung inflammatory injury. *Ukrain'skiy Biokhim. Zhurnal*. 2008; 80(1): 89-95 (in Russian)
13. Uspensky Yu.A., Baryshnikova N.V. Heartburn and gastroesophageal reflux disease in the pregnant: urgency of alginates use. *Lechachshiy vrach*. 2012; 11: 17-20. (in Russian)
14. Uspensky Yu.P., Baryshnikova N.V., Pakhomova I.G. Clinical prospects of application of alginate-based agents in the treatment of gastroesophageal reflux disease. *RZhGGK*. 2009; 2: 79-84. (in Russian)
15. Khasina E.I., Krivonogova A.S. The protective effect of sodium alginate against damage of the stomach induced by emotional stress, indomethacin and pesticide. *Agrarnyy vestnik Urala*. 2009; 11(65): 92-4. (in Russian)

Звягина Т.С., Горбенко Н.И., Бориков А.Ю.

Влияние таурина на биоэнергетические процессы митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности

Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского Национальной академии наук Украины», ул. Артёма, д. 10, г. Харьков, Украина, 61002

Исследовано влияние таурина на функциональную активность митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности, индуцированным высокофруктозной диетой. Установлено, что таурин тормозит развитие инсулинорезистентности и интолерантности к углеводам, накопление висцерального жира и увеличение прироста массы тела. Показано, что использование таурина у животных с синдромом инсулинорезистентности способствует снижению митохондриальной дисфункции в сердце, нормализуя скорость АДФ-стимулированного дыхания в метаболическом состоянии 3 в присутствии НАД-зависимых субстратов. Полученные результаты могут указывать на восстановление процессов окислительного фосфорилирования на уровне комплекса I электрон-транспортной цепи митохондрий сердца при синдроме инсулинорезистентности. Выявленные фармакологические свойства таурина свидетельствуют о перспективности его применения с целью профилактики и лечения сердечно-сосудистой патологии при метаболическом синдроме.

Ключевые слова: таурин, инсулинорезистентность, митохондрии

Для корреспонденции: Звягина Татьяна Сергеевна, e-mail: tszvyagina@mail.ru

Для цитирования: Звягина Т.С., Горбенко Н.И., Бориков А.Ю. Влияние таурина на биоэнергетические процессы митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(2): 57–62

Конфликт интересов: нет конфликта интересов.

Поступила 24.11.14

Zvyagina T.S., Gorbenko N.I., Borikov A.Y.

Taurine influence on heart mitochondrial bioenergy processes of rats with insulin resistance syndrome

State institution «V. Danilevsky institute for endocrine pathology problems National academy of medical sciences of Ukraine», 10, Artyoma Str., 61002, Kharkov, Ukraine

Taurine impact on heart mitochondria functional activity of rats with metabolic syndrome induced by high fructose diet was investigated. It has been established that taurine suppresses insulin resistance and carbohydrates intolerance, visceral fat accumulation and body mass gain increase. It was shown taurine application in animals with insulin resistance syndrome favours mitochondrial dysfunction decrease in heart due to normalization of ADF-stimulated respiration rate in the metabolic state 3 in NAD-dependend substrates presence. Given results can indicate oxidative phosphorylation processes restoration at the complex I of heart mitochondrial electron transport chain under insulin resistance syndrome. Pharmacological properties of taurine that indicate its application advisability to cardiovascular pathology and metabolic syndrome prevention and treatment were detected.

Keywords: taurine, insulin resistance, mitochondria

For correspondence: Zvyagina T.S., e-mail: tszvyagina@mail.ru

For citation: Zvyagina T.S., Gorbenko N.I., Borikov A.Y. Taurine influence on heart mitochondrial bioenergy processes of rats with insulin resistance syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 57–62. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 24.11.14

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания остаются основной причиной инвалидизации и смерти населения в большинстве развитых стран мира. Известно, что синдром инсулинорезистентности или метаболический синдром (МС) в 5 раз увеличивает риск развития кардиоваскулярных патологий по сравнению с лицами без признаков данного синдрома. МС характеризуется комбинацией нескольких факторов кардиометаболического риска, включая инсулинорезистентность, атерогенную дислипидемию, абдоминальное ожирение и гипертензию [1, 2].

Установлено, что важную роль в патогенезе инсулинорезистентности играет митохондриальная дисфункция, которая развивается в результате чрезмерного поступления энергетических субстратов на фоне низкой физической активности и проявляется в снижении биогенеза митохондрий, их окислительной способности и увеличении генерации активных форм кислорода (АФК). Последние, в свою очередь, способствуют усугублению дисфункции митохондрий, повреждению биомолекул, что приводит к нарушению основных метаболических путей, включая цепь переноса электронов. Митохондриальная ДНК является одной из наиболее уязвимых мишеней для супероксид аниона и других радикалов кислорода, что приводит к эпигенетическим модификациям и синтезу мутантных белков. Кроме того, оксидативный стресс, обусловленный избыточной продукцией АФК, индуцирует инсулинорезистентность и активирует провоспалительные пути, что способствует развитию атеросклероза и кардиомиопатии [1, 3—8].

Восстановление функции и окислительно-восстановительного баланса митохондрий, может быть одним из направлений восстановления чувствительности к инсулину и коррекции нарушений, ассоциированных с МС. В связи с этим представляется перспективным использование природной аминокислоты таурина, выполняющей важную роль в поддержании буферной ёмкости митохондрий и обладающей выраженными антиоксидантными свойствами.

Таурин в химическом отношении является аминокислотой, которая присутствует в свободном состоянии во всех тканях и органах человека и животных [9, 10]. Установлено, что таурин выполняет ряд важных биологических функций, а именно: принимает участие в конъюгации жёлчных кислот, регулирует обмен кальция, калия и натрия, проявляет гипогликемические, противовоспалительные и антиоксидантные свойства, препятствует развитию ожирения, улучшает функцию сосудов [11—13]. Следует отметить, что таурин обеспечивает оптимальный уровень рН для работы ферментов митохондриального матрикса, а также образует конъюгаты с остатками уридина

в wobble положении тРНК (5-таурометилуридин). Показано, что при уменьшении его содержания в митохондриях снижается дыхательная функция, генерация АТФ, что сопровождается увеличением продукции АФК [14, 15].

Цель исследования — изучение влияния таурина на функциональную активность митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности.

Методика

Самцов крыс Вистар ($n = 18$) массой 200—250 г содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и режиме питания, рекомендованном для данного вида животных. Модель МС воспроизводили хроническим (в течение 2 мес.) поступлением фруктозы с питьевой водой в концентрации 200 г/л [16]. Исследования проводили в соответствии с национальными «Общими этическими принципами экспериментов на животных», что соответствует приказу МОЗ Украины № 944 «Порядок проведения доклинического изучения лекарственных средств» от 14.12.2009 г., а также требованиями GLP [17].

Таурин применяли в виде водной суспензии в дозе 100 мг на кг массы тела на протяжении 8 нед., начиная с первого дня эксперимента. Суспензию вводили внутривентрикулярно при помощи зонда. Контрольная группа по аналогичной схеме получала растворитель (вода). Таким образом, в исследовании было сформировано три экспериментальные группы: 1 — интактный контроль; 2 — высокофруктозная диета (ВФД) + растворитель; 3 — ВФД + таурин.

Митохондрии сердца крыс получали методом дифференциального центрифугирования при 7000 г в среде, содержащей 10 мМ Трис-НСl буфера рН 7.4, 250 мМ сахарозы, 10 мМ ЭДТА и 0,5% БСА. Дыхание митохондрий регистрировали с помощью закрытого кислородного электрода Кларка в кювете с постоянной температурой (30 С) в реакционной среде инкубации следующего состава: 150 мМ сахароза, 75 мМ КСl, 10 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4). АДФ добавляли в среду инкубации в концентрации 200 мкМ, субстраты окисления: глутамат + малат — 5 мМ, сукцинат — 8 мМ. По кривым поглощения кислорода в метаболических состояниях 3 (V3) и 4 (V4) по Чансу рассчитывали скорость дыхания митохондрий, и дыхательный контроль как отношение V3/V4 [18]. Активность цитохром С-оксидазы определяли спектрофотометрическим методом [19]. Содержание белка в суспензии митохондрий определяли методом Бредфорда [20].

В конце эксперимента гомеостаз глюкозы оценивали во время внутрибрюшинного теста толерантности к глюкозе (ВБТТГ) (3 г глюкозы на кг массы тела), чувствительность к инсулину определяли с помощью внутрибрюшинного теста толерантности к инсулину (ВБТТИ) (инсулин 0,5 ед. на кг массы тела, глюкоза 2 г на кг через 10 мин после введения инсулина [21]. Содержание глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом с помощью ферментативного анализатора глюкозы «Эксан-Г».

Площади под гликемическими кривыми (ППК) при проведении ВБТТГ и ВБТТИ рассчитывали с помощью компьютерной программы «Mathlab».

Среди интегральных показателей определяли прирост массы тела и относительную массу висцерального жира, которую рассчитывали как сумму эпигонадального, эпинефрального и мезентерального жира.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с применением критерия множественного сравнения Ньюмена—Кейлса [22]. Результаты представлены в виде средней (М) и ошибки средней (SEM). Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что усиленная утилизация фруктозы печенью приводит к активации углеводного и липидного метаболизма, а именно к развитию гиперинсулинемии, инсулинорезистентности, толерантности к глюкозе, нарушению в балансе окисления и этерификации жирных кислот [23].

В результате проведенных исследований было верифицировано развитие инсулинорезистентности и интолерантности к углеводам у животных, содержащихся в условиях хронического поступления фруктозы, что подтверждалось более высокими показателями площади под соответствующими гликемическими кривыми относительно интактного контроля (табл. 1).

Полученные данные совпадают с результатами других исследований, касающихся развития инсулинорезистентности, индуцированной хроническим введением фруктозы. Возможным механизмом ее возник-

новения считается снижение активности глюкокиназы, а также активация глюкозо-6-фосфатазы — ферментов, которые регулируют метаболизм углеводов в печени [24], а также нарушение ранних этапов в трансдукции инсулинового сигнала, в частности процессов фосфорилирования рецептора к инсулину и субстрата инсулинового рецептора [25].

Установлено, что двухмесячное применение таурина улучшает толерантность к углеводам и чувствительность к инсулину у крыс с МС, подтверждением чему было значительное снижение площади под гликемическими кривыми при проведении ВБТТГ и ВБТТИ по сравнению с показателями для группы, получавшей плацебо (табл. 1).

Одним из компонентов метаболического синдрома является ожирение, которое тесно связано с инсулинорезистентностью [26]. Известно, что фруктоза, в отличие от глюкозы, не стимулирует продукцию инсулина и лептина — ключевых гормонов, которые играют важную роль в длительной регуляции энергетического гомеостаза. Вследствие хронического применения больших доз фруктозы нарушается инсулиновый ответ на приём пищи, а также снижается продукция лептина, что может привести к чрезмерному поступлению энергии и, как следствие, увеличению массы тела [27].

Установлено, что хроническое применение фруктозы сопровождается увеличением относительной массы висцерального жира более чем в два раза, что способствует развитию инсулинорезистентности (табл. 1).

При оценке массы тела экспериментальных животных было выявлено значительное увеличение данного показателя при содержании крыс на ВФД, что, вероятно, является результатом увеличения массы жировой ткани (табл. 1).

Применение таурина предотвращало повышение прироста массы тела, в частности, за счет снижения массы висцерального жира, что коррелирует с улучшением чувствительности к инсулину у животных с МС (табл. 1).

Таблица 1

Влияние таурина на показатели гомеостаза глюкозы, прирост массы тела и относительную массу висцерального жира у крыс с МС, индуцированным ВФД (n = 6, М ± SEM)

Группа	ППК при проведении ВБТТГ, ммоль/л мин	ППК при проведении ВБТТИ, ммоль/л мин	Прирост массы тела, %	Относительная масса висцерального жира, %
Интактный контроль	683,1 ± 27,3	379,9 ± 34,2	12,24 ± 2,05	1,67 ± 0,19
ВФД + растворитель	1043,7 ± 82,5 *	547,1 ± 18,8 *	21,19 ± 1,63 *	3,95 ± 0,31 *
ВФД + таурин	695,5 ± 18,2 #	426,7 ± 38,7 #	13,54 ± 2,87 #	2,37 ± 0,27 * #

Примечание. * — статистически значимые отличия в сравнении с данными для группы «интактный контроль», $p \leq 0,05$; # — статистически значимые отличия в сравнении с данными для группы «ВФД + плацебо», $p \leq 0,05$.

Влияние таурина на скорость дыхания (в присутствии малата и глутамата) изолированных митохондрий сердца крыс с МС, индуцированным ВФД (n = 6, M ± SEM)

Группа	V ₄ , натом кислорода/мин/мг белка	V ₃ , натом кислорода/мин/мг белка	V ₃ /V ₄
Интактный контроль	14,24 ± 1,20	82,60 ± 7,48	5,83 ± 0,35
ВФД + растворитель	14,44 ± 1,18	66,21 ± 5,00 *	4,63 ± 0,25 *
ВФД + таурин	14,51 ± 1,26	76,04 ± 3,97 #	5,38 ± 0,32 #

Примечания аналогичны табл. 1.

Влияние таурина на скорость дыхания (в присутствии сукцината) изолированных митохондрий сердца крыс с МС, индуцированным ВФД (n = 6, M ± SEM)

Группа	V ₄ , натом кислорода/мин/мг белка	V ₃ , натом кислорода/мин/мг белка	V ₃ /V ₄
Интактный контроль	76,85 ± 5,44	177,23 ± 14,53	2,35 ± 0,18
ВФД +	80,53 ± 4,09	171,19 ± 13,96	2,12 ± 0,06
ВФД + таурин	80,51 ± 5,57	191,70 ± 11,81	2,40 ± 0,10

Примечания аналогичны табл. 1.

Известно, что в условиях излишнего поступления энергии параллельно с инсулинорезистентностью и ожирением развивается митохондриальная дисфункция, связанная с метаболическими осложнениями, в том числе кардиоваскулярными патологиями [28, 29]. Функциональное состояние митохондрий оценивали по скорости дыхания (поглощения кислорода суспензией органелл) в присутствии субстратов, окисляющихся НАД-зависимыми (глутамат + малат) или ФАД-зависимыми (сукцинат) дегидрогеназами.

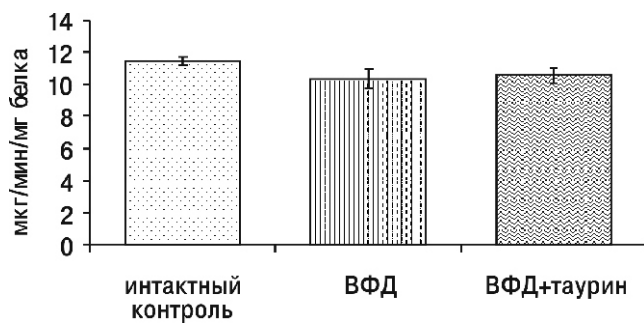
При определении показателей дыхания изолированных митохондрий сердца в присутствии глутамата и малата было установлено уменьшение скорости АДФ-стимулированного дыхания (V₃) и снижение коэффициента дыхательного контроля в митохондриях животных, которых содержали на ВФД, по сравнению с интактным контролем (табл. 2). Это свидетельствует о нарушении регуляции дыхательной цепи энергетическим состоянием клетки, которое выража-

ется в разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования, что является одним из основных маркеров митохондриальной дисфункции. В то же время, в условиях применения сукцината в качестве субстрата дыхания, скорость поглощения кислорода в состояниях 3 и 4, а также дыхательный контроль митохондрий животных, получавших ВФД, не отличались от показателей контрольной группы (табл. 3).

Известно, что сукцинатдегидрогеназа (комплекс II) является ФАД-зависимым ферментом, который поставляет электроны непосредственно на убихинон, минуя НАД-зависимый комплекс I.

Таким образом, отсутствие изменений дыхательного контроля при добавлении сукцината (субстрат комплекса II) и снижение его при использовании малата с глутаматом (субстратов комплекса I) может свидетельствовать о том, что в митохондриях животных с МС нарушение митохондриальной функции возникает, главным образом, на уровне комплекса I электрон-транспортной цепи. Тот факт, что активность цитохром С-оксидазы (комплекса IV) оставалась неизменной также может подтверждать это допущение (рисунок).

Одной из причин развития митохондриальной дисфункции при МС и сахарном диабете может быть снижение в клетках содержания таурина вследствие накопления в них липидов, углеводов и полиолов, что вызывает нарушение осморегуляции и снижения буферной ёмкости митохондриального матрикса [14]. Известно, что недостаток указанной аминокислоты связан с дефицитом модифицированных тРНК, в результате чего изменяется экспрессия и трансляция белков внутри митохондрий, в том числе компонентов



Влияние таурина на активность цитохром С-оксидазы в изолированных митохондриях сердца крыс с МС, индуцированным ВФД (n = 6, M ± SEM).

дыхательной цепи, что приводит к снижению транспорта электронов, а также образованию супероксид аниона [13].

Следует отметить, что использование таурина способствовало повышению дыхательного контроля за счёт нормализации скорости АДФ-стимулированного дыхания митохондрий сердца в метаболическом состоянии 3 в присутствии малата с глутаматом в сравнении с животными, получавшими растворитель (табл. 2). Полученные данные могут свидетельствовать об улучшении процессов окислительного фосфорилирования на уровне комплекса I ЭТЦ под влиянием таурина и хорошо согласуются с гипотезой о его роли в сохранении буферной ёмкости митохондриального матрикса.

Известно, что при нарушении функции митохондрий значительно увеличивается генерация АФК, усиливающих митохондриальную дисфункцию, в результате чего образуется замкнутый порочный круг, который может быть разорван путём нормализации оксидантного статуса митохондрий [30]. Установлено, что таурин выполняет функцию непрямого антиоксиданта, предотвращая метаболические нарушения, обусловленные синдромом инсулинорезистентности [11]. Важной ролью данной аминокислоты в ослаблении оксидативного стресса является восстановление природного уровня антиоксидантов и защитных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы), а также подавление образования оксида азота и нитрозивного стресса путём супрессии индукцибельной формы NO-синтазы, хотя точный механизм этих эффектов до конца неизвестен [13, 31]. Ранее нами было показано, что применение таурина способствует нормализации про/антиоксидантного баланса у крыс с МС [32].

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено, что таурин тормозит метаболические проявления синдрома инсулинорезистентности и нормализует биоэнергетические процессы в сердечной мышце восстанавливая работу комплекса I электрон-транспортной цепи у крыс с МС.

Выводы

1. Применение таурина тормозит такие проявления метаболического синдрома, как интолерантность к углеводам, снижение чувствительности к инсулину, висцеральное ожирение у животных, содержащихся на высокофруктозной диете.

2. Таурин нормализует дыхательную функцию митохондрий сердца, восстанавливая работу комплекса I электрон-транспортной цепи у крыс с синдромом инсулинорезистентности.

3. Выявленные фармакологические свойства таурина свидетельствуют о перспективности его применения с целью профилактики и лечения сердечно-сосудистой патологии у больных с метаболическим синдромом.

References

- Hu F., Liu F. Mitochondrial stress: a bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases? *Cell signal.* 2011; 23(10): 1528-33.
- Tappy L., Le K. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol. rev.* 2010; 90: 23-46.
- Kim J., Wei Y., Sowers J. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ. res.* 2008; 102: 401-14.
- Vial G., Dubouchaud H., Leverve X.M. Liver mitochondria and insulin resistance. *ABP.* 2010; 57(4): 389-92.
- Martins A.R., Nachbar R.T., Vinolo R., Festuccia W.T., Lambertucci R.H., Cury-Boaventura M.F. et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids in Health and Disease.* 2012; 11(30): 1-11.
- Ilkun O., Boudina S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19(27): 4806-17.
- Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ res.* 2010; 107: 1058-70.
- Puerta C. Taurine and glucose metabolism: a review. *Nutr Hosp.* 2010; 25(6): 910-9.
- Ripps H., Shen W. Review: taurine: a «very essential» amino acid. *Molec. vision.* 2012; 18: 2673-86.
- Imae M., Asano T., Murakami S. Potential role of taurine in the prevention of diabetes and metabolic syndrome. *Amino Acids.* 2014; 46: 81-8.
- Ito T., Schaffer S.W., Azuma J. The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications. *Amino Acids.* 2012; 42(5): 1529-39.
- Puerta D., Arrieta F.J., Balsa J.A., Botella-Carretero J.I., Zamarron I., Vazquez C. Taurine and glucose metabolism: a review. *C. Nutr. Hosp.* 2010; 25(6): 910-9.
- Hansen S.H., Andersen M.L., Cornett C, Gradinaru R, Grunnet N. A role for taurine in mitochondrial function. *J. biomed. sci.* 2010; 17: 23-30.
- Rikimaru M., Ohsawa Y., Wolf A.M., Nishimaki K., Ichimiya H., Kamimura N. et al Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern. Med.* 2012; 51: 3351-7.
- Levi B., Werman M. Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *J. Nutrition.* 1998; 128(8): 1442-9.
- Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. *Ендокринологія.* 2003; 8(1): 142-5.
- Chans B. *Cell turnover regulation.* М.; 1962. (in Russian)
- Straus W. Colorimetric determination of cytochrom c oxidase by formation of a quinonediiminium pigment from dimethyl-p-phenylenediamine. *Biochem. biophys. acta.* 1956; 19: 58-65.
- Bredford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing protein-dye binding. *Anal. biochem.* 1976; 72: 248-52.
- Lundholm L., Bryzgalova G., Gao H., Portwood N., Falt S., Berndt K.D. et al. The estrogen receptor α -selective

agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice; potential molecular mechanisms. *Endocrinol.* 2008; 199: 275-86.

21. Glans S. *Medical-biological statistic transl. from engl.* Danilova J.A. M.: Praktika; 1998. (in Russian)

22. Marcinkiewicz J., Kontny E. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids.* 2014; 46: 7-20.

23. Mayes P.A. Intermediary metabolism of fructose. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1993.; 58(3): 754-65.

24. Gerrits P.M. Diabetes and fructose metabolism. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1993; 58(1): 796-9.

25. Hirabara S.M., Gorjro R., Vinolo M.A., Rodrigues A.C., Nachbar R.T., Curi R. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J. biomed. & biotech.* 2012; 2012: 16 p.

26. Gorbenko N., Zvyagina T., Borikov O., Shalabay A., Ivanova O. Taurine protects against impairment of mitochondrial function and oxidative stress in the heart of rats with fructose-induced insulin resistance. In: the 5th Annual Meeting of the Diabetes & Cardiovascular Disease EASD Study Group: programme & abstracts. Paris; 2012. P. 106-107.

27. Dekker M.J., Su Q., Baker C., Rutledge A.C., Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Amer. J. Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299: 685-94.

28. Hernandez-Aguilera A., Rull A., Rodriguez-Gallego E., Riera-Borrull M., Luciano-Mateo F., Camps J. et al. Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation.* 2013; 2013: 13 p.

29. New Insights into insulin resistance in the diabetic heart Susan Gray and Jason K. Kim *Trends Endocrinol Metab.* 2011; October; 22(10): 394-403.

30. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice.* 2014; 2014; 21 p.

31. Maranzana E, Barbero G., Falasca A., Lenaz G., Genova M.L. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxidants & redox signaling.* 2013;19(13); 1469-80.

32. Le Lay S, Simard G., Martinez M.C., Andriantsitohaina R. *Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view.* 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/908539>.

Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О.

Сократительная функция и метаболизм миокарда в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени у крыс

ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, г.Омск, ул. Ленина, д. 12

Цель исследования: оценить сократимости и метаболизма миокарда изолированного сердца в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени в эксперименте. **Методика.** На 64 беспородных белых крысах-самцах проведена прямая оценка сократительной функции и метаболизма миокарда изолированных изоволюмически сокращающихся сердец в ранние сроки после предельно допустимой резекции 80% печени. В различные сроки после операции (1, 3, 6, 12 ч и 1, 3, 7 сут.) вскрывали грудную клетку, изолировали сердце, осуществляли ретроградную перфузию сердец через аорту раствором Кребса—Хензелейта в режиме постоянного давления. На основании анализа кривой давления в левом желудочке рассчитывали систолическое, диастолическое и развиваемое давление, скорость сокращения и скорость расслабления. Для оценки функциональных резервов миокарда использовали гипоксическую перфузию. Одновременно с регистрацией давления определяли содержание глюкозы, лактата, активность аспаратаминотрансферазы в перфузате, прошедшем через коронарное русло. **Результаты.** Выявлено, что в первые часы после операции развивалась острая систоло-диастолическая дисфункция миокарда с преобладанием ее диастолической составляющей. Сердца прооперированных животных были менее устойчивы к гипоксическому и реоксигенационному повреждению. После операции происходило нарушение обмена углеводов и биоэнергетики в миокарде. Сердца животных экспериментальных групп потребляли больше глюкозы на единицу выполняемой функции, выделяли больше лактата, определялась повышенная утомка аспаратаминотрансферазы в коронарный проток, что свидетельствует о повышенной проницаемости и деструкции мембран кардиомиоцитов. **Заключение.** В ранние сроки после предельно допустимой резекции печени происходит угнетение сократительной функции миокарда, особенно фазы расслабления, развивается гипоксия миокарда, подавляется энергетический метаболизм, митохондриальная дисфункция и повреждение мембран кардиомиоцитов.

Ключевые слова: резекция печени; изолированное сердце; гипоксия; реоксигенация

Для корреспонденции: Ермолаев Павел Александрович — аспирант кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии, e-mail: yermol@inbox.ru

Для цитирования: Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Барская Л.О. сократительная функция и метаболизм миокарда в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; — (2): 63–68.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов
Поступила 03.06.15

Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O.

Contractile function and myocardial metabolism in early period after maximally allowable liver resection in rats

State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Omsk State Medical University»; 12, ul. Lenina, Omsk, 644099, Russia

The purpose: to evaluate the contractility and myocardial metabolism in the early period after the maximally allowable liver resection in the experiment on isolated hearts. **Methods.** Direct assessment of myocardial contractile function and metabolism of isolated isovolumic hearts was carried out in the early period after the maximally allowable 80% liver resection in the experiment on 64 outbred albino male rats. At different times after surgery (1, 3, 6, 12 hours and 1, 3, 7 days) we opened the chest, took heart, retrograde perfusion of the hearts was made through the aorta with a solution of Krebs—Henseleit in the mode of constant pressure. Based on the analysis of the pressure curve in the left ventricle systolic, diastolic and developed pressure, rate of contraction and rate of relaxation were calculated. For evaluation of the functional reserves of the myocardium hypoxic perfusion was used. Simultaneously with the registration of pressure we took samples of the perfusate passing through the coronary vessels, determined the content of glucose, lactate, activity of aspartataminotransferase. **Results.** It is revealed that in the first hours after surgery developed acute of systolic-diastolic left myocardial dysfunction, with prevalence of its diastolic component. Hearts of operated animals were less resistant to hypoxic

and reoxygenation damage. A violation of carbohydrate metabolism and bioenergetics in the myocardium had been after the operation. Hearts of animals of experimental groups consumed more glucose per unit of the function, allocate more lactate, increased leakage of aspartateaminotransferase in coronary flow was determined, indicating increased permeability and destruction of the membranes of cardiomyocytes. **Conclusion.** Thus, inhibition of the contractile function of the myocardium, especially its relaxation, hypoxia of the myocardium, inhibition of energy metabolism, mitochondrial dysfunction and damage of the membranes of cardiomyocytes were in the early period after the maximally allowable liver resection.

Keywords: liver resection; isolated heart; hypoxia; reoxygenation

For correspondence: Pavel A. Ermolaev, postgraduate student of the Department of topographic anatomy and operative surgery State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Omsk State Medical University»; 12, ul. Lenina, Omsk, 644099, Russia; e-mail: yermol@inbox.ru

For citation: Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. Contractile function and myocardial metabolism in early period after maximally allowable liver resection in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 63—68. (in Russ).

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Ermolaev P.A., [http:// orcid.org/0000-0001-8733-6102](http://orcid.org/0000-0001-8733-6102)

Received 03.06.15

Введение

Ранее нами установлено развитие ишемии миокарда и синдрома низкого сердечного выброса в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени в эксперименте [1, 2]. Известно, что недостаточность кровообращения после обширных хирургических вмешательств, оцениваемая в условиях целостного организма, может быть обусловлена как снижением сократительной способности миокарда, так и экстракардиальными факторами, которые, в свою очередь, могут быть следствием волевых нарушений, изменений кислотно-щелочного состояния, реологии крови [3—5] и др.

Цель исследования — оценка сократимости и метаболизма миокарда на изолированном сердце в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени в эксперименте и определение значимости повреждений в формировании недостаточности кровообращения.

Методика

Эксперименты проведены на 64 беспородных белых крысах-самцах массой 272 ± 24 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении, свободном доступе к корму и питьевой воде. Объем выборки для получения достоверных результатов, рассчитанный по формуле F. Lopez-Jimenez и соавт. [6], составил 8 животных. Крыс наркотизировали диэтиловым эфиром (ОАО «Медхимпром», Россия). У 56 животных проводили ати-

пичную резекцию 80% массы печени. Послеоперационная летальность составила 20% в течение 7 сут. наблюдения. Контрольную группу составили 8 наркотизированных крыс.

Прямую оценку сократительной функции и метаболизма миокарда в различные сроки после операции проводили на изолированных изоволюмически сокращающихся сердцах, лишенных регуляторных влияний организма по методике E.L. Fallen и соавт. [7]. При использовании этой модели исключается влияние экстракардиальных факторов на сократимость миокарда, и выявляемые нарушения контрактильности миокарда могут быть обусловлены только повреждением самого сердца. Под эфирным наркозом в различные сроки после резекции печени (1, 3, 6, 12 ч и 1, 3, 7 сут.) вскрывали грудную клетку, изолировали сердце, помещали его в охлажденный до $2-4^{\circ}\text{C}$ раствор Кребса—Хензеляйта. После препаровки в полость левого желудочка (ЛЖ) помещали латексный баллончик, соединенный с портативным монитором РМ-8000 (Mindray, Китай). Осуществляли ретроградную перфузию сердца через аорту раствором Кребса—Хензеляйта, насыщенным карбогеном, в режиме постоянного давления 70 мм рт. ст. при температуре 37°C , поддерживаемой ультратермостатом VT-8 (ООО «Термекс-2», Россия), и $\text{pH} = 7,33-7,36$.

Электрокардиостимуляцию сердца проводили прямоуглыми импульсами длительностью 3 мс, напряжением на 10% выше порогового с частотой 120 мин⁻¹ с помощью электрокардиостимулятора ЭС-50-1 (СССР). Через 30 мин нормоксической

перфузии, необходимой для стабилизации работы изолированного сердца, записывали кривую давления в ЛЖ. На основании анализа кривой давления рассчитывали комплекс силовых и скоростных показателей сократимости: систолическое, диастолическое и развиваемое давление, скорость сокращения ($+dP/dt$) и скорость расслабления ($-dP/dt$) ЛЖ.

Для оценки функциональных резервов миокарда использовали гипоксическую пробу: снижение напряжения кислорода в растворе для перфузии до 150 мм рт. ст. и исключение глюкозы в течение 15 мин с последующей 20-минутной реоксигенацией, что позволяет оценить устойчивость миокарда к гипоксическому и реоксигенационному повреждению [8, 9].

Одновременно с регистрацией давления брали пробы перфузата, прошедшего через коронарное русло, определяли содержание глюкозы, лактата, активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Глюкозу определяли глюкоксидазным методом, лактат — энзиматическим колориметрическим методом, активность АсАТ — кинетическим методом (оптимизированный УФ тест). Потребление глюкозы и выделение лактата рассчитывали на 1 кг сухой массы миокарда за 1 мин на 1 мм рт. ст. развиваемого давления. Потерю кардиомиоцитами АсАТ вычисляли на 1 кг сухого миокарда за 1 мин.

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0». Результаты представлены в виде медианы (Me) с нижним (LQ) и верхним (Hq) квартилями. Определение значимости различий проведено с помощью критерия Манна—Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Показатели сократительной функции ЛЖ в раннем послеоперационном периоде представлены в табл. 1 и 2.

Начиная 1-го часа после операции, регистрировалось нарушение сократимости ЛЖ, что проявлялось снижением систолического и развиваемого давления, скорости сокращения и расслабления ЛЖ, повышением диастолического давления по сравнению с контролем. На последующих этапах наблюдения выявлено усугубление сократительной дисфункции миокарда. Максимально выраженная кардиодепрессия определялась через 6 и 12 ч после операции: до минимальных величин снижалось систолическое (на 22%) и развиваемое давление (на 30%), скорость сокращения (на 42%) и расслабления (на 51%), диастолическое давление было в 1,9 раза выше по сравнению с контролем. Таким образом, сила и скорость сокра-

щения ЛЖ снижались умеренно, в большей степени оказался нарушенным процесс расслабления миокарда, то есть в первые часы после операции развивалась острая систоло-диастолическая дисфункция миокарда с преобладанием ее диастолической составляющей.

Через 1 сут. после операции нарушения систолической функции миокарда уменьшались: наблюдалось постепенное восстановление величины систолического и развиваемого давления, скорости сокращения, на 3-и сут. после операции эти показатели не отличались от контрольных, а на 7-е сут. даже несколько превышали контрольные величины. В то же время, нормализация релаксации миокарда происходила лишь частично: диастолическое давление оставалось повышенным в 1,5 раза по сравнению с контролем, скорость расслабления несколько возрастала в динамике, но оставалась ниже контрольных величин.

На следующем этапе исследования нами было выявлено, что сердца прооперированных животных становились менее устойчивыми к гипоксическому повреждению. Гипоксическая перфузия вызывала более выраженное снижение силовых и скоростных показателей сократимости ЛЖ и рост диастолического давления, особенно через 6 и 12 ч после операции, что свидетельствует о развитии гипоксической контрактуры миокарда.

При реоксигенации сердец контрольной и экспериментальных групп сократимость миокарда частично восстанавливалась. В контроле наблюдалось постепенное, более полное восстановление силы и скорости сокращения ЛЖ. Повреждающий эффект реперфузии для сердец прооперированных животных оказался более глубоким. Реоксигенация сердец прооперированных животных способствовала восстановлению сократимости ЛЖ в меньшей степени: сохранялось высокое диастолическое давление, низкое развиваемое давление и скорость расслабления, особенно через 6 и 12 ч после операции, что может быть следствием нарушения энергетического обмена и/или повреждения Са-АТФ-азы саркоплазматического ретикулула, ответственной за трансмембранный перенос Ca^{2+} и релаксацию кардиомиоцитов [10].

Параллельно с регистрацией давления брали пробы перфузата, прошедшего через коронарное русло, определяли содержание глюкозы, лактата, активность АсАТ. Результаты этих исследований представлены в табл. 3.

Показано, что после операции происходило нарушение обмена углеводов и биоэнергетики в миокарде. Сердца прооперированных животных в течение 3-х сут. после операции потребляли больше глюкозы на единицу выполняемой функции. Наименьшая эффективность использования глюкозы наблюдалась через 1 ч после операции: сердца затрачивали глюкозы в 2,3 раза больше, чем в контроле. Вместе с тем, в этой же исследователь-

ской точке выделение лактата изолированными сердцами, превышало контрольные величины в 1,5 раза. Реоксигенация сердец экспериментальной группы вызывала еще большее увеличение потребления глюкозы и выделение лактата. Увеличение потребления глюкозы и накопление лактата в кардиомиоцитах свидетельствует о миокардиальной гипоксии с торможением наиболее энергетически эффективного аэробного пути окисления

глюкозы и активацией анаэробного гликолиза. Как известно, накопление лактата и свободных жирных кислот в кардиомиоцитах с развитием внутриклеточного ацидоза приводит к нарушению работы ионных насосов и накоплению в цитозоле ионов кальция. Перегрузка кальцием нарушает систолическую и диастолическую функцию миокарда, повреждает мембраны митохондрий, что приводит, в конечном итоге, к разобщению окислитель-

Таблица 1
Силловые показатели сократимости левого желудочка после предельно допустимой резекции печени у крыс, Ме [LQ;HQ]

Показатель	Этапы эксперимента	Время после операции							
		Контроль	1 ч	3 ч	6 ч	12 ч	1 сут.	3 сут.	7 сут.
Систолическое давление, мм рт. ст.	Стабилизация	92,0 [90,0; 95,2]	83,5 [82,0; 85,0]*	76,5 [75,0; 78,0]**^	71,5 [70,0; 72,8]**^	72,0 [70,8; 73,2]*	88,5 [87,8; 90,2]**^	95,0 [95,0; 97,0]^	100,0 [98,8; 100,0]**^
	Гипоксическая перфузия	42,5 [41,5; 44,2]	37,0 [35,5; 37,0]*	31,5 [30,0; 32,2]**^	28,5 [26,8; 29,2]**^	28,5 [27,8; 30,2]*	33,0 [32,0; 34,0]**^	37,5 [36,5; 39,2]**^	40,5 [39,8; 41,2]**^
	Реоксигенация	85,5 [84,8; 88,0]	74,5 [74,0; 75,8]*	69,0 [67,2; 70,0]**^	56,5 [55,8; 58,0]**^	57,0 [56,8; 58,2]*	70,5 [69,8; 72,0]**^	75,5 [75,0; 76,2]**^	80,0 [79,8; 81,2]**^
Диастолическое давление, мм рт. ст.	Стабилизация	4,0 [3,8; 4,0]	5,0 [4,0; 5,5]*	6,5 [5,8; 7,0]*	7,5 [7,0; 8,2]**^	7,0 [7,0; 8,0]*	6,0 [6,0; 7,2]*	6,0 [5,8; 6,2]*	6,0 [5,0; 6,0]*
	Гипоксическая перфузия	9,0 [9,0; 12,0]	15,0 [14,8; 15,5]*	17,5 [17,0; 18,0]**^	22,0 [21,0; 22,0]**^	21,5 [20,0; 22,2]*	20,0 [17,8; 20,2]*	16,5 [15,8; 17,5]**^	15,0 [13,8; 15,5]*
	Реоксигенация	6,5 [5,0; 8,5]	13,0 [11,8; 13,2]*	15,0 [12,8; 15,8]*	18,0 [18,0; 18,2]**^	17,5 [17,0; 19,2]*	16,0 [15,5; 17,2]*	13,5 [12,0; 15,2]*	11,0 [10,0; 12,0]**^
Развиваемое давление, мм рт. ст.	Стабилизация	90,5 [86,8; 92,0]	78,0 [76,5; 80,0]*	70,5 [69,8; 71,0]**^	63,0 [62,8; 65,2]**^	65,0 [64,0; 65,2]*	82,5 [81,8; 83,2]**^	90,0 [88,8; 91,0]^	94,0 [93,0; 94,0]**^
	Гипоксическая перфузия	32,5 [31,0; 33,2]	21,0 [19,8; 23,0]*	13,0 [13,0; 14,0]**^	6,5 [5,8; 7,2]**^	7,5 [6,8; 8,5]*	13,5 [11,8; 14,8]**^	20,5 [20,0; 22,2]**^	25,0 [25,0; 26,2]**^
	Реоксигенация	78,5 [78,0; 80,0]	61,5 [60,0; 63,2]*	53,0 [51,5; 56,2]**^	38,0 [37,0; 40,0]**^	39,5 [39,0; 40,0]*	54,5 [51,5; 57,8]**^	61,5 [59,8; 63,5]**^	69,0 [67,8; 69,5]**^

Примечание. * — статистически значимые различия по сравнению с контролем; ^ — статистически значимые различия по сравнению с предыдущим сроком

Таблица 2
Скоростные показатели сократимости левого желудочка после предельно допустимой резекции печени у крыс, Ме [LQ;HQ]

Показатель	Этапы эксперимента	Время после операции							
		Контроль	1 ч	3 ч	6 ч	12 ч	1 сут.	3 сут.	7 сут.
+dP/dt, мм рт.ст./с	Стабилизация	1322 [1317; 1328]	1215 [1197; 1221]*	1008 [997; 1016]**^	856 [849; 866]**^	762 [743; 772]**^	936 [928; 945]**^	1298 [1288; 1320]^	1350 [1338; 1361]**^
	Гипоксическая перфузия	668 [664; 683]	506 [493; 514]*	424 [414; 436]**^	362 [359; 371]**^	358 [354; 360]*	387 [360; 396]**^	474 [469; 481]**^	645 [630; 668]^
	Реоксигенация	905 [897; 912]	542 [537; 546]*	452 [440; 467]**^	395 [388; 406]**^	380 [369; 396]*	440 [435; 446]**^	561 [549; 568]**^	890 [880; 900]^
-dP/dt, мм рт.ст./с	Стабилизация	812 [797; 826]	684 [678; 708]*	572 [564; 585]**^	412 [406; 420]**^	401 [388; 406]*	460 [453; 457]**^	646 [640; 651]**^	783 [775; 786]**^
	Гипоксическая перфузия	402 [391; 414]	256 [249; 268]*	247 [245; 250]*	148 [140; 152]**^	140 [136; 140]*	130 [130; 145]*	239 [236; 243]**^	392 [375; 400]^
	Реоксигенация	624 [614; 633]	312 [305; 334]*	285 [280; 330]*	190 [182; 202]**^	180 [175; 180]*	219 [216; 230]**^	322 [320; 326]**^	431 [426; 440]**^

Примечание. * — статистически значимые различия по сравнению с контролем; ^ — статистически значимые различия по сравнению с предыдущим сроком.

ного фосфорилирования, то есть развивается вторичная митохондриальная дисфункция [11, 12].

В ходе перфузии сердец прооперированных животных определялась повышенная утечка цитозольного фермента АсАТ в коронарный проток, особенно через 12 ч после операции, когда выход АсАТ был увеличен в 2,3 раза по сравнению с контролем, что может являться следствием повышенной проницаемости и деструкции мембран кардиомиоцитов. Гипоксия и реоксигенация увеличивала потерю АсАТ в 1,5 раза по сравнению с этапом стабилизации в интервале 3—12 ч наблюдения.

Таким образом, после предельно допустимой резекции печени развивается повреждение кардиомиоцитов (по данным выхода АсАТ), которое проявляется снижением сократительной функции миокарда.

Согласно данным литературы, повреждение миокарда при некардиальных операциях может быть обусловлено уменьшением притока крови по коронарным артериям и повышением потребности миокарда в кислороде и метаболитах [3]. Хирургическая агрессия при обширных операциях сопровождается циркуляторной и тканевой гипоксией, гиперкатехоламинемией, массивным механическим повреждением тканей и развитием систем-

ной воспалительной реакции, а также мощной нейроэндокринной реакции организма, называемой операционным стрессом [13, 14]. Повреждающее действие катехоламинов на миокард реализуется через усиление продукции свободных радикалов, а также через продукты хиноидного окисления, способные уменьшать амплитуду сокращений, ингибировать ионные насосы [15].

Помимо избыточной продукции катехоламинов в условиях хирургического стресса и системного воспаления происходит многократное усиление синтеза цитокинов, развивается «цитокиновая буря», которая может стать причиной цитокин-индуцированной дисфункции миокарда [16, 17]. Имеются данные, подтверждающие модуляцию цитокинами таких детерминант насосной функции, как сократимость, пред- и постнагрузка, частота сердечных сокращений. Точками приложения действия цитокинов являются β-адренорецепторы, NO-синтаза, прямое влияние на внутриклеточный гомеостаз кальция, индукция апоптоза [18—20].

Кроме гиперпродукции цитокинов при активации фагоцитов в повреждённых тканях и развитии системной воспалительной реакции происходит многократное усиление образования свободных радикалов, поступающих в системный кровоток [14]. Свободные радикалы

Таблица 3

Потребление глюкозы, выделение лактата и аспаргатаминотрансферазы изолированными сердцами после предельно допустимой резекции печени у крыс, Ме [LQ;HQ]

Показатель	Этапы эксперимента	Время после операции							
		Контроль	1 ч	3 ч	6 ч	12 ч	1 сут.	3 сут.	7 сут.
Глюкоза, мкмоль/(кг мин мм рт. ст.)	Стабилизация	80,2 [78,8; 81,8]	181,3 [174,9; 184,4]*	132,8 [131,1; 134,6]*^	145,7 [141,9; 147,4]*^	142,3 [140,0; 146,1]*	138,8 [134,4; 143,9]*	100,7 [97,7; 103,2]*^	84,5 [80,2; 88,0]^
	Реоксигенация	84,5 [83,3; 85,0]	188,5 [187,6; 191,7]*	141,4 [137,9; 143,5]*^	155,6 [153,7; 158,0]*^	151,3 [147,6; 154,3]*	148,5 [141,0; 153,2]*	107,3 [104,1; 110,2]*^	86,7 [85,0; 90,3]^
Лактат, мкмоль/(кг мин мм рт. ст.)	Стабилизация	35,8 [32,4; 41,2]	52,8 [48,4; 56,3]*	43,4 [39,2; 46,0]^	41,6 [37,5; 43,3]	43,7 [40,4; 47,6]*	38,2 [35,3; 41,4]^	37,6 [33,8; 46,8]	33,6 [31,7; 36,0]
	Гипоксическая перфузия	105,3 [101,9; 111,6]	182,6 [177,2; 186,2]*	148,5 [140,9; 150,6]*^	146,2 [142,1; 147,7]*	150,8 [146,0; 154,2]*	135,4 [133,7; 139,2]*^	106,6 [104,6; 111,2]^	106,4 [103,2; 111,2]
	Реоксигенация	58,6 [54,6; 63,5]	90,4 [87,1; 93,3]*	77,8 [73,7; 79,4]*^	75,6 [73,6; 78,1]*	76,5 [69,8; 80,3]*	69,0 [65,1; 75,2]*	53,6 [51,7; 56,5]^	54,0 [49,8; 57,0]
Аспаргатаминотрансфераза, мкмоль/(кг мин)	Стабилизация	17,2 [14,8; 17,8]	20,8 [17,0; 23,9]	26,4 [25,2; 29,2]*^	35,0 [33,7; 39,1]*^	40,3 [35,6; 44,9]*	30,0 [26,8; 32,6]*^	25,6 [19,7; 31,8]	19,4 [16,0; 19,9]
	Гипоксическая перфузия	20,5 [17,0; 24,0]	25,3 [21,4; 27,2]	35,6 [32,1; 37,9]*^	52,2 [49,8; 55,0]*^	56,6 [54,4; 59,2]*^	36,3 [34,8; 40,4]*^	28,6 [24,8; 30,7]*^	22,1 [18,0; 23,8]^
	Реоксигенация	18,4 [15,0; 21,1]	28,6 [26,2; 30,0]*	38,2 [35,6; 39,7]*^	57,3 [55,1; 59,3]*^	58,8 [55,1; 62,2]*	37,6 [34,7; 40,4]*^	29,0 [26,3; 30,6]*^	20,7 [18,3; 21,2]^

Примечание. * — статистически значимые различия по сравнению с контролем; ^ — статистически значимые различия по сравнению с предыдущим сроком

повреждают биологические мембраны и ионные каналы, ультраструктуру и функцию эндотелия, вызывают нарушение биоэнергетики митохондрий, индукцию некроза и апоптоза кардиомиоцитов [8].

Важную роль в повреждении сердца играют вещества низкой и средней молекулярной массы. В проведенных нами исследованиях установлено развитие системной эндотоксемии в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени у крыс [21]. Известно, что при прогрессировании эндотоксемии происходит генерализованное поражение сосудистой системы и ультраструктуры кардиомиоцитов [22].

Таким образом, в исследованиях, проведенных на изолированных сердцах, установлено, что в ранние сроки после предельно допустимой резекции печени происходит угнетение сократительной функции миокарда, особенно его расслабления, развивается гипоксия миокарда, подавление энергетического метаболизма, митохондриальная дисфункция и повреждение мембран кардиомиоцитов.

References

1. Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. Changes of parameters of the electrocardiogram after the maximum permissible resection of the liver in rats. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2014; 127(4): 48-52. (in Russian)
2. Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Barskaya L.O. Systemic hemodynamic changes after maximally allowable liver resection in rats. *Obshchaja reanimatologiya*. 2015; 1: 14-21. (in Russian)
3. Guidelines for pre-operative cardiac risk assessment and perioperative cardiac management in non-cardiac surgery: The Task Force for Preoperative Cardiac Risk Assessment and Perioperative Cardiac Management in Non-cardiac Surgery of the European Society of Cardiology (ESC) and endorsed by the European Society of Anaesthesiology (ESA). *Eur Heart J*. 2009; 30(22): 2769-2812.
4. Belyaev E.G., Petrova M.V., ShvyirYov S.L., Zarubina T.V. Correction of disorders of central hemodynamics in the early postoperative period in cancer patients. *Vestnik Rossiyskogo Nauchnogo Tsentra rentgenradiologii*. 2011; N3: 54-73 (in Russian)
5. Treschinskiy A.I., Glumcher F.S. *Manual of intensive care. [Rukovodstvo po intensivnoy terapii]* Kiev: Vyischa shkola. 2004. 582 p. (in Russian).
6. Lopez-Jimenez F., Pniagua D., Lamas G.A. La interpretacion de los ensayos clinicos negativos. *Rev. Invest. Clin*. 1998; 50: 435-440.
7. Fallen E.L., Elliot W.C., Richard G. Apparatus for study of ventricular function and metabolism in the isolated perfused rat heart. *J. Appl. Physiol*. 1967; 22(4): 836-9.
8. Meerson F.Z. *Pathogenesis and prevention of stress and ischemic heart damage. [Patogenez i preduprezhdenie stressorniyh i ishemicheskikh povrezhdeniy serdtsa]* Moscow: Meditsina; 1984; 268 c. (in Russian)
9. Dolgih V.T. *Damage and protection of the heart during acute fatal blood loss. [Povrezhdenie i zashchita serdtsa pri ostroy smertelnoy krvopotere.]* Omsk; 2002. 203 p. (in Russian)
10. L. Lilli (ed.) *Pathophysiology of heart disease. [Patofiziologiya serdechno-sosudistoy sistemy]* Third edition. Moscow: BINOM. Laboratorija znaniy; 2010. 672 c. (in Russian)
11. Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V., Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011; Jul 1813(7): 1360-72.
12. Yan Y., Liu J., Wei C., Li K., Xie W., Wang Y., et al. Bidirectional regulation of Ca²⁺ sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*; 2008 Jan 15, 77(2): 432-41.
13. Noble D.W. Hypoxia following surgery — an unnecessary cause of morbidity and mortality? *Minerva Anestesiol*. 2003; May, 69(5): 447-50.
14. Sato N., Endo S., Ikeda K., Koeda K., Kimura Y., Iwaya T., et al. SIRS in surgical stress. *Rinsho Byori*. 2000; Jun, 48(6): 521-6.
15. Costa V. M., Silva R., Ferreira L. M., Branco P.S., Carvalho F., Bastos M.L. et al. Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct. *Chem. Res. Toxicol*. 2007; 20: 1183-1191.
16. Suzuki K., Kohno M., Aoki M., Nishina M., Ogino R., Kohama A. Cardiac contractile dysfunction in response to surgical stress including trauma, hemorrhage, and infection. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1996; Sep, 97(9): 745-51.
17. Aikawa N. Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1996; Sep, 97(9): 771-7
18. Sumanth D. Prabhu Cytokine-Induced modulation of cardiac function. *Circ Res*. 2004; 95: 1140-53.
19. Deng M.C., Roeder N., Plenz G., Erren M., Brisse B., Soeparwata R. et al. Proinflammatory cytokines and cardiac pump function. *Z. Kardiol*. 1997; Oct, 86(10): 788-802.
20. Papathanassoglou E.D., Moynihan J.A., Ackerman M.H. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? a review and a theoretical framework. *Crit. Care Med*. 2000; 28(2): 537-49.
21. Barskaya L.O., Khramykh T.P., Poluektov V.L., Zavadilenko K.V. Early structural and functional changes in the liver after extended resection (experimental study). *Annalyi hirurgicheskoy gepatologii*. 2013; 18(1): 70-7. (in Russian)
22. Carlson D.L., Morton J.W. Cardiac molecular signaling after burn trauma. *J. Burn Care Res*. 2006; 27: 669-675.

Сведения об авторах:

Храмых Татьяна Петровна, доктор мед. наук, зав. каф. топографической анатомии и оперативной хирургии
Барская Любовь Олеговна, ассистент каф. топографической анатомии и оперативной хирургии

Ляшев Ю.Д., Королев В.А., Грибач И.В., Кирищева Н.Е.

Влияние острой или хронической интоксикации банколом на состояние процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, 305041, Россия, г.Курск, ул. Карла Маркса, д. 3

Цель исследования: изучение влияния острой и хронической интоксикации банколом на течение процессов перекисного окисления (ПОЛ) и состояние ферментов антиоксидантной защиты в организме, а также поиск путей коррекции неблагоприятного действия исследуемого инсектицида. **Методика.** опыты выполнены на 32 крысах-самцах Вистар (180—220 г). Для моделирования интоксикации банколом использовали модели острой и хронической интоксикации: острая — внутрижелудочное введение банкола в дозе 1/50 LD₅₀ (4,42 мг на животное) в течение 3 сут. ежедневно; хроническая — введение банкола ежедневно в течение 28 сут. внутрижелудочно через зонд в той же дозе. Животные были разделены на 4 группы: интактные, острая интоксикация банколом, хроническая интоксикация банколом, хроническая интоксикация + мексидол. Мексидол применяли в течение 14 суток в дозе 50 мг внутримышечно, начиная с 15 дня моделирования хронической инсектицидной интоксикации. Определяли содержание в плазме и ткани печени ацилгидропероксидов (АГП), малонового диальдегида (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, которые оценивали стандартизованными методами спектрофотометрически. **Результаты.** Установлено, что при остром или хроническом применении банкола наблюдается повышение содержания в плазме и ткани печени МДА и АГП, повышение активности обоих ферментов в плазме и снижение в ткани печени. Применение мексидола вызывало снижение содержания МДА и АГП, повышение активности каталазы и СОД в печени. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что интоксикация банколом сопровождается активацией перекисного окисления липидов и мексидол проявляет выраженное антиоксидантное действие.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, банкол, антиоксидантные ферменты

Для корреспонденции: Ляшев Юрий Дмитриевич, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии; e-mail: yu-ashhev@yandex.ru

Для цитирования: Ляшев Ю.Д., Королев В.А., Грибач И.В., Кирищева Н.Е. Влияние острой или хронической интоксикации банколом на состояние процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016. 60(2): 69—73.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.01.15

Lyashev Yu.D., Korolev V.A., Gribach I.V., Kirishcheva N.E.

The influence of acute or chronic bankol intoxication of the lipid peroxidation processes and the activity of antioxidant enzymes

State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kursk State Medical University» Ministry of Public Health of Russian Federation, 3, ul. Karl Marx, Kursk, 305041, Russia

The purpose is the investigation of the influence of acute and chronic bankol intoxication on lipid peroxidation processes and antioxidant enzymes activity and search of methods to correct the unfavorable action of investigated insecticide. **Methods.** Experiments were carried out on Vistar albino rats (n = 32, 180—220g). For modeling bankol intoxication we used models of acute and chronic intoxication: acute — intragastric injection of bankol in a dose 1/50 LD₅₀ (4,42 mg per animal) during 3 days daily; chronic — injection of bankol daily during 28 days intragastrically in same dose. Animals were divided into four groups: naive control, acute bankol intoxication, chronic bankol intoxication, chronic bankol intoxication + mexidol. Rats received intramuscular mexidol during 14 days (15—28 days of bankol injection) in a dose 50 mg per animal. We determine content of acylhydroperoxides (AHP), malonic dialdehyde (MDA), activity of superoxidismutase (SOD) and catalase, which were analyzed spectrophotometrically using of standardized methods. **Results.** It was established that acute and chronic bankol intoxication is accompanied with the increase of AHP and MDA content in plasma and liver tissue, increase of both enzymes activity in plasma and its decrease in liver tissue. The administration of mexidol caused the decrease of lipid peroxidation, increase of SOD and catalase activity in liver. **Conclusion.** The results obtained were shown

the activation of lipid peroxidation in bancol intoxication and antioxidant effect of mexidol.

Keywords: lipid peroxidation, bancol, antioxidant enzymes.

For citation: Lyashev Yu.D., Korolev V.A., Gribach I.V., Kirishcheva N.E. The influence of acute and chronic bancol intoxication on the lipid peroxidation processes and the activity of antioxidant enzymes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 69–73. (in Russ).

For correspondence: Yuri D. Lyashev, Doctor of Medical Sciences, Professor of Pathophysiology Department «Kursk State Medical University»; 3, ul. Karla Marksa, Kursk, 305041, Russian Federation, e-mail: ylyashev@yandex.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Lyashev Yu.D., <http://orcid.org/0000-0003-0536-923X>

Korolev V.A. [Http://orcid.org/0000-0002-4376-4284](http://orcid.org/0000-0002-4376-4284)

Received 19.01.15

Введение

В настоящее время отмечается существенный рост числа отравлений агрохимикатами в связи с постоянно растущим их использованием в агропромышленном комплексе, как в России, так и за рубежом [1]. За последние годы значительно расширился перечень новых инсектицидов. В то же время в научной литературе вопрос о механизмах повреждающего действия инсектицидных препаратов исследован недостаточно [2]. Широкое распространение как в России, так и в зарубежных странах получил инсектицид банкол (наименование по CAS S,S-[2(диметиламино)-1,3-пропанедеил]ди(бензенсульфонотиоат), регистрационный номер CAS 17606-31-4 [3]. Установлен механизм его действия на насекомых-вредителей, однако влияние препарата на организм человека, а также терапия токсических повреждений, вызванных банколом, остаются малоизученными.

Цель работы — изучение влияния острой и хронической интоксикации банколом на течение процессов перекисного окисления (ПОЛ) и состояние ферментов антиоксидантной защиты в организме, а также поиск путей коррекции неблагоприятного действия исследуемого инсектицида.

Методика

Работа выполнена на 32 крысах-самцах Вистар. Животные были разделены на 4 группы по 8 крыс в каждой. 8 животных оставались интактными и составили контрольную группу. У остальных моделировали острую или хроническую интоксикацию банколом.

1. Острую интоксикацию у 8 животных воспроизводили путем введения банкола через зонд внутрижелудочно в дозе $1/50 \text{ LD}_{50}$ (4,42 мг на животное) в течение 3 сут. ежедневно.

2. Хроническую интоксикацию банколом моделировали у 16 крыс, для чего ежедневно в течение 28 сут. внутрижелудочно через зонд вводили банкол в дозе $1/50 \text{ LD}_{50}$ (4,42 мг на животное).

В качестве антиоксиданта использован мексидол, который применяли при хронической интоксикации банколом. Мексидол применяли в течение 14 сут. в дозе 50 мг внутримышечно, начиная с 15-х сут. моделирования хронической инсектицидной интоксикации.

Расчет доз препарата мексидол проводили, используя коэффициент пересчета доз с отдельного животного на человека согласно методическим указаниям приводимых в «Руководстве по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ» (Р.У. Хабриев, Москва, 2005). Для человека массой 70 кг максимальная суточная терапевтическая доза мексидола при острых гнойно-воспалительных процессах брюшной полости составляет 600 мг. В перерасчете на 1 кг массы тела человека необходимо 8,57 мг/кг препарата. Коэффициент пересчета дозы с отдельного животного на человека составляет 39,0. Для крысы массой 200 г коэффициент пересчета составляет 6,5. Следовательно, расчетная терапевтическая доза для экспериментальных крыс-самцов Вистар массой 200 г составляет: $(8,57 \cdot 39) / 6,5 = 51,42 \text{ мг} \approx 50 \text{ мг}$.

Расчет дозы препарата банкол выполнялся, исходя из токсикологических данных: LD_{50} для крыс составляет 1105 мг/кг. В связи с тем, что в эксперименте использовались дозы $1/50 \text{ LD}_{50}$, то после расчета доза составила: $1105 \text{ мг/кг} / 50 = 22,10 \text{ мг/кг} \cdot 0,2 = 4,42 \text{ мг}$.

Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции (г.Страсбург, Франция, 1986) по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей.

О состоянии процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по содержанию в плазме крови

и гомогенате ткани печени продуктов этих реакций: ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА), а также активности ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, которые оценивали традиционными методами [5—7]. Ранее показано, что при попадании в организм банкол способен накапливаться в печени [4], в связи с чем, представляется перспективным использование препаратов, обладающих комбинированным гепатопротекторным эффектом, для коррекции поврежденной органа при инсектицидной интоксикации. Навеску ткани печени массой 100 мг гомогенизировали в 1 мл 0,025 М трис-НС1 буфера (рН 7,4). Уровень ацилгидроперекисей в образце (гомогенате печени или плазме) определяли спектрофотометрически в гептановом слое при длине волны 233 нм против контрольной пробы и выражали в условных единицах. Для определения малонового диальдегида проводили реакцию со смесью тиобарбитуровой кислоты и уксусной кислоты, а затем после инкубации измеряли оптическую плотность при 532 нм и рассчитывали количество малонового диальдегида в мкмоль/г белка ткани в гомогенате и мкмоль/мл в плазме крови. Активность СОД определяли спектрофотометрически, основанным на определении степени торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия. За условную единицу активности СОД принимали 50% торможение реакции восстановления нитросинего тетразолия. Активность каталазы определяли методом, основанным на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Интенсивность окраски измеряли фотомет-

рически при 410 нм. Активность каталазы выражали в мкат/г ткани в гомогенате или мкат/мл в плазме крови.

Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В наших экспериментах установлено, что при остром или хроническом применении банккола наблюдается значительное усиление процессов ПОЛ, что проявляется статистически значимым повышением содержания в плазме крови и гомогенате ткани печени конечных и промежуточных продуктов ПОЛ: МДА и АГП (таблица).

Установлено, что при хронической интоксикации усиление ПОЛ было более выражено: концентрация МДА выше на 23,4% в плазме крови и на 15,4% в ткани печени, а АГП — на 80,8% и на 56,4% соответственно.

Применение мексидола у крыс с интоксикацией инсектицидом вызывало существенное снижение содержания МДА и АГП по сравнению с крысами, у которых моделировали хроническую интоксикацию банколом (в плазме крови: на 36,4% и 37,8%, в ткани печени: на 40,6% и 45,9% соответственно).

У животных с острой или хронической интоксикацией установлено статистически значимое повышение активности антиоксидантных ферментов: каталазы и СОД, в плазме крови: при острой интоксикации: на

Таблица

Содержание малонового диальдегида и ацилгидроперекисей, активность ферментов антиоксидантной системы в плазме крови и гомогенате печени крыс с острой или хронической интоксикацией банколом

Группа	Показатель							
	Содержание малонового диальдегида, (М ± m)		Содержание ацилгидроперекисей, (М ± m)		Активность каталазы, (М ± m)		Активность супероксиддисмутазы, (М ± m)	
	В плазме, мкмоль\мл	В ткани печени, мкмоль\г белка ткани	В плазме, у.е.	В ткани печени, у.е.	В плазме, мкат\мл	В ткани печени, мкат\мг белка ткани	В плазме, у.е.	В ткани печени, у.е.
Контрольная	1,96 ± 0,12	1,36 ± 0,11	0,53 ± 0,04	0,23 ± 0,02	10,43 ± 1,76	9,84 ± 0,99	15,05 ± 0,33	15,11 ± 0,18
Группа с острой интоксикацией банколом	5,35 ± 0,20 ***	1,75 ± 0,08 *	1,04 ± 0,05 ***	0,39 ± 0,03 **	19,39 ± 0,93 ***	3,76 ± 0,34 ***	19,39 ± 0,7 **	10,69 ± 0,3 ***
Группа с хронической интоксикацией банколом	6,6 ± 0,16 ***	2,02 ± 0,17 ***	1,88 ± 0,12***	0,61 ± 0,05 **	23,29 ± 1,01 ***	3,47 ± 0,47 ***	25,18 ± 0,89 ***	12,95 ± 0,39 **
Группа с хронической интоксикацией банколом, получавшая мексидол	4,2 ± 0,14 xxx	1,2 ± 0,06 xxx	1,17 ± 0,05 xxx	0,33 ± 0,02 xxx	21,21 ± 0,97	5,84 ± 0,77 x	17,8 ± 0,4 xxx	15,85 ± 0,27 xxx

Примечание. * — p<0,05 по сравнению с контрольной группой; ** — p<0,01 по сравнению с контрольной группой, *** — p<0,001 по сравнению с контрольной группой; x — p<0,05 по сравнению с группой с хронической интоксикацией банколом; xx — p<0,01 по сравнению с группой с хронической интоксикацией банколом; xxx — p<0,001 по сравнению с группой с хронической интоксикацией банколом

85,9% и 29,5% соответственно; при хронической интоксикации: на 123,3% и 67,3% соответственно. Напротив, в ткани печени обнаружено существенное снижение активности и каталазы, и СОД при обоих способах применения инсектицида (при острой интоксикации: в 2,62 раза и 29,3% соответственно; при хронической интоксикации: в 2,84 раза и на 14,3%. Использование мексидола приводило к повышению активности каталазы в ткани печени на 68,3%, но не оказывало существенного влияния на активность фермента в плазме. Существенное повышение активности СОД под действием мексидола обнаружено только в ткани печени (на 22,4%, $p < 0,05$). Напротив, в плазме крови обнаружено статистически значимое снижение активности этого фермента на 29,3%.

Повышение концентрации пестицида может вызывать изменение фосфолипидного и липидного состава клеточной мембраны [8], что может приводить к увеличению содержания непредельных жирных кислот, которые являются основным субстратом свободнорадикального окисления. Известно, что механизм действия банккола связан с блокадой чувствительных к никотину холинорецепторов на постсинаптической мембране [9]. Нарушение функциональной активности холинорецепторов вызывает расстройства регуляции сосудистого тонуса в микроциркуляторном русле с последующим развитием тканевой гипоксии. Именно эти два фактора: повышение содержания субстрата ПОЛ и вызванный гипоксией окислительный стресс, приводят, по нашему мнению, к усилению ПОЛ при интоксикации банкколом.

Накопление банккола, и длительная стимуляция свободнорадикального окисления вызывают снижение активности антиоксидантных ферментов в ткани печени. Содержание компонентов антиоксидантной системы в тканях снижается в результате их активного потребления в условиях избыточного образования свободных радикалов [10]. Одновременно нарушается поступление новых антиоксидантов вследствие изменения кровотока в капиллярах. В работе показано, что в ткани печени под влиянием банккола наблюдается угнетение активности СОД, что, по-видимому, обусловлено её ингибированием при накоплении продуктов ПОЛ, а также возможными структурными изменениями молекулы фермента, в частности, её гликированием [11]. Кроме того, активность СОД может снижаться в результате развития повреждений гепатоцитов, обусловленных интоксикацией [12]. При этом, как известно, уровень активности каталазы, нейтрализующей перекись водорода, на фоне высокого содержания малонового диальдегида усиливает токсическое действие ПОЛ [13].

В то же время повышение активности СОД и каталазы в плазме крови обусловлено, по нашему мне-

нию, усилением продукции этих ферментов в клетках, в которых не происходит аккумуляции пестицида, в частности, в лейкоцитах.

Известно антиоксидантное, антигипоксическое, мембранопротекторное действие мексидола [14]. В наших экспериментах выявлено положительное терапевтическое действие препарата при хронической интоксикации банкколом. Показано стимулирующее действие мексидола на активность СОД в печени, что подтверждает данные литературы о его влиянии на активность этого фермента [15]. Отсутствие подобного влияния мексидола на содержание СОД в плазме крови животных, подвергшихся хронической интоксикации банкколом, связано, по-видимому, с тем, что развитие интоксикации вызывает значительное увеличение активности этого фермента в плазме, и препарат не проявляет своего эффекта на фоне высокой исходной активности СОД. В нашем исследовании установлено также стимулирующее влияние мексидола на активность каталазы в ткани печени, что объясняется предупреждением подавления активности фермента избыточным накоплением продуктов ПОЛ.

Таким образом, нами установлено, что острая или хроническая интоксикация банкколом вызывает активацию ПОЛ, а мексидол является эффективным средством, снижающим эти проявления интоксикации.

References

1. Walter J., Rogan N., Ragan B. Evidence of effects of environmental chemicals on the endocrine system in children. *Pediatrics*. 2003; 112(2): 247-52.
2. Spravochnik pestitsidov i agrokhimikatov, razreshennykh k primeneniyu v Rossiyskoy Federatsii. M.: Publisher Agorus; 2013. 745 p. (M.: Izdatel'stvo AGRORUS; 2013. 745 s.) (in Russian)
3. Shormanov V.K., Maslov S.V., Duritsyn E.P., Baranov Yu.N. Forensic chemical determination Bankol. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2010; 6(1): 39-41. (in Russian)
4. Korolev V.A., Shormanov V.K., Lyashev Yu. D., Gribach I.V., Kirishcheva N.E., Podturkin A.S. i dr. Distribution of insecticide Bankol in the blood and organs of rats in experimental intoxication. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2014; 12(2): 66-70. (in Russian)
5. Galaktionova L.P., Molchanov A.V., El'chaninova S.A., Varshavskiy B.Ya. State peroxidation in patients with gastric ulcer and duodenal ulcer. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1998; (6): 10-4. (in Russian)
6. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; (1): 16-9. (in Russian)
7. Makarenko E.V. Comprehensive definition of superoxide dismutase and glutathione reductase in erythrocytes of patients with chronic liver disease. *Laboratornoe delo*. (11): 48-50. (in Russian)
8. Mogosh G. *Acute poisoning*. Bucharest. Publisher: IDH; 1984. (Bucharest. Izdatel'stvo: RNI; 1984.) (in Russian)

9. Bryzgunova S.S., Eremina M.V. Assessment of toxicological effects of pesticides on the human body. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2011; (8): 95-6. (in Russian)
10. Negre-Salvayre A., Auge N., Ayala V., Basaga H., Boada J., Brenke R., and other Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 48(10): 2747-53.
11. Zenkov N.K., Lapkin V.Z., Men'shchikova E.B. Oxidative stress. *Biochemical and pathophysiological aspects*. M.: Science; Interperiodika. 2001. 243 p. (M.: Nauka; Interperiodika. 2001. 243 s.) (in Russian)
12. Sahna E., Parlakpinar H., Vardi N. Efficacy of melatonin as protectant against oxidative stress and structural changes in liver tissue in pineal-ectomized rats. *Acta Histochimica*. 2004; 106(4): 331-6.
13. Zor'kina A.V., Inchina V.I., Kostin Ya.V. Antioxidant action of cytochrome C under prolonged immobilization stress. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1997; 123(6): 642-4. (in Russian)
14. Motin V.G., Yasnetsov V.V., Zabozaev A.A., Karsanova S.K., Yasnetsov V.V. Electrophysiological study of the mechanism of action mexidol. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2012; 75(1): 3-7. (in Russian)
15. Volchegorskiy I.A., Miroshnichenko I.Yu., Rassokhina L.M., Malkin M.P., Fayzullin R.M., Pryakhina K.E. i dr. Protective effect of 3-hydroxypyridine with succinic acid, and the acute toxicity in mice alloxan. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2014; 77(1): 13-6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Королев Владимир Анатольевич, доктор биол. наук, проф. каф. биологии, медицинской генетики и экологии
Грибач Ирина Владимировна, соискатель кафедры биологии, медицинской генетики и экологии
Кирищева Наталья Егоровна, соискатель кафедры биологии, медицинской генетики и экологии

Сажина Н.Н.¹, Титов В.Н.², Евтеева Н.М.¹, Ариповский А.В.²

Изменение суммарной ненасыщенности жирных кислот липидов плазмы крови больных артериальной гипертензией в глюкозотолерантном тесте

¹ — ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН», 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

² — ФГБУ «Институт клинической кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса» Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д.15-а

Цель исследования — оценка в динамике глюкозотолерантного теста (ГТТ) содержания в плазме крови пациентов с артериальной гипертензией общего содержания двойных связей (ДС), незатерифицированных жирных кислот (НЭЖК), индивидуальных ЖК, инсулина, глюкозы и других анализов для выяснения функциональных связей между ними. **Методика.** Глюкозотолерантный тест проведен у 20 пациентов с артериальной гипертензией при отсутствии и наличии синдрома инсулинорезистентности (ИР). В плазме крови определено содержание индивидуальных ЖК, суммарное содержание НЭЖК, ДС, глюкозы, инсулина и других анализов. Кровь брали из вены натощак и через 2 и 4 ч, а плазму крови отделяли от эритроцитов и хранили при 70°С. Количественное определение ЖК проводили на аналитическом газовом хроматографе с использованием стандартных образцов ЖК. Суммарное содержание ДС в липидном пуле плазмы крови определяли методом озонирования. Содержание инсулина и С-пептида в плазме крови определяли на анализаторе «Иммулайт», а глюкозы, ТГ, НЭЖК, свободного ХС, и других анализов — на биохимическом анализаторе модели «Архитект-800». Достоверность различия величин считали по t-критерию Стьюдента (t-тест), используя 95%-ю доверительную вероятность ($p \leq 0,05$). **Результаты.** Установлено, что у пациентов без синдрома ИР содержание НЭЖК после нагрузки глюкозой снизилось в 3 раза, и в такой же мере возросла секреция инсулина, и понизилось содержание олеиновой и линолевой ЖК. При синдроме ИР секреция инсулина увеличилась в 8 раз, а содержание НЭЖК и индивидуальных ЖК уменьшилось менее значительно. Уменьшение суммарной ненасыщенности ЖК липидов плазмы крови, т.е. содержания ДС в ненасыщенных ЖК, отражает эффективность действия инсулина — первичную блокаду гидролиза триглицеридов в адипоцитах, снижение содержания НЭЖК, и, как следствие, вторичное усиление поглощения клетками глюкозы. Выявлена достоверная корреляция ($r = 0,851$) между содержанием ДС, определенным методом озонирования, и рассчитанным, исходя из концентрации индивидуальных ЖК с известным числом ДС. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что действие инсулина в ГТТ можно достоверно оценить на основании изменения в плазме крови не только содержания глюкозы, но и концентрации ненасыщенных ЖК и числа ДС, характеризующих степень ненасыщенности липидов плазмы крови.

Ключевые слова: глюкозотолерантный тест, инсулинорезистентность, двойные связи, жирные кислоты

Для корреспонденции: Сажина Наталья Николаевна, e-mail: Natnik48s@yandex.ru

Для цитирования: Сажина Н.Н., Титов В.Н., Евтеева Н.М., Ариповский А.В. Изменение суммарной ненасыщенности жирных кислот липидов плазмы крови больных артериальной гипертензией в глюкозотолерантном тесте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; (2): 74—80.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.10.14

Sazhina N.N.¹, Titov V.N.², Evteeva N.M.¹, Aripovsky A.V.²

Change of total nonsaturation of blood plasma lipids for patients with arterial hypertension in glucose tolerance test

¹ — FSBI «Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences»; 4 Kosyigina str., Moscow, 119334, Russia

² — FSBI «Russian Cardiology Research and Production Complex», Ministry of Health of Russian Federation, 15a, 3-rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

The research purpose — definition in dynamics of the glucose tolerance test (oGTT) in blood plasma for patients with arterial hypertension of the total content of double bonds (DB) and non-esterified fatty acids (NEFA), of the content of individual fatty acids (FA), glucose, insulin and other analytes for clarification of functional communications between them.

Methods. The oral glucose tolerance test (oGTT) was carried out for 20 patients with arterial hypertension at absence and presence of an insulin resistance (IR) syndrome. Blood was taken from a vein on an empty stomach and in 2 and 4 hours, blood plasma was separated from erythrocytes and stored at -70°C . Quantitative definition of FA was carried out on the analytical gas chromatograph with use of standard FA samples. The total double bonds content in a lipid pool of blood plasma was determined by an ozonization method. Content of insulin and C-peptide in blood plasma was determined on the Immulayt analyzer and glucose, TG, NEFA, free cholesterol (TCh) and other analytes — on the biochemical analyzer of the Arkhitekt-800 model. Reliability of distinction of sizes was considered by t-criterion, using 95% confidential probability ($p \leq 0,05$). For patients with various resistances to insulin (IR) the plasma content of NEFA decreases 3 times. **Results.** It is established that for patients with various resistances to insulin (IR) the plasma content of NEFA decreases 3 times. Out of IR insulin secretion during 2 hours after glucose loading increases 3 times, and decrease in the individual FA content is greater; in IR insulin secretion increases 8-fold, and decrease in individual FA content is less pronounced. Effect of insulin reflects a decrease of the DB (total nonsaturation of blood plasma lipids) and FA (olein and linoleic) content in blood plasma — blockade of triglyceride hydrolysis in subcutaneous adipocytes. Reliable correlation ($r = 0,851$) between the DB content determined by an ozonization method and calculated proceeding from concentration of individual FA with known DB number is revealed. **Conclusion.** The received results demonstrate that effect of insulin can be estimated at GTT authentically on the basis of change in blood plasma not only of the glucose content, but also concentration of nonsaturated FA and DB number characterizing degree of nonsaturation of blood plasma lipids.

Keywords: oral glucose tolerance test, resistance to insulin, double bonds, fatty acids.

For citation: Sazhina N.N., Titov V.N., Evteeva N.M., Aripovsky A.V.

Change of total nonsaturation of blood plasma lipids for patients with arterial hypertension in glucose tolerance test. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 74–80. (in Russ).

For correspondence: Natalia N. Sazhina, Candidate of phys.-math. sciences, Senior researcher, «FSBIS «Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences»; 4 Kosjigina ul., Moscow, 119334, Russia, e-mail: Natnik48s@yandex.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 17.10.14

Введение

Тест толерантности к глюкозе (ГТТ) — наиболее частый функциональный тест клинической биохимии: прием 75 г глюкозы per os и определение содержания ее в капиллярной крови натощак и через 2 часа [1]. Гипергликемия активирует поглощение клетками глюкозы по градиенту концентрации «межклеточная среда > цитоплазма», поскольку содержание глюкозы в цитоплазме всегда ниже, чем в межклеточной среде. Гипергликемию воспринимают сенсоры β -клеток поджелудочной железы и активируют секрецию в кровь проинсулина (инсулин + С-пептид). Образование активной формы инсулина происходит в крови при гидролизе С-пептида. Инсулин физиологично блокирует гидролиз ТГ в инсулинозависимых адипоцитах и уменьшает освобождение в кровоток ЖК в форме полярных неэтерифицированных ЖК (НЭЖК). Поглощенные клетками НЭЖК блокируют окисление ацетил-КоА, который митохондрии образуют из пирувата, нарабатываемого клетками при метаболизме глюкозы в пируватдегидрогеназном комплексе. Пока митохондрии имеют возможность поглощать НЭЖК из цитоплазмы и образовывать ацетил-КоА при β -окислении ЖК в матриксе, они не станут окислять ацетил-КоА из глюкозы, поскольку могут образовать его из пирувата.

Более глубоко понять действие инсулина на метаболизм глюкозы можно, изучив одновременно метаболизм ЖК и определив степень суммарной ненасыщенности липидов плазмы крови.

Исследованием метаболизма ЖК, глюкозы и других аналитов плазмы крови в ходе ГТТ занимались многие авторы [2–6]. В работе [3], например, используя современные дорогостоящие масс-спектрометры и жидкостные хроматографы, исследовали состав индивидуальных ЖК и их содержание в пуле НЭЖК. Однако ни в одной из этих работ не использовался достаточно оперативный метод озонирования для определения степени ненасыщенности липидов плазмы крови и связь ее с параметрами метаболизма ЖК и глюкозы в ГТТ.

Ранее установлено [7,8], что содержание в плазме крови триглицеридов (ТГ) взаимосвязано с концентрацией двойных связей (ДС) в ЖК липидов и липопротеинов (ЛП), так как число ДС в ЖК определяет все кинетические параметры метаболизма. Наличие в плазме крови мононенасыщенных ЖК с одной ДС (МЖК), 2–3 ДС в ненасыщенных ЖК (ННЖК) и 4–6 ДС в полиеновых ЖК (ПНЖК) является в филогенезе своего рода «метаболическим признаком» [8]. Чтобы обеспечить инсулинозависимые клетки (скелет-

ные миоциты, кардиомиоциты, жировые клетки и перипортальные гепатоциты) субстратами для наработки энергии, инсулин регулирует окисление ЖК в митохондриях и вторично метаболизм глюкозы.

Цель исследования — оценка в динамике ГТТ содержания в плазме крови пациентов с артериальной гипертензией общего содержания ДС, НЭЖК, индивидуальных ЖК, инсулина, глюкозы, С-пептида и других анализов для выяснения функциональных связей между ними.

Методика

ГТТ провели, согласно рекомендациям ВОЗ и Международной федерации диабета, у 20 пациентов с диагнозом артериальная гипертензия в Институте клинической кардиологии, получив их информированное согласие. Кровь брали из вены натощак и через 2 и 4 ч с помощью пластиковых шприцов с антикоагулянтом ЭДТА. Плазму крови отделяли от эритроцитов и хранили при 70°C. ЖК определяли на аналитическом газовом хроматографе модели «Вариан 3900» (США) при использовании кварцевой капиллярной колонки с неподвижной жидкой фазой «Супелко-вакс-10» (Швейцария). После модифицированной процедуры метилирования ЖК, пробы образцов вводили в инжектор хроматографа в объеме 2 мкл. Регистрация и обработка сигнала осуществлялась по программе «Мультихром-1,5х» [9]. Для количественного определения ЖК использовали стандартные образцы ЖК и стандартные смеси ЖК фирмы Супелко (Швейцария). Концентрацию индивидуальных ЖК выражали в ммоль/л плазмы крови. Содержание инсулина и С-пептида в плазме крови определяли на анализаторе «Иммулайт» («Сименс», ФРГ) с использованием диагностических наборов фирмы «Иммунно» (США). Содержание в плазме крови глюкозы, ТГ, НЭЖК, свободного ХС, фосфолипидов и кетонных тел измеряли на биохимическом анализаторе модели «Архитект-800» («Эбботт», США), используя биохимические наборы фирмы Диасис, ФРГ.

Суммарное содержание ДС в липидном пуле плазмы крови определяли методом озонирования, который основан на способности озона быстро присоединяться к ДС в ЖК с константой скорости реакции порядка 10^5 – 10^6 М⁻¹ с [10]. Липидную фракцию из плазмы крови экстрагировали хлороформом с последующим отделением ее водно-метанольной смесью. Измерения выполнены на анализаторе ДС АДС-4М. В качестве стандартного образца использовался стильбен с одной ДС, контроль работы прибора осуществлялся по β-каротину с 11 ДС [11]. Погрешность измерения содержания ДС составила ± 15%. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью

стандартных алгоритмов программ MS Excel. Достоверность различия величин считали по t-критерию Стьюдента (t-тест), используя 95%-ную доверительную вероятность ($p \leq 0,05$) [12].

Результаты и обсуждение

При физиологическом или повышенном содержании глюкозы в крови натощак, через 2 ч после ее приема уровень $\leq 7,8$ ммоль/л оценивают как норму. При содержании глюкозы $\geq 7,8$ ммоль/л гипергликемию рассматривают как нарушение толерантности к глюкозе, т.е. состояние резистентности к инсулину (ИР). В таблице приведены определенные в динамике ГТТ средние значения содержания некоторых анализов, индивидуальных ЖК и ДС для двух групп пациентов: без ИР (I гр., n = 7) и с ИР (II гр., n = 13). ($M \pm \sigma$), где σ — среднее квадратичное отклонение (СКО) в указанных группах.

В срок 2 ч ГТТ средняя концентрация глюкозы у пациентов без ИР существенно не изменилась, а при ИР гипергликемия возросла в 1,6 раза. Через 4 ч гликемия в обеих группах была в физиологических пределах. Секреция β-клетками инсулина у пациентов без ИР увеличилась в ~3 раза, а при ИР — в ~8 раз. Концентрация С-пептида — достоверный тест секреции инсулина β-клетками. Между содержанием в плазме крови инсулина и С-пептида в ГТТ (через 2 ч) выявлена позитивная коррелятивная зависимость с коэффициентами корреляции $r = 0,915$ и $r = 0,888$ для I и II групп пациентов. Инсулин блокирует освобождение НЭЖК из адипоцитов, и содержание НЭЖК в крови через 2 ч понижается в ~3 раза у пациентов обеих групп. Гипергликемия в ГТТ несущественно изменяет содержание в плазме крови насыщенных ЖК (НЖК): С14:0 миристиновой, С15:0 пентадециновой, С18:0 стеариновой, С16:0 пальмитиновой, а также С16:1 пальмитолеиновой МЖК. Различия в концентрации этих ЖК между группами пациентов также невелики. Статистически значимо снизилось содержание С18:1 олеиновой и С18:2 линолевой ЖК. Концентрация же других ННЖК и ПНЖК меняется не существенно. Можно полагать, что уменьшение содержания НЭЖК происходит за счет блокады инсулином освобождения из адипоцитов С18:1 олеиновой и С18:2 линолевой ЖК. Возможно, происходит и более быстрое поглощение их клетками.

Блокаду инсулином липолиза в адипоцитах можно оценить и при определении числа ДС в плазме крови методом озонирования. На рис. 1 приведены диаграммы суммарного содержания ДС в липидном пуле плазмы крови в ГТТ у пациентов, полученные этим методом (рис. 1,А). Было рассчитано также суммарное содержа-

Средние значения содержания анализов, ЖК и ДС в плазме крови пациентов в динамике ГТТ при отсутствии ИР (I гр.) и наличии ИР (II гр.). Степень изменения - $M_{2ч}/M_{нат}$.

Аналиты, $M \pm \sigma$: I гр. (n = 7), II гр. (n = 13)		Натощак	Через 2 ч	Через 4 ч	Степень изменения	t-тест
Глюкоза, ммоль/л	I гр.	6,15 ± 0,53	5,82 ± 1,04	4,25 ± 0,29	0,95	0,506
	II гр.	6,16 ± 0,62	9,93 ± 1,63	4,29 ± 0,83	1,61	0,0001
Инсулин, МЕ/мл	I гр.	18,3 ± 6,5	54,7 ± 32,3	11,5 ± 5,8	2,99	0,018
	II гр.	13,5 ± 4,3	106,0 ± 39,6	16,5 ± 6,3	7,85	2 · 10 ⁻⁵
С-пептид, нг/мл	I гр.	4,5 ± 0,9	11,1 ± 2,3	4,1 ± 1,1	2,48	0,0001
	II гр.	4,0 ± 1,1	17,3 ± 4,7	7,1 ± 1,9	4,33	3 · 10 ⁻⁷
НЭЖК, ммоль/л	I гр.	0,49 ± 0,17	0,15 ± 0,04	0,48 ± 0,28	0,31	0,001
	II гр.	0,55 ± 0,14	0,19 ± 0,15	0,34 ± 0,19	0,35	5 · 10 ⁻⁹
Триглицериды, ммоль/л	I гр.	1,93 ± 0,55	1,81 ± 0,48	1,72 ± 0,52	0,94	0,257
	II гр.	2,84 ± 0,55	1,70 ± 0,46	1,71 ± 0,47	0,92	0,021
Фосфолипиды, ммоль/л	I гр.	2,53 ± 0,14	2,43 ± 0,22	2,42 ± 0,17	0,96	0,153
	II гр.	2,55 ± 0,24	2,49 ± 0,27	2,43 ± 0,31	0,98	0,114
ХС свободный, ммоль/л	I гр.	1,35 ± 0,16	1,29 ± 0,17	1,32 ± 0,16	0,96	0,067
	II гр.	1,36 ± 0,19	1,31 ± 0,19	1,32 ± 0,21	0,96	0,008
Кетоновые тела, ммоль/л	I гр.	85 ± 11	84 ± 13	105 ± 37	0,99	0,704
	II гр.	106 ± 18	103 ± 18	109 ± 17	0,97	0,138
НОМА индекс, ммоль/л	I гр.	5,05 ± 1,97	14,92 ± 10,71	2,15 ± 1,05	2,95	0,042
	II гр.	3,72 ± 1,22	48,02 ± 22,9	3,19 ± 1,69	12,97	2 · 10 ⁻⁵
Жирные кислоты, ммоль/л						
Насыщенные (НЖК)						
Миристиновая, С14:0	I гр.	0,17 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,88	0,096
	II гр.	0,15 ± 0,05	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,87	0,022
Пентадеценивая, С15:0	I гр.	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	1,00	0,811
	II гр.	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,75	0,371
Пальмитиновая, С16:0	I гр.	2,76 ± 0,53	2,55 ± 0,51	2,53 ± 0,75	0,92	0,052
	II гр.	2,79 ± 0,53	2,56 ± 0,51	2,63 ± 0,57	0,92	0,008
Стеариновая, С18:0	I гр.	0,67 ± 0,15	0,62 ± 0,20	0,63 ± 0,15	0,93	0,016
	II гр.	0,66 ± 0,16	0,63 ± 0,22	0,63 ± 0,15	0,95	0,011
Мононенасыщенные (МЖК)						
Пальмитолеиновая, С16:1	I гр.	0,27 ± 0,06	0,25 ± 0,09	0,23 ± 0,09	0,93	0,262
	II гр.	0,31 ± 0,11	0,27 ± 0,09	0,27 ± 0,09	0,87	0,004
Олеиновая, С18:1	I гр.	2,12 ± 0,45	1,88 ± 0,45	1,91 ± 0,55	0,88	0,006
	II гр.	2,24 ± 0,47	1,96 ± 0,35	1,96 ± 0,45	0,88	0,003
Ненасыщенные (ННЖК)						
Линолевая, С18:2	I гр.	3,09 ± 0,68	2,79 ± 0,60	2,83 ± 0,82	0,90	0,059
	II гр.	3,17 ± 0,50	2,91 ± 0,54	2,97 ± 0,54	0,92	0,027
Дигомо-γ-линоленовая, С20:3	I гр.	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,04	1,00	0,457
	II гр.	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,93	0,143
Полиеновые (ПНЖК)						
Арахидоновая, С20:4	I гр.	0,71 ± 0,26	0,69 ± 0,25	0,72 ± 0,30	0,97	0,458
	II гр.	0,69 ± 0,19	0,68 ± 0,19	0,70 ± 0,19	0,98	0,786
Эйкозопентаеновая, С20:5	I гр.	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	1,00	0,674
	II гр.	0,07 ± 0,04	0,065 ± 0,03	0,063 ± 0,02	1,00	0,512
Докозопентаеновая, С22:5	I гр.	0,043 ± 0,01	0,044 ± 0,01	0,042 ± 0,01	1,02	0,720
	II гр.	0,042 ± 0,01	0,041 ± 0,01	0,042 ± 0,01	0,98	0,516
Докозагексаеновая, С22:6	I гр.	0,198 ± 0,06	0,195 ± 0,08	0,186 ± 0,09	0,98	0,877
	II гр.	0,226 ± 0,11	0,220 ± 0,09	0,229 ± 0,09	0,97	0,641
[C = C], ммоль/л, по озону	I гр.	13,55 ± 2,75	12,54 ± 2,92	12,79 ± 3,55	0,925	0,067
	II гр.	13,96 ± 2,83	13,02 ± 2,55	13,27 ± 2,67	0,933	0,068
[C = C], ммоль/л, по сумме ДС в индивидуальных ЖК	I гр.	16,17 ± 2,92	13,01 ± 3,43	14,21 ± 3,46	0,80	0,0044
	II гр.	16,68 ± 2,38	13,75 ± 2,65	14,15 ± 2,87	0,82	0,0001

ние ДС в ненасыщенных ЖК, исходя из данных хроматографического определения их концентрации и известными значениями ДС в них (рис. 1,Б).

Вклад ДС ненасыщенных ЖК, входящих в общий пул НЭЖК, незначителен (см. таблицу), поэтому он не учитывался. Корреляция результатов, полученных двумя способами, оказалась достаточно высокой ($r = 0,851$), что свидетельствует о корректности оценки степени ненасыщенности липидов плазмы крови методом озонирования. Из сравнения диаграмм можно заключить, что степень ненасыщенности плазмы крови определяется, главным образом, содержанием в ней МЖК, ННЖК и ПЖК. У большинства пациентов этот показатель через 2 часа ГТТ уменьшился, в основном за счет снижения содержания олеиновой и линолевой ЖК. На рис. 2 приведены корреляционные зависимости между содержанием инсулина и ДС в контрольной точке ГТТ (2 часа).

Видно, что чем сильнее вырос уровень инсулина, тем меньше понижено содержание ДС. Коэффициенты корреляции составили $r = 0,816$ для пациентов без ИР и $r = 0,643$ с ИР. Это может означать, что при ИР даже высокое содержание инсулина не может блокировать липолиз и физиологично понизить в плазме крови содержание ЖК и ДС. Если у пациентов без ИР понижается содержание олеиновой и линолевой ЖК, то при симптоме ИР этого не происходит — инсулин не блокирует липолиз в адипоцитах, и это — причина более высокого уровня глюкозы в контрольной точке ГТТ. Для понимания метаболизма, происходящего в ГТТ, важно выявить зависимость между секрецией инсулина и исходным содержанием в плазме крови пальмитиновой НЖК. На рис. 3 приведены зависимости концентрации инсулина через 2 часа и содержанием натоцка пальмитиновой ЖК (С16:0) для двух групп пациентов.

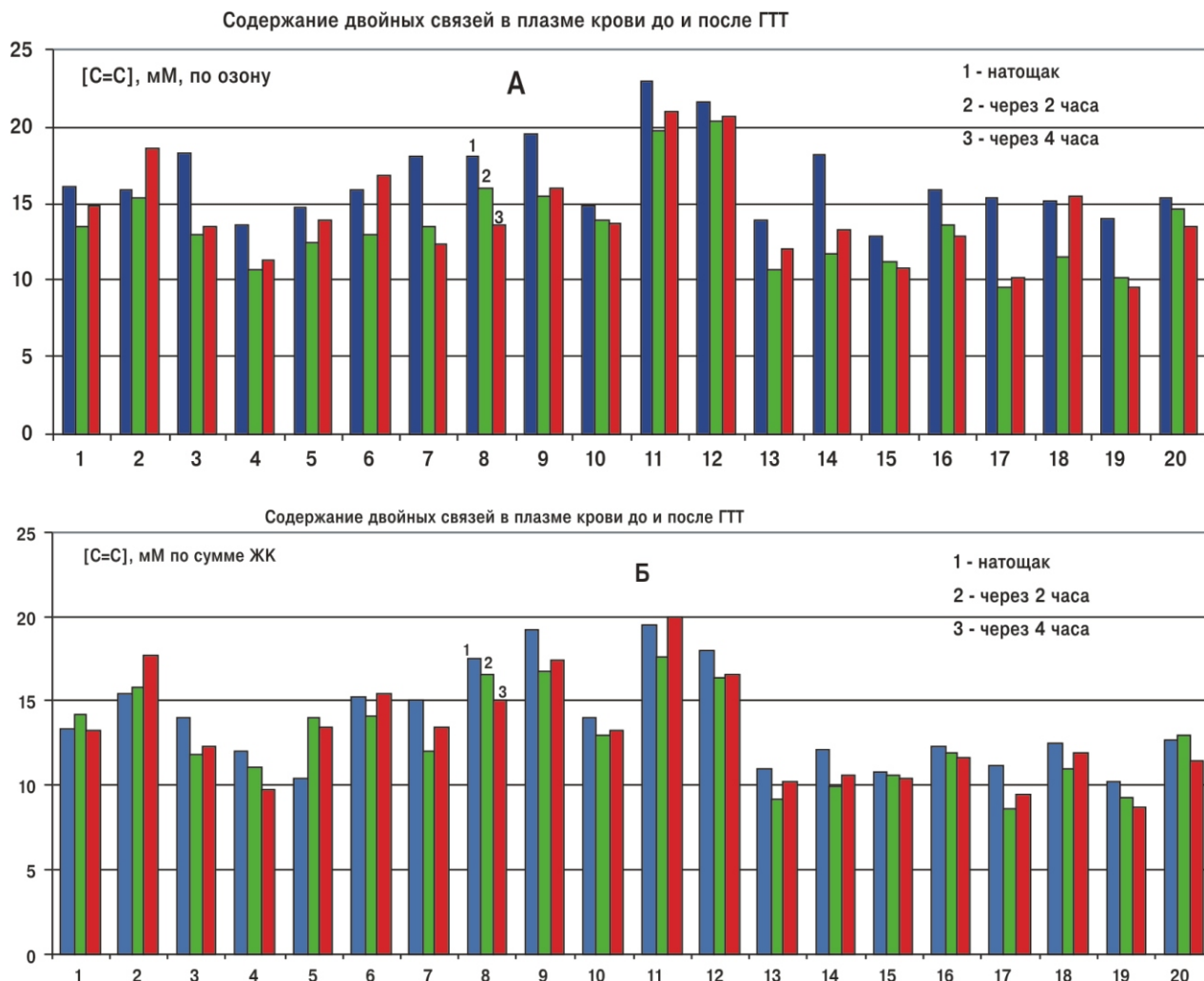


Рис. 1. Суммарное содержание ДС в липидах плазмы крови 20 пациентов в ГТТ, полученные: А — методом озонирования; Б — по сумме ДС ненасыщенных ЖК.

Как оказалось, у второй группы пациентов с ИР более высокая секреция инсулина в ГТТ (в 1,5—2 раза) при равном начальном содержании пальмитиновой кислоты. Корреляция между содержанием инсулина в контрольной точке ГТТ и исходным содержанием пальмитиновой НЖК оказалась выше ($r = 0,839$) у пациентов без ИР.

Согласно предложенной в [8] филогенетической теории общей патологии, система выработки инсулина сформировалась на поздних ступенях филогенеза при становлении биологической функции локомоции — движения за счет сокращения скелетных поперечнополосатых миоцитов. К этому времени регуляция метаболизма глюкозы миллионами лет ранее уже была завершена и для инсулина места в ней не осталось. Предназначение инсулина — обеспечивать субстратами для наработки энергии все клетки, которые во-

влечены в реализацию функции локомоции. Эти клетки не зависимы от инсулина и на плазматической мембране имеют рецепторы к нему. В биологической функции локомоции инсулин, в первую очередь, регулирует метаболизм ЖК и, через них, задействован в регуляции метаболизма глюкозы. Блокируя липолиз (гидролиз неполярных ТГ с освобождением НЭЖК) в инсулинзависимых адипоцитах, но не в инсулинозависимых клетках висцеральной жировой ткани (ВЖК), инсулин понижает содержание НЭЖК в межклеточной среде и уменьшает поглощение ЖК клетками. Одновременно инсулин активирует поглощение клетками глюкозы через ГЛЮТ4, вынуждая митохондрии формировать ацетил-КоА для наработки АТФ не путем β -окисления в ЖК, а при образовании пировиноградной кислоты в пируватдегидрогеназном комплексе цитоплазмы клеток. Пока там при-

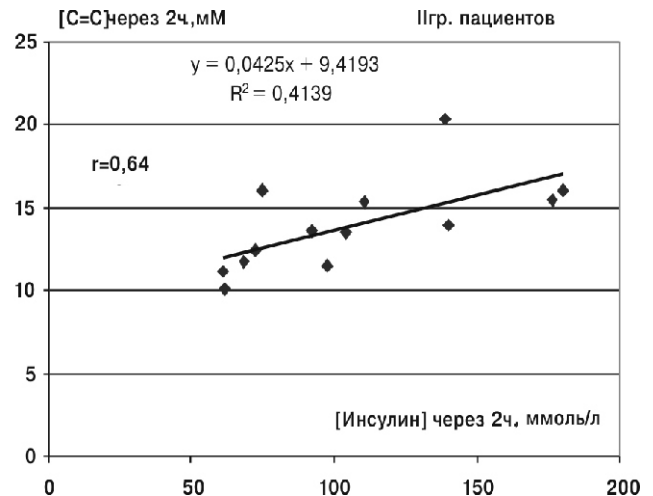
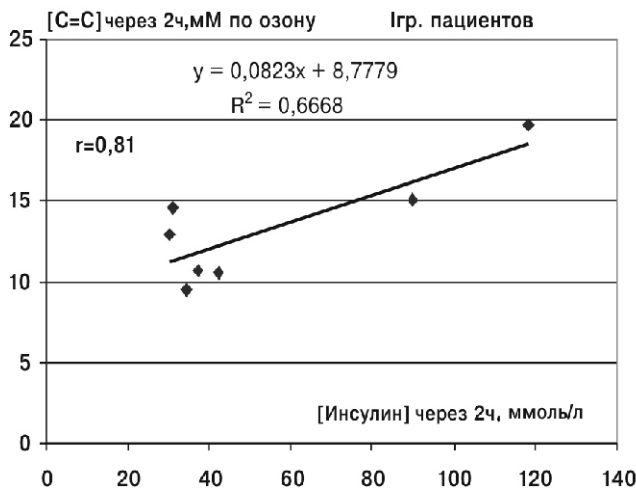


Рис. 2. Корреляция между концентрацией инсулина и содержанием ДС в плазме крови в контрольной точке ГТТ для пациентов без симптома ИР (I гр. слева) и с симптомом (II гр. справа).

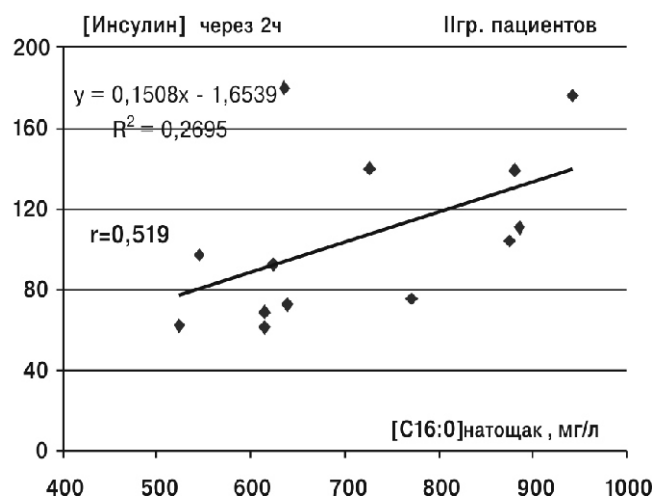
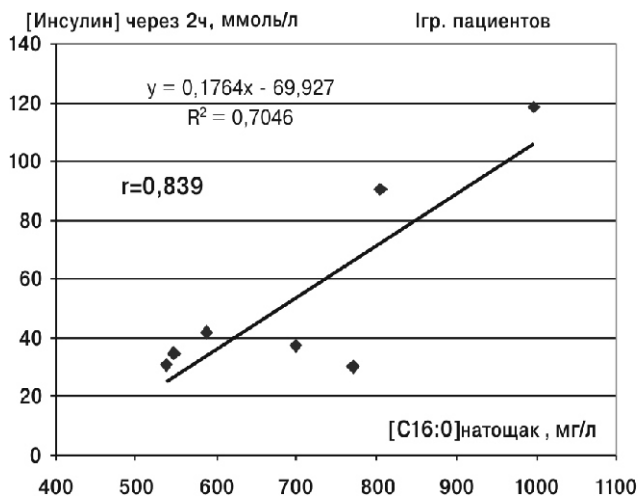


Рис. 3. Зависимость между секрецией инсулина в контрольной точке ГТТ и исходным (натошак) содержанием в крови пальмитиновой НЖК для пациентов без симптома ИР (I гр. слева) и с симптомом ИР (II гр. справа).

сутствуют ЖК, и их могут окислять митохондрии, они не начнут окислять ацетил-КоА, образованный из глюкозы. Симптом ИР патофизиологично определен тем, что инсулин ингибирует липолиз и освобождение в кровь НЭЖК только в генетически более поздних, инсулинозависимых адипоцитах, и не может блокировать липолиз в более ранних клетках ВЖК, которые не имеют рецепторов к инсулину. Поэтому активация постоянного освобождения НЭЖК из ВЖК является главной в патогенезе ИР. Неспособность инсулина понизить содержание НЭЖК в межклеточной среде и вынудить митохондрии клеток формировать ацетил-КоА из пировиноградной кислоты — основа патогенеза ИР. Это и было изучено нами в динамике ГТТ у пациентов при наличии и отсутствии симптома ИР. Чем больше инсулина в контрольной точке ГТТ, тем в меньшей степени понижено содержание ЖК и ДС в липидах. У пациентов без ИР секреция инсулина в среднем возрастает в 3 раза, в то время как у пациентов с ИР увеличена в 8 раз, причем гиперсекреция инсулина достоверно коррелирует с исходной концентрацией пальмитиновой НЖК в плазменных липидах. В общем пуле ЖК и в НЭЖК более выражено снижение содержания олеиновой МЖК и линоленовой ННЖК, причем оно происходит в большей степени у пациентов без ИР. Впервые отмечено, что чем выше исходное содержание пальмитиновой НЖК в плазме крови, тем в меньшей мере проявляется действие инсулина. И если действие полиеновых ЖК *in vivo* рассматривают как инсулиноподобное, то высокое содержание пальмитиновой НЖК оценивают как ингибирующее. Инсулин в первую очередь регулирует метаболизм ЖК и, в зависимости от функциональных особенностей митохондрий, вторично регулирует метаболические превращения глюкозы как субстрата выработки энергии. Среди липопротеинов (ЛП) инсулинозависимыми являются только генетически более поздние липопротеины очень низкой плотности. Самые ранние ЛП высокой плотности и несколько более поздние ЛП низкой плотности являются инсулиннезависимыми и рецепторов к более позднему в филогенезе гормону на мембране не имеют.

Таким образом, в проведенной работе мы впервые показали, что действие инсулина в ГТТ можно достоверно оценить на основании изменения в плазме крови не только содержания глюкозы, но и концент-

рации ненасыщенных ЖК и числа ДС, характеризующих степень ненасыщенности липидов плазмы крови. Выявлена достоверная корреляция ($r = 0,851$) между содержанием ДС, определенным методом озонирования, и рассчитанным, исходя из концентрации индивидуальных ЖК с известным числом ДС.

References

1. Balabolkin M.I., Kreminskaja V.M., Klebanova E.M. *Reference book of the polyclinic doctor. Endocrinology [Spravochnik polyklinicheskogo vracha. Endokrinologija]*. M. Medicine; 2005. (in Russian)
2. Amelyushkina V.A., Aripovsky A.V., Titov V.N. Fatty acids in blood plasma and erythrocytes in the glucose tolerance test. *Clinicheskaja laboratornaja diagnostica*. 2014; 4: 3-11. (in Russian)
3. Zhao X., Andreas P., Fritsche J., Elcnerova M., Fritsche A., Haring H. et al. Changes of the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009; 296: 284-93.
4. Breda E., Cavaghan M.K., Toffolo G. Oral Glucose Tolerance Test Minimal Model Indexes of β -Cell Function and Insulin Sensitivity. *Diabetes*. 2001; 50: 150-8.
5. Nakamura H., Faludi G., Spitzer J.J. Changes of individual free fatty acids during glucose tolerance test. *Diabetes*. 1967; 16: 175-80.
6. Kusunoki M., Tsutsumi K., Nakayama M. et al. Relationship between serum concentrations of saturated fatty acids and unsaturated fatty acids and the homeostasis model insulin resistance index in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Med. Invest.* 2007; 54: 243-7.
7. Titov V.N. *Phylogenetic theory of the general pathology. Pathogenesis of metabolic pandemics. Diabetes [Filogeneticheskaja teorija obzhshej patologii. Patogenes metabolicheskich pandemij. Sacarnij diabet]*. M: Infra-M; 2014. (in Russian)
8. Titov V.N., Lisitsyn D.M. The content of cholesterol and glycerin in blood plasma depends on number of double bonds of fatty acids in a bullet of lipoprotein lipids. *Byulleten experimentalnoj biologii i meditsiny*. 2006; 11: 521-4. (in Russian)
9. Aripovsky A.V., Kolesnik P.O., Vezhdel M.I., Titov V.N. Method of test preparation for gasochromatografic definition of fatty acids without preliminary extraction of lipids. *Clinicheskaja laboratornaja diagnostica*. 2012; 1: 3-6. (in Russian)
10. Rasumovskiy S.D., Zaikov G.E. *Ozone and its reactions with organic compounds [Ozon i ego reaktsii s organicheskimi soedinenijami]*. M: Nauka; 1974. (in Russian)
11. Gagarina A.B., Evteeva N.M. Kinetic regularities of an expenditure of nonsaturated bonds in during of beta carotene oxidation. *Khimicheskaja fizika*. 2002; 22 (7): 41-9. (in Russian)
12. Derffel' K. *Statistics in analytical chemistry [Statistica v analiticheskoy khimii]*. M: Mir; 1994. (in Russian)

Сведения об авторах:

Титов Владимир Николаевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаборатории клинической биохимии липопротеинов; e-mail: vn_titov@mail.ru

Сажина Наталья Николаевна, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр., e-mail: Natnik48s@yandex.ru

Евтеева Нина Михайловна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., e-mail: ninaevt@mail.ru

Ариповский Александр Викторович, канд. хим. наук, вед. науч. сотр., e-mail: aripovsky@rambler.ru

Очеретина Р.Ю., Стогов М.В.

Белково-азотистый обмен в печени мышей в восстановительном периоде после скелетной травмы

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, 640014, г.Курган, ул. М. Ульяновой, д. 6

Цель исследования. Определение динамики изменения показателей белково-азотистого обмена в печени в восстановительном периоде после перелома костей голени и после перелома костей голени у мышей на фоне острой печеночной недостаточности. **Методика.** Опыты проведены на 134 самцах мышей СВА в возрасте 2 мес. массой 25—30 г. В 1-й группе перелом костей голени моделировали путем механического повреждения сегмента конечности в верхней трети с медиальной стороны; во 2-й группе воспроизводили острую печеночную недостаточность (ОПН) внутривенным введением 20% раствора четыреххлористого углерода на оливковом масле; в 3-й группе перелом костей голени осуществляли на 3-и сутки после воспроизведения ОПН. В печени и сыворотке крови на 3-и сутки определяли содержание общего белка, мочевины, активность аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы, химический состав кости травмированного сегмента конечности через 3, 7, 28 сут. после нанесения травмы и травмы на фоне интоксикации четыреххлористым углеродом. **Результаты.** Обнаружено снижение содержания коллагена в костной ткани, снижение в раннем посттравматическом периоде уровня общего белка и мочевины в печени, снижение концентрации общего белка в сыворотке крови у мышей после перелома костей голени на фоне острой печеночной недостаточности. У мышей в посттравматическом периоде без острой печеночной недостаточности отмечалось повышение содержания общего белка и мочевины в печени в раннем периоде после травмы при стабильном уровне общего белка в сыворотке крови. **Заключение.** Установлено, что в восстановительном периоде изменения показателей белково-азотистого обмена в печени, индуцированные переломом костей голени, являются частью адаптивных перестроек направленных на поддержание уровня белков сыворотки крови. Действие двух повреждающих факторов (интоксикация и травма) может являться причиной нарушения костного обмена.

Ключевые слова: травма; печень; белково-азотистый обмен.

Для корреспонденции: Очеретина Руфина Юрьевна, e-mail: rufoch@mail.ru

Для цитирования: Очеретина Р.Ю., Стогов М.В. Белково-азотистый обмен в печени мышей в восстановительном периоде после скелетной травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 81—86.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта.

Поступила 11. 10.14

Ocheretina R.Iu., Stogov M.V.

Protein and nitrogen metabolism in the liver of mice during recovery period after skeletal injury

Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics; 6, ul. M.Ulianovoy, 640014, Kurgan, Russia

Purpose of study. Study the dynamics of protein and nitrogen metabolism in the recovery period after tibia fracture and after fracture of tibia bones in mice against a background of acute liver failure. **Methods.** Experiments were conducted on 134 male CBA mice at the age of two months of postnatal period, weighing 25—30 grams. In the first group were simulated fractured shin bones by mechanical damage to the limb segment in the upper third of the medial surface; in the second group acute liver failure was simulated by intraperitoneal injection of 20% carbon tetrachloride solution in olive oil; in the third group was simulated acute liver failure, then on the 3 day — tibia fracture. It was studied content of total protein in liver and blood serum, urea, alanine and aspartate, chemical composition of the bone of the injured limb segment in 3, 7, 28 days after tibia fracture and after fracture of tibia bones against a background of acute liver failure intoxication by carbon tetrachloride. **Results.** It was found a decrease bone tissue collagen, reduction of total protein level and urea in the liver in early posttraumatic period, reduction in the concentration of total serum protein in mice after tibia bones fracture against acute liver failure. It was noticed increase of total protein and urea in early posttraumatic period in mice without acute liver failure. **Conclusion.** It was found that in the recovery period changes in the indices of protein-nitrogen metabolism in the liver induced

by tibia fractures are a part of the adaptive restructuring aimed at maintaining the protein levels in the serum. Deepening of functional disorders of the liver under the influence of two damaging factors (intoxication and trauma) can cause disturbances of the bone metabolism.

Keywords: trauma; liver; protein-nitrogen metabolism

For citation: Ocheretina R.Iu., Stogov M.V. Protein and nitrogen metabolism in the liver of mice during recovery period after skeletal injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 81–86. (in Russ).

For correspondence: Rufina Iu. Ocheretina, Candidate of Biological sciences, Research worker «Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics»; 6, ul. M.Ulianovoj, 640014, Kurgan, 640014, Russia, e-mail: rufoch@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Ochretina R.Iu., <http://orcid.org/0000-0003-3023-891X>

Stogov M.V., <http://orcid.org/0000-0001-8516-8571>

Received 11.10.14

Введение

Несмотря на значительный прогресс в изучении патофизиологии посттравматических состояний остаются открытыми вопросы касающиеся роли системной регуляции репаративных процессов в травмированных тканях и органах. Показано, что сроки восстановления после травмы костей скелета зависят не только от характера и тяжести повреждений, но и от функционального резерва основных систем жизнеобеспечения [1] в том числе печени — жизненно важного полифункционального органа. [2, 3]. Так известно, что при функциональных нарушениях печени из-за токсического действия веществ (в том числе эндогенной интоксикации) на остеобласты снижается минеральная плотность кости [4, 5]. В то же время отмечается увеличение хронических заболеваний печени сочетанных с метаболическими заболеваниями костной ткани [6].

С другой стороны отмечается обратное влияние — при травме (синдром длительного раздавливания) нарушаются экскреторная и детоксикационная функции печени [7]. Однако в литературе немного сведений о функциональной морфологии печени [8, 9] и изменениях белково-азотистого обмена в печени [10] после травм костного скелета.

Цель исследования — изучение в динамике состояния белково-азотистого обмена в печени в восстановительном периоде после перелома костей голени и после перелома костей голени у мышей на фоне острой печеночной недостаточности.

Методика

Экспериментальное исследование выполнено на 134 самцах мышах СВА в возрасте двух мес. постна-

тального развития, массой 25—30 г. Животные были разделены на 3 группы: в 1-й группе (n = 36) моделировали перелом костей голени путем механического повреждения сегмента конечности в верхней трети с медиальной поверхности; во 2-й группе (n = 36) моделировали острую печеночную недостаточность (ОПН) внутрибрюшинным введением 20 % раствора четыреххлористого углерода (CCl₄) на оливковом масле; в 3-й группе (n = 36) моделировали ОПН, затем на 3-и сут. — перелом костей голени. Все манипуляции на мышцах проводили под диэтиловым наркозом. Развитие ОПН подтверждено данными гистологического исследования. В группу интактных животных вошли двухмесячные мыши (n = 14) и мыши трех мес постнатального развития (n = 12). Из эксперимента животных выводили в утренние часы декапитацией на 3, 7 и 28-е сут. после перелома (1-я и 3-я группы). Во 2-й группе 6-е сут. после введения CCl₄ соответствовали 3-м сут. после травмы, 31-е — 28-м сут.

Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 Минздрава СССР от 12.08.1977 г.) и требованиями инструкции № 12/313 Министерства здравоохранения РСФСР «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник» от 06.01.1973 г. На проведение исследования получено разрешение комитета по этике при ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России.

Для определения показателей белкового обмена после эвтаназии забирали образцы печени и крови. Используя ультрацентрифугу OPTIMA LE-80, Beckman-Coulter (США) при температуре 5°C получали супернатант гомогената печени. В супернатанте гомогената печени и крови определяли активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ), концентрацию общего белка и мочевины. Концентрацию общего белка, мочевины и активность аминотрансфераз определяли на биохимическом фотометре Stat Fax 1904+, Awareness (США), используя наборы реагентов фирмы «Витал Диагностикс» (Россия). Для определения химического состава кости высушивали, измельчали и делили на две навески. В первой — определяли концентрацию фосфата и кальция (мг%), используя наборы реагентов фирмы «Витал Диагностикс» (Россия); во второй — концентрацию оксипролина по реакции с реактивом Эрлиха, по содержанию оксипролина в кости рассчитывали количество коллагена (мг %) [11].

Результаты исследования обрабатывали методами непараметрической статистики. Значимость различий между двумя выборками оценивали с помощью W-критерия Вилкоксона для независимых выборок при уровне значимости $p < 0,05$. Значимость межгрупповых различий определяли с помощью непараметрического критерия Крускала—Уоллиса.

Результаты и обсуждение

По результатам исследования, химического состава кости травмированного сегмента конечности, выявлены статистически значимые изменения: увеличение содержания фосфата в группе после моделирования перелома костей голени (1-я группа), снижение содержания кальция и коллагена в группе после моделирования ОПН (2-я группа) относительно интактных животных (рис. А).

У мышей после перелома костей голени на фоне ОПН (3-я группа) обнаружено статистически значимое снижение фосфата и коллагена (рис. А), а отношение суммарного содержания кальция и фосфата к коллагену значимо повышалось относительно животных интактной и 1-й групп (рис. Б).

Содержание общего белка в печени и сыворотке крови у мышей всех экспериментальных групп через 3 сут. после перелома соответствовало норме (табл. 1).

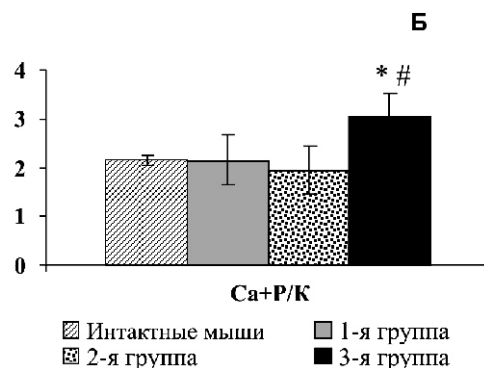
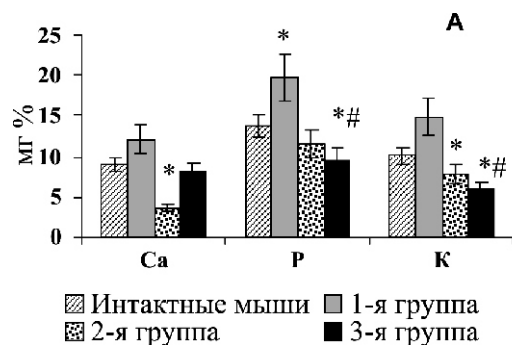
У мышей 3-й группы через 3 сут. после травмы отмечено значимое снижение содержания общего белка в печени и сыворотке крови относительно животных 1-й группы. Через 7 сут. после травмы уро-

вень общего белка в печени и сыворотке крови значимо снижался, у животных с переломом на фоне ОПН, относительно показателей животных интактных и 1-й группы.

Значимое повышение содержания мочевины в печени отмечено через 3-е сут. после травмы в 1-й группе относительно показателей животных интактных и 3-й группы (табл. 2).

В 3-й группе уровень мочевины на этом сроке эксперимента существенно снижался по сравнению с интактными животными. На 7-е сут. после травмы выявлено снижение содержания этого метаболита до значений нормы у животных 1-й группы, к концу эксперимента отмечено значимое снижение относительно показателей интактной и 3-й групп.

Статистически значимое снижение содержания мочевины в сыворотке крови обнаружено на 7 сут. после перелома у животных 1-й и 3-й групп (на фоне высокого содержания мочевины печени) и к концу эксперимента в 1-й группе относительно нормы.



Химический состав кости травмированного сегмента конечности у мышей на 28-е сут. после перелома костей голени (Ме, мг/100 г ткани).

А — Ca — кальций, P — фосфат, K — коллаген;

Б — Ca+P/K — соотношение суммарного содержания кальция и фосфата к коллагену.

* — значимые отличия с интактными животными при уровне значимости $p < 0,05$; # — значимые отличия относительно животных 1-й группы при $p < 0,05$.

Активность аминотрансфераз в печени животных 1-й, 2-й и 3-й групп к 3-м сут. эксперимента значимо повышалась относительно интактных животных (табл. 3). На последующих сроках активность АсАТ в этих группах сохранялась на одном уровне, а активность АлАТ в печени планомерно возрастала у мышей 1-й и 3-й групп до конца эксперимента. У животных 1-й группы активность АлАТ существенно повышалась относительно показателей мышей 3-й группы.

В сыворотке крови выявлены следующие статистически значимые изменения: повышение активности аминотрансфераз (АсАТ и АлАТ) через трое сут. в 1-й, 2-й и 3-й группах, через 7 сут. активности АсАТ в группах с переломом костей голени 1-й и 3-й и АлАТ во 2-й группе относительно показателей интактных мышей (табл. 4).

Анализ результатов исследования позволил выявить повышение отношения суммарного содержания кальция и фосфата к коллагену в костной ткани травмированного сегмента конечности после перелома костей голени на фоне ОПН.

У мышей без сопутствующих повреждений печени (1-я группа) динамика показателей субстратов и ферментов белково-азотистого обмена в печени отражает морфофункциональное состояние печени, индуцированное травмой костей голени. Отмеченное на ранних

этапах восстановительного периода повышение уровня мочевины в печени (3-и сут.) и стабильность содержания общего белка сыворотки крови (3-и и 7-е сут.) свидетельствуют об активации белково-азотистого обмена в печени. Вероятно, в восстановительном периоде после травмы компенсаторные реакции печени, с одной стороны, были направлены на поддержание уровня белка в крови, а с другой — на утилизацию катаболического азота тканей поврежденных травмой органов.

Выявленное снижение содержания мочевины в печени (3-и сут.) и общего белка в печени и сыворотке крови (7-е сут.) при высокой активности аминотрансфераз после травмы на фоне ОПН (3-я группа), отражает морфофункциональные нарушения печени обусловленные токсическим эффектом четыреххлористого углерода (нарушение радиальной ориентации печеночных балок, нарушение гемодинамики, каролизис, вакуолизация цитоплазмы, лизис клеток) [12] и последствиями адаптационных изменений индуцированных травмой тканей [9].

Следовательно, дополнительная метаболическая нагрузка на печень после травмы костей голени на фоне функциональных нарушений печени (3-я группа) на ранних этапах восстановительного периода (3—7-е сут.) вызывала снижение интенсивности белково-азотистого обмена в органе. Последнее об-

Таблица 1

Содержание общего белка в печени и сыворотке крови мышей в динамике эксперимента ($\bar{X} \pm m\bar{x}$)

Группа	3-и сутки эксперимента		7(6 [#])-е сутки эксперимента		28(31 [#])-е сутки эксперимента	
	Печень, (мг/100 г ткани)	Сыворотка крови, (г/л)	Печень, (мг/100 г ткани)	Сыворотка крови, (г/л)	Печень, (мг/100 г ткани)	Сыворотка крови, (г/л)
Интактные животные	85,6 ± 9,1	59 ± 9	85,6 ± 9,1	59 ± 9	85,6 ± 9,1	59 ± 9
1-я	94,4 ± 5,5 ⁽³⁾	62 ± 10 ⁽³⁾	91,1 ± 6,1 ⁽³⁾	55 ± 10 ⁽³⁾	74,3 ± 5,1*	56 ± 7
2-я	80,1 ± 9,2	53 ± 8	85,4 ± 7,7	59 ± 12	88,4 ± 4,6	62 ± 9
3-я	73,1 ± 9,2 ⁽¹⁾	51 ± 10(1)	72,4 ± 5,0* ⁽¹⁾	50 ± 7* ⁽¹⁾	87,7 ± 5,6	54 ± 7

Примечание. * — значимые различия при сравнении с показателями интактных животных при $p < 0,05$; # — сутки эксперимента для животных 2-й группы; ⁽¹⁾ — значимые различия при сравнении с показателями указанной группы животных при $p < 0,05$.

Таблица 2

Содержание мочевины в печени и сыворотке крови мышей в динамике эксперимента ($\bar{X} \pm m\bar{x}$)

Группа	3-и сутки эксперимента		7(6 [#])-е сутки эксперимента		28(31 [#])-е сутки эксперимента	
	Печень, ммоль/г ткани	Сыворотка крови, ммоль/л	Печень, ммоль/г ткани	Сыворотка крови, ммоль/л	Печень, ммоль/г ткани	Сыворотка крови, ммоль/л
Интактные животные	14,7 ± 3,6	5,89 ± 0,86	14,7 ± 3,6	5,89 ± 0,86	14,7 ± 3,6	5,89 ± 0,86
1-я	23,0 ± 5,9* ⁽³⁾	5,34 ± 0,56	16,6 ± 4,8	4,72 ± 0,43*	8,81 ± 2,3* ⁽³⁾	4,84 ± 0,79*
2-я	13,2 ± 4,4	5,55 ± 0,71	14,6 ± 5,7	6,11 ± 0,91	17,1 ± 5,6	6,02 ± 0,81
3-я	10,1 ± 3,2* ⁽¹⁾	5,76 ± 0,78	15,1 ± 4,0	5,13 ± 0,91	13,9 ± 2,9 ⁽¹⁾	6,14 ± 0,69

Примечание. * — значимые различия при сравнении с показателями интактных животных при $p < 0,05$; # — сутки эксперимента для животных 2-й группы; ⁽¹⁾ — значимые различия при сравнении с показателями указанной группы животных при $p < 0,05$.

Таблица 3

Активность АсАТ и АлАТ в печени мышей в динамике эксперимента ($\bar{X} \pm m\bar{x}$), мккат/мг белка

Группы	3-и сутки эксперимента	7(6 [#])-е сутки эксперимента	28(31 [#])-е сутки эксперимента
АсАТ	—	—	—
Интактные животные	0,088 ± 0,013	0,088 ± 0,013	0,088 ± 0,013
1-я	0,103 ± 0,010* (3)	0,115 ± 0,13* (3)	0,134 ± 0,003*
2-я	0,131 ± 0,014*	0,125 ± 0,019*	0,114 ± 0,011*
3-я	0,123 ± 0,011* (1)	0,141 ± 0,029* (1)	0,136 ± 0,021*
АлАТ	—	—	—
Интактные животные	0,282 ± 0,048	0,282 ± 0,048	0,282 ± 0,048
1-я	0,378 ± 0,014* (3)	0,362 ± 0,024* (3)	0,424 ± 0,014* (3)
2-я	0,354 ± 0,033*	0,457 ± 0,088*	0,311 ± 0,045
3-я	0,321 ± 0,067 (1)	0,333 ± 0,035* (1)	0,381 ± 0,078* (1)

Примечание. * — значимые различия при сравнении с показателями интактных животных при $p < 0,05$; # — сутки эксперимента для животных 2-й группы

Таблица 4

Активность аминотрансфераз в сыворотке крови у мышей в динамике эксперимента ($\bar{X} \pm m\bar{x}$), мккат/л

Группа	3-и сутки эксперимента	7(6 [#])-е сутки эксперимента	28-е сутки эксперимента
АсАТ	—	—	—
Интактные животные	0,207 ± 0,061	0,207 ± 0,061	0,207 ± 0,061
1-я	0,402 ± 0,089*	0,430 ± 0,085*	0,198 ± 0,066
2-я	0,271 ± 0,046*	0,239 ± 0,074	0,218 ± 0,049
3-я	0,312 ± 0,044*	0,274 ± 0,041*	0,226 ± 0,067
АлАТ	—	—	—
Интактные животные	0,267 ± 0,071	0,267 ± 0,071	0,267 ± 0,071
1-я	0,576 ± 0,098*	0,285 ± 0,041	0,226 ± 0,062
2-я	0,481 ± 0,098*	0,348 ± 0,079*	0,273 ± 0,093
3-я	0,370 ± 0,088*	0,307 ± 0,062	0,204 ± 0,091

Примечание. * — значимые различия при сравнении с показателями интактных животных при $p < 0,05$; # — сутки эксперимента для животных 2-й группы

стоятельство влияло на химический состав кости травмированного сегмента конечности у животных после перелома костей голени на фоне ОПН.

Таким образом, представленные результаты исследования позволяют заключить, что изменения показателей белково-азотистого обмена в печени, индуцированные переломом костей голени, являются частью адаптивных перестроек направленных на поддержание уровня белков сыворотки крови. Усугубление функциональных нарушений печени при действии двух повреждающих факторов (интоксикация и травма) может являться причиной нарушения костного обмена.

References

1. Panteli M., Pountos I., Jones E., Giannoudis P.V. Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. *J Cell Mol Med.* 2015; 19(4): 685-713.

2. Duckworth A.D., Bennet S.J., Aderinto J., Keating J.F. Fixation of intracapsular fractures of the femoral neck in young patients: risk factors for failure. *J Bone Joint Surg. Br.* 2011; 93(6): 811-16.

3. Chakkalakal D.A., Novak J.R., Fritz E.D., Mollner T.J., McVicker D.L., Garvin K.L., McGuire M.H., Donohue T.M. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol.* 2005; 36(3): 201-14.

4. Guanabens N., Pares A. Osteoporosis in liver cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2012; 35(6): 411-20.

5. Guanabens N., Monegal A., Cerda D., Muxi A., Gifre L., Peris P., Pares A. Randomized trial comparing monthly ibandronate and weekly alendronate for osteoporosis in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2013; 58(6): 2070-8.

6. Mansueto P., Carroccio A., Seidita A., Di Fede G., Craxm A. Osteodystrophy in chronic liver diseases. *Intern Emerg Med.* 2013; 8(5): 377-88.

7. Zarubina I.V., Yunisov I.A., Shabanov P.D. Efficiency of antihypoxants in compression syndrome. *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v cherezvychaynykh situatsiyakh.* 2009; 2: 68-72. (in Russian)

8. Lebed M.L., Benemansky V.V., Bocharov S.N., Puseva M.E., Mikhailov I.N., Korzun A.N., Lepehova S.A. Changes of internal organs in the long-term period of bone injury in experiment. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SO RAMN*. 2006; 5: 224-7. (in Russian)

9. Ocheretina R.Iu., Mkrchan O.Z., Stogov M.V. Morphometric parameters of vessels of the liver lobule in mice in the recovery period after tibial injury. *Morfologiya*. 2012; 141(2): 32-4. (in Russian)

10. Luneva S.N., Grebneva O.L., Boychuk S.P., Lukin S.Yu., Romanenko S.A. Peculiarities of liver function in pati-

ents with closed fractures of the lower limbs, combined with a brain injury. *Geniy Ortopedii*. 2005; 1: 49-52. (in Russian)

11. Men'shikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P., Andreeva Z.M., Ankirskaya A.S., Balakhovskiy I.S. *Laboratory Methods in the clinic: A Handbook. [Laboratornye metody issledovaniya v klinike: Spravochnik]* M.: Meditsina; 1987. 368 s. (in Russian)

12. Ocheretina R.Iu., Stogov M.V. Functional state of the liver after fracture of the tibial bones: (experimental study). *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2013; 99(12): 1389-96. (in Russian)

Сведения об авторах:

Очеретина Руфина Юрьевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. биохимии, email: rufoch@mail.ru

Стогов Максим Валерьевич, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии, e-mail: stogo_off@list.ru

© Пальцын А.А., 2016
УДК 616-092

Пальцын А.А.

Физические нагрузки и возрастные когнитивные изменения

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8
Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования
«Российская медицинская академия последипломного образования», 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

Возрастная деградация когнитивных способностей ухудшает качество жизни как самих стариков, так и их родственников, и становится существенной проблемой для общества. Тенденция демографических изменений в мире свидетельствует о предстоящем обострении этой проблемы. На такой вызов общественного развития медицина должна и может ответить улучшением профилактики и лечения старческой деменции. В качестве подтверждения возможностей современной науки в обзоре представлены медицинские наблюдения и результаты экспериментальных исследований, свидетельствующие, что физические нагрузки тормозят развитие многих проявлений старческой деградации мозга. Снижаются: оксидативный стресс, проницаемость гематоэнцефалического барьера, активация миелоидных клеток, активация комплемента; повышаются: нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа, экспрессия нейротрофических факторов, синаптогенез, нейральная пластичность, пролиферация эндотелиальных клеток и ангиогенез, количество перicyтов. Естественность нагрузок как профилактического и лечебного фактора подсказывает, что у него при разумном применении не может быть побочного действия.

Ключевые слова: физические упражнения; мозг; возраст; когнитивная недостаточность; сенильная деменция.

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАПО, e-mail: lrrp@mail.ru

Для цитирования: Пальцын А.А. Физические нагрузки и возрастные когнитивные изменения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; (2): 87–93.

Поступила 28.01.16

Paltsyn A.A.

Exercise and age-related cognitive decline

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315, Russia
Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, 125315, Russia

Cognitive abilities degradation induced by aging impairs the quality of life of the victims themselves, their families and becomes an essential difficulty for the society. The tendency of demographic changes in the world testifies to the forthcoming escalation of this problem. On such call of social development the medicine should and can respond by improving the prevention and treatment of senile dementia. As confirmation of opportunities of modern science medical observations and experimental results are presented in the review. They indicate that the exercise slow down the development of many manifestations of senile brain degradation. Are reduced: oxidative stress, the permeability of the blood-brain barrier, the activation of myeloid cells, activation of complement; are raised: neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus, expression of neurotrophic factors, synaptogenesis, neural plasticity, proliferation of endothelial cells and angiogenesis, pericytes content. Naturalness of exercise as a prophylactic and therapeutic factor suggests that it at reasonable application can have no adverse effect.

Keywords: exercises; brain; age; cognitive decline; senile dementia

For citation: Paltsyn A.A. Exercise and age-related cognitive decline. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (2): 87–93. (in Russ).

For correspondence: Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru

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

Received 28.01.16

Замедление физическими нагрузками когнитивной деградации и развития деменции — факт, известный сегодня далеко за пределами медицинской специальности. В связи с быстрым ростом доли пожилых и старых людей в населении планеты целенаправленное внедрение физических нагрузок в образ жизни становится всё более актуальной социальной, медицинской и экономической проблемой. Обзор посвящен медицинской стороне вопроса и, главным образом, механизмам полезного действия физических нагрузок.

Рассмотрим, что известно сейчас об изменениях мозга, возникающих при старении и приводящих к снижению когнитивной функции. По мере старения мозг атрофируется: уменьшается объем серого и белого вещества, увеличивается объем цереброспинальной жидкости [1]. По томографическим данным, ежегодное уменьшение объема мозга у взрослых людей составляет 0,2—0,5% [2]. На микроскопическом уровне эти данные расшифровываются как, прежде всего, снижение массы нейропиля и незначительное, не во всех зонах мозга выявляемое сокращение числа нейронов [3—6]. Относительно возрастных изменений нейронов Пуркинье есть сообщение, в котором представлены результаты экспериментального исследования свидетельствующие, что они уменьшались в числе на 11% и в размере на 9% у старых крыс с малоподвижным образом жизни, а у крыс такого же возраста с регулярными физическими нагрузками не найдено изменений ни в числе, ни в размере клеток Пуркинье [7].

По данным прижизненного магнитно-резонансного исследования, физические нагрузки замедляют возрастное уменьшение объема мозга в области фронтальной, париетальной и темпоральной коры [8]. Снижение массы нейропиля и атрофия белого вещества, начинается раньше (23—40 лет), чем атрофия серого вещества (41—59 лет). Атрофия нейропиля и белого вещества означает, в конечном счете, деградацию связей: уменьшение разветвленности дендритов, числа шипиков и бутонов, демиелинизацию аксонов [9—11].

Хорошо известное неблагоприятное действие на мозг стресса в значительной мере обусловлено действием глюкокортикоидов, а точнее, подавлением ими продукции нейротрофического фактора мозга (BDNF). По этой причине снижается, нейрогенез, плотность расположения шипиков, долговременная потенцияция — LTP [12]. Психологический стресс через посредство глюкокортикоидов повреждает нейроны гиппокампа [13].

При наиболее распространенной форме сенильной деменции — болезни Альцгеймера к упомянутым изменениям добавляются: существенная потеря нейронов в височных долях и фронтальной коре. Более вы-

ражена, чем при неосложненной деменции, потеря синапсов. Отмечается накопление в мозге, особенно в височных долях, бета-амилоида и . Последний, будучи связанным с микротрубочками, нарушает внутриклеточный (аксональный) транспорт и проведение импульса. Отложение бета-амилоида происходит и в стенках сосудов мозга, что выражается церебральной амилоидной ангиопатией [14]. Уменьшение диаметра и эластичности пораженных сосудов становятся причиной церебральной гипоперфузии, и усугубляет нейродегенерацию. Конечно, кроме собственно нейральных, сосудистые факторы риска (мерцательная аритмия, гипотония, диабет, гиперлипидемия, высокий уровень гомоцистеина и др.) с возрастающей частотой поражают стареющих людей и способствуют нарастанию когнитивных расстройств [14].

Старение клеток традиционно представляется как исчерпание предельного числа клеточных поколений [15]. Факторы такого старения — укорочение теломера и действие некоторых онкогенов, конечно, действуют на обновляющиеся клетки мозга (глиальные, васкулярные) как и на все пролиферирующие клетки. Особо актуален для мозга вопрос старения неделящихся клеток — нейронов [16]. Старение нейронов обуславливается повреждением ДНК окислительным стрессом, циркулирующими генетическими элементами [17], дисрегуляцией обмена кальция, нарушением фолдинга белка [18]. Изменения могут осуществляться посредством микроРНК [19]. Увеличение внутриклеточного содержания Ca^{2+} и нарушение способности удалять избыток Ca^{2+} в ответ на глутаматную стимуляцию обнаружены при старении нейронов гиппокампа [20]. Возможно, что нарушение гомеостаза кальция является нейрон-специфическим проявлением старости. В микроглиоцитах при старении обнаружены морфологические изменения и укорочение теломера [21]. Старческие изменения: укорочение теломера, повышенное содержание реактивных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS) наблюдали в нейральных стволовых клетках [22]. Нарушения в работе мозга, в том числе и когнитивные, могут быть обусловлены процессами, совершающимися не только в нейрональных элементах. Хронические воспалительные изменения резидентных и пришлых клеток (микроглиоцитов/макрофагов, астроцитов) могут проявляться у стариков нейрональной патологией вообще и когнитивной недостаточностью, в частности [23].

В качестве доказательства факта благотворного влияния постоянных физических нагрузок на сохранение когнитивных способностей, приводим лишь одну публикацию из необозримого их количества [24]. Психиатрические исследования проводили у 18 766 женщин в возрасте 70—81 года в течение

7 лет. По окончании исследования выборку разделили на пять частей соответственно нарастанию физической нагрузки выполняемой испытуемыми. Пятая часть этой выборки, отличавшаяся максимальной физической активностью, сохраняла когнитивную способность на 20% выше, чем пятая часть с минимальной физической активностью. К этому наблюдению, сделанному на людях, добавим результат эксперимента, с моделированием болезни Альцгеймера [25]. Постоянные нагрузки в виде бега предотвращали развитие патологии, тогда как у не бежавших крыс отмечены похожие на болезнь Альцгеймера изменения.

Считается, что накопление ошибок в структуре ядерной и митохондриальной ДНК является главной причиной (определяемой геномом) нарушения функций мозга в старости [26—29]. Ошибки преимущественно возникают из-за окислительного стресса — действия ROS: супероксидного аниона, гидроксила, перекиси водорода, других окислителей и свободных радикалов. Они являются продуктами нормального метаболизма, но содержание их может увеличиваться под влиянием сверхнагрузки или некоторых факторов среды: ультрафиолета, ионизирующего излучения, промышленных загрязнений. ROS конечно вызывают повреждения ДНК и в физиологических концентрациях при действии не чрезвычайных, а обычных факторов среды. Отмечено увеличение числа двухцепочечных разрывов (double-strand breaks — DSBs) ДНК у молодых взрослых мышей под действием физиологической нагрузки — исследования незнакомо-го окружения [30]. Наибольшее число DSB было в зубчатой извилине — области ответственной за обучение и память. Возврат к исходному уровню DSB происходил в 24 ч. Увеличение нейрональной активности сенсорной стимуляцией, увеличивало выраженность DSB. Физические нагрузки, конечно, увеличивают содержание реактивных форм кислорода и азота [31]. Разумеется, при интенсивном разрушении ядерной ДНК нормальными и, тем более, экстремальными раздражителями жизнь была бы невозможна, если бы не существовала система репарации ДНК с различными молекулярными механизмами [32, 33]. В частности, острые повышения ROS при достаточном числе повторений приводят к адаптации к такого рода повреждениям, путем повышения активности антиоксидантных ферментов [34]. Упражнения стимулируют биогенез митохондрий. Однако эффективность системы репарации ДНК снижается с возрастом [35].

В исследовании транскрипционного профиля фронтальной коры людей от 26 до 106 лет [36] обнаружено, что после 40 лет формируется группа генов со сниженной скоростью экспрессии. Это оказались гены, определяющие синаптическую пластичность,

везикулярный транспорт и митохондриальную функцию. В промоторах таких генов отмечались выраженные повреждения ДНК. Эти изменения сочетались с повышением уровня экспрессии антистрессорных, антиоксидантных генов и генов репарации ДНК. Иными словами, проявлялись признаки интенсификации процесса репарации ДНК в ответ на усиление разрушающего процесса.

Kohman с соавторами [37] сравнивая взрослых (3,5 мес.) и старых (18 мес.) мышей обнаружили различия в экспрессии 1193 генов: 596 — повышение, 597 — снижение уровня экспрессии. Статистически значимые различия отмечены для многих генов реорганизации хроматина, антиген-презентации, регуляторов клеточного цикла, гормонального ответа, синаптической структуры, синаптической функции, липидного метаболизма. Физическая нагрузка состояла в 8-недельном ежедневном беге в колесе. Она изменяла уровень транскрипции 838 генов. Для рассматриваемой темы наиболее интересно то, что для 117 генов изменения экспрессии при старении и физической нагрузке были противоположны. Старение понижало уровень транскрипции генов митотической активности, клеточного роста и миграции, внутриклеточного транспорта, а бег увеличивал скорость транскрипции этих генов, как у взрослых, так и у старых мышей. Связь транскрипции со структурой хроматина не нуждается в доказательствах. Обсуждаемый эксперимент показал, что нагрузка восстанавливает модифицирующие хроматин возрастные изменения, сохраняет «молодое» состояние ДНК и соответственный режим транскрипции.

Принципиальная связь работы мозга с окислительно-восстановительными (митохондриальными) процессами, столь же очевидна, как и с кровообращением. Недавно опубликована статья [38] о влиянии 12-недельной физической нагрузки на следующие показатели состояния митохондрий: белки окислительного фосфорилирования, регуляторные белки, белки биогенеза митохондрий, маркеры окислительного стресса, сигнальные белки апоптоза, маркеры ауто(мито)фагии. Исследовали кору и мозжечок. Нагрузки снижали концентрацию маркеров стресса и апоптоза, уровень остальных белков повышался. От того же коллектива появились еще 2 статьи об экспериментах проведенных по той же схеме, но определяющих влияние токсического вещества на те же показатели митохондрий при нагрузках, полученных перед курсом интоксикации и в течение курса интоксикации. В обоих вариантах эксперимента нагрузки ослабляли все проявления оксидативного стресса в сравнении с неподвергавшимся нагрузкам контролем [39, 40]. Регулярные физические нагрузки оказывают нейропротективное действие увеличением

продукции антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (SOD), эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), а также факторов роста: нейротрофического фактора мозга (BDNF), фактора роста нервов (NGF) инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Уменьшается продукция ROS [41]. Индуцируется продукция нейромедиаторов (дофамина, серотонина, норэпинефрина), действующих разнообразно и, в том числе, стимулирующих нейрогенез, ангиогенез, синаптогенез и ингибирующих каспазы [42].

Одним из первых исследований механизма благотворного действия нагрузок на мозг была работа Van Praag и соавт. [43]. Авторы описали увеличение нейрогенеза в зубчатой извилине бежавших взрослых мышей.

В мышечной работе участвуют наряду с моторной зоной также ассоциативная и лимбическая зоны, повышается продукция дофамина, опиоидов и каннабиоидов, что обеспечивает чрезвычайно важный анксиолитический и «радостный» эффект упражнений [44, 45].

Наиболее очевидной связью мышечного движения с работой мозга представляется связь через афферентные и эфферентные нервные сигналы и изменение циркуляции крови. В последние годы для объяснения влияния циркуляции на мозг используется понятие нейроваскулярный комплекс [46]. Имеется в виду особенность капилляров мозга — примыкание ножек астроцитов к базальной мембране. Эта анатомическая особенность обеспечивает особо тесное взаимодействие нервной и микроциркуляторной систем. Было показано [47], что такое взаимодействие осуществляется с участием аполиipoproteина E (ApoE). Эти авторы описали развивающуюся с возрастом структурно-функциональную недостаточность гематоэнцефалического барьера у мышей. Данные изменения сопровождались нейровоспалением, общим нарушением поведения и конкретными видами движения. Физические нагрузки со среднего (12 мес.) до старого (18 мес.) возраста мышей способствовали сохранению цереброваскулярных структур, предотвращали нарушения поведения и уменьшали проявления нейровоспаления в коре и гиппокампе старых мышей. Методом РНК-секвенирования авторы исследовали транскрипцию многих сотен генов в разных областях мозга старых (21 мес.) мышей сравнительно с молодыми (4 мес.). Возрастные различия заключались как в увеличении, так и в уменьшении скорости транскрипции отдельных генов. Транскрипционный профиль фронтотриентальной коры старых мышей показал значительное снижение транскрипции матрикс-ассоциированных генов и генов перицитов, что

в какой-то мере объясняло нарушение работы нейроваскулярных единиц.

В этом эксперименте нагрузки (упражнения) обеспечивались свободным доступом мышей к медленно вращающемуся диску с 12 мес. (стареющие) до 18 мес. (старые) возраста. Периодическое включение диска заставляло животных днем и ночью некоторое время бегать по нему. От принудительного помещения на такой диск авторы отказались во избежание стресса. Бегающие мыши в возрасте 18 мес. обладали такой же силой сцепления с проволочным потолком и способностью строить гнезда, как и в возрасте 12 мес. В контроле (мыши, не имеющие доступа к диску) эти качества в возрасте 18 мес. статистически значимо снижались. Благоприятное действие упражнений сочеталось со стабилизацией синапсов и нейропластичности. У бегающих мышей, в сравнении с контрольными, не снижался уровень синаптофизина, т.е. не было признаков ослабления или утраты синаптических связей. Нейральная пластичность оценивалась также по экспрессии гена *Arc* (activity-regulated cytoskeletal gene). *Arc* транскрипция индуцируется нейрональной активностью [48]. Для функционального контроля транскрипции этого гена была исследована скорость извлечения пищевых комочков из искусственной норы (burrowing behavior) [47]. Бегающие старые мыши не только быстрее контрольных сверстников выполняли задание, у них выявлялась и более интенсивная цитохимическая окраска париетальной коры на ген *Arc* и большее число клеток с совмещением метки *Arc* и *NeuN* (маркер зрелых нейронов). Таким образом, было показано, что в выполнении данной поведенческой реакции у тренированных животных участвует большее число нейронов.

Объем отложений фибрина у бегающих старых мышей оказался в 2 с лишним раза меньше, чем в контроле. Физическая нагрузка обеспечивала лучшее сохранение базальной мембраны в микрососудах, что выявлялось статистически значимо более интенсивной окраской микрососудов коры и гиппокампа (CA1) на коллаген IV. В коре бегающих старых мышей содержание перицитов по экспрессии PDGFR α ⁺ (platelet-derived growth factor receptor subunit) было значительно больше, чем у контрольных сверстников и практически не отличалось от этого показателя у стареющих (12-мес.) животных. Иными словами, возрастных изменений по содержанию перицитов у бежавших мышей не было. По существу такая же динамика цитохимической окраски выявлена при исследовании входящих в нейроваскулярные элементы концевых ножек астроцитов (маркер: аквапорин-4). Интенсивность метки у бежавших старых мышей более чем в 2 раза превышала таковую у контрольных сверстников.

Недавно в клиническом исследовании магнитно-резонансным методом было показано возрастное повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера в области гиппокампа, сочетающееся с когнитивной дисфункцией [49].

Продукты комплемента существенно влияют на работу мозга. Есть данные, свидетельствующие, что содержание компонентов распада комплемента может изменяться с возрастом. Так содержание белка C1q при нормальном старении мышей и человека может увеличиваться до 300 раз [50]. Такое увеличение распределяется по мозгу крайне неравномерно и наиболее выражено по локализации, раннему сроку проявления и высоте концентрации вещества в окологиппокампической зоне гиппокампа (зубчатой извилины) и черной субстанции. Вредное влияние C1q авторы аргументируют тем, что C1q — дефицитные мыши показали в гиппокамп-зависимых поведенческих тестах гораздо меньшее снижение когнитивной функции сравнительно с дикими сверстниками.

Исследование транскрипционного профиля [47] показало увеличение экспрессии многих компонентов классического пути активации комплемента в гиппокампе старых мышей. Поскольку нагрузки предотвращали дисфункцию нейроваскулярных элементов, деградацию синапсов и поведенческие нарушения, авторы, прежде всего, исследовали действие нагрузок на продуцентов комплемента микроглиоциты/моноциты в мозге старых мышей. Плотность сети микрососудов несущих цитохимическую метку микроглиоцитов/моноцитов в коре у бегавших старых мышей была существенно ниже, чем у сверстников, лишенных специальной физической нагрузки. Обратное соотношение количества микроглиоцитов/моноцитов и перицитов указывало на прямую связь потери перицитов с активацией миелоидных клеток. Перициты — важный компонент, обеспечивающий стабильную функцию сосудов, уровень кровотока, состояние ГЭБ [51]. Нагрузки уменьшали на 35% содержание в коре C1q⁺ клеток, т.е. снижали уровень активации комплемента. Таким образом, при старении показана прямая связь между потерей перицитов и увеличением содержания C1q — инициатора классического пути активации комплемента. Независимо от того является ли увеличение численности C1q⁺ клеток результатом пролиферации местной микроглии или инфильтрации пришлыми моноцитами, оно указывает на участие в процессе старения врожденного иммунного ответа.

Есть основания предполагать, что аполипопротеин E может быть посредником в торможении старческой нейроваскулярной дисфункции. Так ген APOE рассматривается в качестве кандидата в генетические факторы влияния на продолжительность жизни чело-

века [52]. Есть указания на связь APOE с атеросклерозом и риском развития болезни Альцгеймера [53]. Наконец, магниторезонансным исследованием обнаружено влияние APOE на энторинальную кору — объект наиболее раннего поражения при развитии болезни Альцгеймера [54].

Soto и соавт. [47] обнаружили, что у APOE-дефицитных мышей тормозящее действие нагрузок на развитие возрастной нейроваскулярной патологии не проявляется. Тренированные APOE-дефицитные животные к 18-мес. возрасту по поведенческим, силовым проявлениям и показателям состояния микрососудистого русла не отличались от нетренированных сверстников.

Физическая активность увеличивает также пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез в мозге [55]. Бег увеличивает экспрессию в гиппокампе факторов роста IGF и VEGF, стимулирующих не только ангиогенез, но и нейрогенез в гиппокампе [56, 57].

Полагают, что когнитивная ущербность и ухудшение моторной функции в старости, в конечном счете, обусловлены синаптической недостаточностью [58]. В рассмотренной выше работе [47] есть указание на благоприятное действие тренировок на состояние синапсов и нейропластичность — более высокий, чем без нагрузок, уровень синаптофизина и экспрессии гена Arc.

Электронно-микроскопическое исследование [59] обнаружило у мышей нарастающую по мере старения (от 2 до 24 мес.) утрату сенсорных синапсов в гломерулярном слое обонятельных луковиц. Объем слоев и число нейронов с возрастом не изменялись. Есть сведения, что нагрузки могут увеличивать плотность расположения шипиков, т.е. восстанавливать количество синапсов. Наблюдение сделано на крысах при исследовании гиппокампа (зубчатая извилина и СА1) и слоя Ш в энторинальной коре [60].

Приведенные выше сведения о механизмах и результатах действия физических нагрузок убеждают, что они могут изменить течение старости, перевести её из старости болезненной в старость здоровую или хотя бы отодвинуть срок наступления болезненной старости.

References

1. Lemaitre H., Goldman A.L., Sambataro F., Verchinski B.A., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R. et al. Normal age-related brain morphometric changes: Nonuniformity across cortical thickness, surface area and grey matter volume? *Neurobiol. Aging.* 2012; 33(3): 617.e1-617.e9.
2. Salthouse T.A. . *Psychol. Bull.* 2011; 137(5): 753-84.
3. Pakkenberg B., Pelvig D., Marner L., Bundgaard M.J., Gundersen H.J., Nyengaard J.R. et al. Aging and the human neocortex. *Exp. Gerontol.* 2003; 38(1-2): 95-9.

4. West M.J., Gundersen H.J. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1990; 296: 1-22.
5. West M.J., Coleman P.D., Flood D.G., Troncoso J.C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1994; 344: 769-72.
6. Rutten B.P., Korr H., Steinbusch H.W., Schmitz C. The aging brain: less neurons could be better. *Mech Ageing Dev.* 2003 Mar; 124(3):349-55. Saver JL. Time is brain-quantified. *Stroke.* 2006; 37: 263-6.
7. Larsen J.O., Skalicky M., Viidik A. Does long-term physical exercise counteract age-related Purkinje cell loss? A stereological study of rat cerebellum. *J Comp Neurol.* 2000 Dec 11; 428(2): 213-22.
8. Colcombe SJ, Erickson KI, Raz N, Webb AG, Cohen NJ, McAuley E, Kramer AF Aerobic fitness reduces brain tissue loss in aging humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003 Feb;58(2):176-80.
9. Giorgio A., Santelli L., Tomassini V., Bosnell R., Smith S., De Stefano N. et al. . *Neuroimage.* 2010; 51: 943-51.
10. Bergado J.A., Almaguer W. Aging and synaptic plasticity: a review. *Neural Plast.* 2002; 9: 217-32.
11. Kelly KM, Nadon NL, Morrison JH, Thibault O, Barnes CA, Blalock EM. The neurobiology of aging. *Epilepsy Res.* 2006; 68(Suppl 1): 5-20.
12. Rothman S.M., Mattson M.P. Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. *Neuroscience.* 2013 June 3; 239: 228-40.
13. Hasan KM, Rahman MS, Arif KM, Sobhani ME. Psychological stress and aging: role of glucocorticoids (GCs) Age (Dordr) 2012;34:1421-1433).
14. Lange-Asschenfeldt C, Kojda G. Alzheimer's disease, cerebrovascular dysfunction and the benefits of exercise: from vessels to neurons. *Exp Gerontol.* 2008;43:499-504
15. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research.* 1961;25:585-621
16. Tan F.C., Hutchison E.R., Eitan E., Mattson M.P. Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders? *Biogerontology.* 2014 Dec; 15(6): 643-60.
17. Mitra Circulating nucleic acids: a new class of physiological mobile genetic elements. *F1000Res.* 2015 Sep 30; 4: 924.
18. Golde T.E., Miller V.M. Proteinopathy-induced neuronal senescence: a hypothesis for brain failure in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Alzheimer's research & therapy.* 2009; 1: 5.
19. Abe M., Bonini N.M. MicroRNAs and neurodegeneration: role and impact. *Trends in cell biology.* 2013; 23: 30-6.
20. Raza M., Deshpande L.S., Blair R.E., Carter D.S., Sombati S., DeLorenzo R.J. Aging is associated with elevated intracellular calcium levels and altered calcium homeostatic mechanisms in hippocampal neurons. *Neuroscience letters.* 2007; 418: 77-81.
21. Miller K.R., Streit W.J. The effects of aging, injury and disease on microglial function: a case for cellular senescence. *Neuron glia biology.* 2007; 3: 245-53.
22. Ferron S.R., Marques-Torreyon M.A., Mira H., Flores I., Taylor K., Blasco M.A., Farinas I. Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neurogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009; 29: 14394-407.
23. Ownby R.L., Neuroinflammation and cognitive aging. *Curr Psychiatry Rep.* 2010. 12(1): p. 39-45.
24. Weuve J, Kang JH, Manson JE, Breteler MM, Ware JH, Grodstein F. Physical activity, including walking, and cognitive function in older women. *JAMA.* 2004; 292: 1454-61.
25. Dao AT, Zagaar MA, Levine AT, Salim S, Erikson JL, Alkadhi KA Treadmill exercise prevents learning and memory impairment in Alzheimer's disease-like pathology. *Curr Alzheimer Res.* 2013 Jun; 10(5): 507-15.
26. Brasnjevic I., Hof P.R., Steinbusch H.W.M., Schmitz C. Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: Molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *DNA Repair (Amst).* 2008; 7(7): 1087-97.
27. Rutten B.P., Schmitz C., Gerlach O.H., Oyen H.M., de Mesquita E.B., Steinbusch H.W. et al. The aging brain: accumulation of DNA damage or neuron loss? *Neurobiol. Aging.* 2007; 28: 91-8.
28. Luk'janova L.D. Mitochondrial dysfunction — molecular mechanism of hypoxia. *Patogenez.* 2003; 1: 52-67. (in Russian)
29. Luk'janova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signal pathways and their role in the system of regulation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2011; 1: 3-19. (in Russian)
30. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V., Wang X., Ho K., Eilertson K. et al. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* 2013; 16(5): 613-21.
31. Wagner KH, Reichhold S, Neubauer O. Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Ann NY Acad Sci.* 2011 Jul; 1229: 115-23.
32. Caldecott K.W. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair.* 2004; 3: 875-82.
33. Bosshard M., Markkanen E., van Loon B. . *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(12): 16172-222.
34. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 153-910.
35. Li W., Vijg J. Measuring Genome Instability in Aging — A Mini-Review. *Gerontology.* 2012; 58(2): 129-38.
36. Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J. et al. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature.* 2004; 429(6994): 883-91.
37. Kohman R.A., Rodriguez-Zas S.L., Southey B.R., Kelley K.W., Dantzer R., Rhodes J.S. Voluntary wheel running reverses age-induced changes in hippocampal gene expression. *PLoS One.* 2011; 6(8):e22654.
38. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balza MM, Rizo-Roca D, Moreira PI, Oliveira PJ et al. Physical exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto(mito)phagy markers. *Neuroscience.* 2015 Aug 20; 301: 480-95.
39. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Mariani D, Rizo-Roca D, Padrao AI, Rocha-Rodrigues S, et al. Physical exercise prior and during treatment reduces sub-chronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. *Mitochondrion.* 2015 Jan; 20: 22-33.
40. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balza MM, Moreira PI, Oliveira PJ, Magalhães J, Ascensão A. Physical exercise mitigates doxorubicin-induced brain cortex and ce-

rebellum mitochondrial alterations and cellular quality control signaling. *Mitochondrion*. 2015 Dec 8; 26: 43-57.

41. Paillard T. Preventive effects of regular physical exercise against cognitive decline and the risk of dementia with age advancement. *Sports Med Open*. 2015; 1(1): 4

42. Matta Mello Portugal E, Cevada T, Sobral Monteiro R, Jr, Teixeira Guimaraes T, da Cruz Rubini E, Lattari E, et al. Neuroscience of exercise: from neurobiology mechanisms to mental health. *Neuropsychobiology*. (2013) 68:1-1410.1159/000350946.

43. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999; 2: 266-7010.

44. Raichlen DA, Foster AD, Gerdeman GL, Seillier A, Giuffrida A. Wired to run: exercise-induced endocannabinoid signaling in humans and cursorial mammals with implications for the «runner's high». *J Exp Biol*. 2012; 215: 1331-610.

45. Silveira H, Moraes H, Oliveira N, Coutinho ESF, Laks J, Deslandes A. Physical exercise and clinically depressed patients: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychobiology* (2013) 67:61-810

46. Zlokovic BV. Neurodegeneration and the neurovascular unit. *Nature medicine*. 2010. December; 16(12): 1370-1.

47. Soto I, Graham LC, Richter HJ, SN, Radell JE, Grabowska W1, Funkhouser WK et al. APOE Stabilization by Exercise Prevents Aging Neurovascular Dysfunction and Complement Induction. *PLoS Biol*. 2015 Oct 29;13(10):e1002279

48. Korb E, Finkbeiner S. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends in neurosciences*. 2011. November;34(11): 591-8.

49. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, et al. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 2015 Jan 21; 85(2):296-302.

50. Stephan AH, Madison DV, Mateos JM, Fraser DA, Lovelett EA, Coutellier L et al. A dramatic increase of C1q

protein in the CNS during normal aging. *J Neurosci*. 2013 Aug 14; 33(33): 13460-74.

51. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the bloodbrain barrier. *Nature medicine*. 2013. December; 19(12): 1584-96.

52. Brooks-Wilson AR Genetics of healthy aging and longevity. *Hum Genet*. 2013 Dec; 132(12): 1323-38.

53. de Chaves EP, Narayanaswami V. Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease in the brain. *Future lipidology*. 2008. October;3(5):505-30.

54. DiBattista AM, Stevens BW2, Rebeck GW, Green AE. Two Alzheimer's disease risk genes increase entorhinal cortex volume in young adults. *Front Hum Neurosci*. 2014 Oct 6; 8: 779.

55. Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*. 2007 Sep; 30(9): 464-72.

56. Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci*. 2000 Apr 15; 20(8): 2926-33.

57. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2003 Nov; 18(10): 2803-12.

58. Petralia R.S., Mattson M.P., Yao P.J. (2014). Communication breakdown: the impact of ageing on synapse structure. *Ageing Res. Rev.* March 2014; Vol. 14, 31-42.

59. Richard M.B., Taylor S.R., Greer C.A. (2010). Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 15613-8.

60. Stranahan AM, Khalil D, Gould E Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*. 2007; 17(11): 1017-22.

Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Семенцов А.С., Мухомедзянов А.В., Горбунов А.С.

Влияние посткондиционирования сердца на некроз, апоптоз, онкоз и аутофагию кардиомиоцитов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт кардиологии», 634012, г.Томск, ул. Киевская, д. 111А

Посткондиционирование ограничивает некроз кардиомиоцитов, индуцированный реперфузией. Антинекротический эффект посткондиционирования ограничен строгими временными рамками и во многом зависит от продолжительности ишемии и использованного протокола посткондиционирования. Большинство публикаций свидетельствует, что посткондиционирование ингибирует апоптоз кардиомиоцитов, вызванный реперфузией. Есть данные о том, что посткондиционирование препятствует реоксигенационному онкозу клеток сердца и усиливает аутофагию кардиомиоцитов.

Ключевые слова: сердце, посткондиционирование, некроз, апоптоз, онкоз, аутофагия

Для корреспонденции: Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. экспериментальной кардиологии, e-mail: Maslov@cardio-tomsk.ru

Для цитирования: Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Семенцов А.С., Мухомедзянов А.В., Горбунов А.С. Влияние посткондиционирования сердца на некроз, апоптоз, онкоз и аутофагию кардиомиоцитов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 94–100.

Финансирование. Статья подготовлена при поддержке Российского научного фонда грант 14-15-00008.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражает признательность за техническую помощь Н.А. Данильченко.
Поступила 04.02.15

Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Sementsov A.S., Mukhomedzyanov A.V., Gorbunov A.S.

Impact of postconditioning of the heart on necrosis, apoptosis, oncosis, autophagy of cardiomyocytes

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Cardiology, 634012, Tomsk, Kievskaya, 111A

Postconditioning limits cardiomyocyte necrosis induced by reperfusion. Antinecrotic effect postconditioning is limited by strict time limits and depends on the duration of ischemia postconditioning protocol used. The most of the publications shows that postconditioning inhibits apoptosis of cardiomyocytes evoked by reperfusion. There is evidence that postconditioning prevents reoxygenation oncosis of cardiac cells and enhances autophagy of cardiomyocytes.

Keywords: heart, postconditioning, necrosis, apoptosis, oncosis, autophagy

For correspondence: Maslov Leonid Nikolaevich, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head, Laboratory of Experimental Cardiology, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Cardiology, Kievskaya 111A, 634012, Tomsk, Russian Federation, e-mail: Maslov@cardio-tomsk.ru

For citation: Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Sementsov A.S., Mukhomedzyanov A.V., Gorbunov A.S. Impact of postconditioning of the heart on necrosis, apoptosis, oncosis, autophagy of cardiomyocytes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya.*

(Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (2): 94–100. (in Russ).

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

Funding. The study was supported by Russian Scientific Foundation grant 14-15-00008.

Acknowledgments. The authors are thankful for the technical assistance N.A. Danilchenko.

Information about authors:

Maslov L.N., <http://orcid.org/0000-0002-6020-1598>
Naryzhnaya N.V., <http://orcid.org/0000-0003-2264-1928>
Sementsov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-6991-4930>
Mukhomedzyanov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-1808-556X>
Gorbunov A.S. <http://orcid.org/0000-0002-5890-071X>

Received 04.02.15

Введение

Общеизвестно, что ишемические и реперфузионные повреждения сердца, возникающие при остром инфаркте миокарда (ОИМ), являются причиной гибели 13,8% больных, поступивших в стационар [1]. Часть этих пациентов погибает после успешной реканализации «инфаркт-связанной» коронарной артерии в результате реперфузионного повреждения сердца [1]. Вполне очевидно, что назрела настоятельная необходимость в разработке эффективных методов профилактики реперфузионных повреждений сердца. В этом отношении определенный оптимизм внушает ишемическое посткондиционирование сердца (ischemic postconditioning). Феномен был открыт в 2003 г. Z.Q. Zhao и соавт. [2]. Суть этого адаптивного феномена сводится к тому, что миокард становится устойчивым к действию реперфузии с помощью нескольких циклов реперфузии (не более 1 мин) и ишемии (не более 1 мин).

Антинекротический эффект посткондиционирования, впервые обнаруженный физиологами из Атланты (США), был подтвержден в последующих исследованиях, выполненных на собаках [3], кроликах [4—8], свиньях [9, 10], мышах [11—15], крысах [16—18], обезьянах [19] и в клинических наблюдениях, выполненных на пациентах с острым инфарктом миокарда [20, 21]. В ходе исследований, проводившихся L. Argaud и соавт. [4, 5], было показано, что у кроликов, в отличие от собак, можно добиться повышения толерантности сердца к действию ишемии и реперфузии с помощью 4 эпизодов 1-минутной коронароокклюзии и 1-минутной реперфузии, начиная первый сеанс коронароокклюзии через 1 мин после возобновления коронарной перфузии. Напротив, согласно данным греческих исследователей [6], повышения устойчивости сердца кролика к коронароокклюзии и реперфузии можно добиться в реперфузионном периоде только с помощью чередования 10-секундных интервалов коронароокклюзии и реперфузии. Причина подобных расхождений не ясна. Необходимо отметить, что посткондиционирование ограничено жесткими временными рамками. Обычно первый сеанс ишемии моделируют уже через 10—30 с реперфузии, продолжительность ишемии не превышает 10—30 с, а длительность реперфузии составляет 10—30 с [3, 6, 7, 15, 16, 23—25]. Американские исследователи в опытах на крысах подбирали оптимальный режим посткондиционирования [26]. Оказалось, что добиться кардиопротекторного эффекта у этих животных *in vivo* удастся только с помощью 3 или 6 сеансов реперфузии (10 с) и коронароокклюзии (10 с) [26]. Кардиопротекторный эффект посткондиционирования был слабее, чем инфаркт-лимитирующий эффект прекодиционирования. Кроме того, вы-

яснилось, что если первый сеанс коронароокклюзии выполнять через 1 мин от момента начала реперфузии, то защитный эффект посткондиционирования не формируется. Однако некоторые авторы для моделирования посткондиционирования прибегают к чередованию 1-минутной ишемии и 1-минутной реперфузии [3—5, 11, 12]. Исследователи из Университета Южной Алабамы [8] в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце кролика попытались подобрать оптимальный режим посткондиционирования. Выяснилось, что максимального ограничения очага некроза удастся добиться при чередовании 6 циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с).

Таким образом, общепринятого протокола посткондиционирования не существует, каждый коллектив исследователей вырабатывает подобный протокол, базируясь на своих собственных данных. Так, например, согласно H. Kim и соавт. [24], добиться повышения толерантности сердца крысы к действию ишемии-реперфузии можно с помощью 3 сеансов 10-секундной коронароокклюзии, тогда как, согласно данным C. Wang и соавт. [7], у кроликов *in vivo* подобная схема посткондиционирования абсолютно неэффективна и повысить резистентность сердца к ишемии-реперфузии можно только с помощью 3 экспозиций 20-секундной коронароокклюзии. В большинстве публикаций, посвященных кардиопротекторному эффекту посткондиционирования, продолжительность ишемии сердца составляет 30—45 мин. Вместе с тем, некоторые авторы говорят о том, что посткондиционирование может оказывать инфаркт-лимитирующий эффект при более длительной коронароокклюзии [3, 10]. Так, китайские исследователи в опытах на мини-свиньях показали, что 3-часовая коронароокклюзия и последующая 2-часовая реперфузия характеризуется соотношением размер инфаркта/область риска (РИ/ОР) равным 98%, а в случае посткондиционирования этот показатель снижался до 76% ($p < 0,05$) [10]. Областью риска принято называть зону ишемии-реперфузии. Согласно данным японских физиологов [3], посткондиционирование оказывает кардиопротекторный эффект при 90-минутной коронароокклюзии и 6-часовой реперфузии.

Кардиопротекторный эффект посткондиционирования отмечается не только в экспериментах *in vivo*, но и в опытах *in vitro*. Так, в опытах на изолированном перфузируемом сердце крысы было показано, что посткондиционирование способствует уменьшению соотношения РИ/ОР на 39% [22] или на 70% [8]. Кардиопротекторный эффект посткондиционирования отмечен и в ряде других исследований, выполненных на изолированном сердце [8, 27—29].

Феномен посткондиционирования удастся моделировать на изолированных кардиомиоцитах [30—32]. Так, H.C. Wang и соавт. [32] в группу

контроля включили изолированные кардиомиоциты взрослых крыс, которые подвергали 2-часовой гипоксии и 3-часовой реоксигенации. Посткондиционирование индуцировали с помощью 2 сеансов реоксигенации (5 мин) и гипоксии (5 мин) [32]. Некротическую гибель кардиомиоцитов оценивали по утечке в среду инкубации ЛДГ. Посткондиционирование способствовало снижению уровня ЛДГ [32]. Антинекротический эффект посткондиционирования в опытах на изолированных кардиомиоцитах отмечен и другими исследователями [30]. Физиологи из Атланты (США) [31] установили, что посткондиционирование заметно ингибирует реоксигенационную генерацию активных форм кислорода в изолированных кардиомиоцитах, уменьшает перегрузку клеток и митохондрий ионами кальция. Возможно, что подобное уменьшение Ca^{2+} -перегрузки имеет прямое отношение к кардиопротекторному эффекту посткондиционирования и ослаблению реперфузионной сократительной дисфункции после посткондиционирования.

Следовательно, в реализации защитного эффекта посткондиционирования ключевую роль играют события, происходящие на уровне сердца.

Необходимо отметить, что некоторым исследователям не удалось подтвердить существование кардиопротекторного эффекта посткондиционирования [9, 13, 33—36]. Большинство негативных результатов было получено на крысах. Так, при моделировании у крыс 30- и 45-минутной коронароокклюзии и последующей реперфузии *in vivo* не удалось обнаружить инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования [34]. Для посткондиционирования авторы публикации использовали чередование 4 циклов 10-секундной реперфузии и реокклюзии, 4 циклов 20-секундной реперфузии и реокклюзии или 8 циклов 30-секундной реперфузии и реокклюзии. Ни одно из названных воздействий не повлияло на соотношение РИ/ОР. Тот же коллектив исследователей [35] не смог подтвердить существование феномена посткондиционирования у кроликов *in vivo* при моделировании 30-минутной коронароокклюзии и 3-часовой реперфузии. Они использовали два протокола посткондиционирования:

- 1) 4 цикла 30-секундной реперфузии и реокклюзии;
- 2) 4 цикла 60-секундной реперфузии и реокклюзии.

В экспериментах на свиньях [9], также не был обнаружен инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования. Американские физиологи не подтвердили существование инфаркт-лимитирующего эффекта посткондиционирования у крыс *in vivo* с 45- или 60-минутной коронароокклюзией и 24-часовой реперфузией [36]. Противоречивые данные были получены в работе M.L. Kaljusto и соавт. [13]. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце

крыс им не удалось воспроизвести феномен посткондиционирования при моделировании феномена по трём различным протоколам. В то же время в опытах *in vivo* на крысах им удалось добиться повышения толерантности сердца к реперфузионным повреждениям с помощью посткондиционирования [13]. Возможно, что неудача, постигшая исследователей при моделировании посткондиционирования, определяется жёсткими временными рамками, от которых зависит эффективность посткондиционирования. Установлено, что инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования зависит от продолжительности коронароокклюзии. Так, X.L. Tang и соавт. [18] моделировали у крыс посткондиционирование с помощью 20 циклов окклюзии (10 с) и реперфузии (10 с). Продолжительность длительной коронароокклюзии составляла 30 мин, 45 мин и 60 мин. В случае 30-минутной ишемии посткондиционирование уменьшало соотношение РИ/ОР на 47%. В случае 45- и 60-минутной ишемии посткондиционирование не оказывало кардиопротекторного эффекта [18]. Спустя год были опубликованы результаты аналогичного исследования, на крысах с 15-, 30-, 45- и 60-минутной коронароокклюзией и последующей 2-часовой реперфузией [17]. Посткондиционирование моделировали с помощью трёх циклов ишемии (30 с) и реперфузии (30 с). Оказалось, что в случае 15- и 30-минутной коронароокклюзии посткондиционирование усугубляет ишемические и реперфузионные повреждения сердца, способствуя увеличению соотношения РИ/ОР. Напротив, в случае 45-минутной коронароокклюзии посткондиционирование обеспечивает уменьшение размера инфаркта на 31% по сравнению с контролем, а при 60-минутной коронароокклюзии с последующей транзиторной ишемией-реперфузией сердца очаг некроза уменьшается на 22% [17]. Испанские физиологи воспроизводили 90-минутную коронароокклюзию и последующей реперфузией у свиней [37]. Посткондиционирование они осуществляли с помощью 4 циклов дефляции (реперфузия 1 мин) и инфляции (ишемия 1 мин) интракоронарного баллона. Подобное посткондиционирование не оказывало эффекта на индекс РИ/ОР. Отсутствие инфаркт-лимитирующего эффекта можно объяснить двумя причинами: 1) слишком продолжительная ишемия (90 мин), 2) длительная реперфузия (1 мин) и ишемия (1 мин). В чем причина подобных расхождений между данными X.L. Tang и соавт. [18] и результатами исследований O.C. Manintveld и соавт. [17] не ясно. Возможно, причина кроется в различных анестетиках, использованных для общего наркоза, O.C. Manintveld и соавт. [17] использовали пентобарбитал, а X.L. Tang и соавт. [18] применяли сочетание кетамина и ксилазина. В опытах на изолиро-

ванном сердце мы провели сопоставление различных протоколов посткондиционирования. Сердце подвергали глобальной ишемии (45 мин) и реперфузии (30 мин), о некрозе кардиомиоцитов судили по уровню креатинфосфокиназы (КФК) в перфузионном растворе, оттекающем от сердца. Мы использовали 5 протоколов посткондиционирования:

- 1) 3 цикла реперфузии (10 с) и ишемии (10 с);
- 2) 5 циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с);
- 3) 3 цикла реперфузии (20 с) и ишемии (20 с);
- 4) 6 циклов реперфузии (20 с) и ишемии (20 с);
- 5) 3 цикла реперфузии (30 с) и ишемии (30 с) [38].

Посткондиционирование по первому протоколу не влияло на реперфузионный выброс КФК из миокарда. Использование других протоколов приводило к повышению толерантности кардиомиоцитов к действию реперфузии. Наиболее выраженный цитопротекторный эффект оказывало посткондиционирование по пятому протоколу, но даже в этом случае уровень КФК в перфузате, оттекающем от сердца, снижался всего лишь на 25% [38]. Видимо, антинекротический эффект посткондиционирования в значительной мере зависит от продолжительности ишемии и от использованного протокола.

Представленные данные в очередной раз подтверждают справедливость утверждения, что защитный эффект посткондиционирования ограничен строгими временными рамками.

Онкоз. Японские физиологи в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы показали [39], что посткондиционирование препятствует появлению онкоза кардиомиоцитов, который возникает после ишемии и реперфузии сердца. Онкоз — это состояние, которое предшествует некрозу [39, 40]. Это состояние характеризуется отёком клеток при сохранении целостности клеточной мембраны и, соответственно, без освобождения цитозольных белков в межклеточное пространство [40]. Онкоз развивается в результате нарушения работы ионных насосов и увеличения в цитоплазме концентрации ионов натрия и кальция [40].

Антиапоптотический эффект. Если во время ишемии главной причиной гибели кардиомиоцитов является некроз, то после возобновления коронарной перфузии важной, если не основной причиной гибели клеток сердца становится апоптоз [41, 42]. Антиапоптотический эффект посткондиционирования впервые был показан в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах [32]. Апоптоз оценивали по количеству TUNEL-позитивных клеток (terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling). Оказалось, что посткондиционирование

уменьшало на 21% количество TUNEL-позитивных клеток после гипоксии и реоксигенации кардиомиоцитов [32]. В сходных экспериментах на изолированных кардиомиоцитах крыс Y. Li и соавт. [43] для оценки апоптоза использовали меченный флуоресцентной меткой аннексин V. Этот белок избирательно связывается с фосфатидилсеринем, который в норме отсутствует на поверхности клеточной мембраны и появляется на поверхности клетки только если она вступает в апоптоз [44]. Оказалось, что гипоксическое посткондиционирование после 3-часовой гипоксии снижает количество аннексин-позитивных клеток почти в 3 раза [43]. Антиапоптотический эффект посткондиционирования был подтвержден и другими авторами в исследованиях, выполненных на изолированных кардиомиоцитах, которые подвергали воздействию гипоксии-реоксигенации [30, 45—47], в опытах на крысах с коронароокклюзией и реперфузией [25, 48, 49], в экспериментах на свиньях [50] и мышцах [50] с коронароокклюзией и реперфузией. Список подобных публикаций можно продолжить. По данным некоторых авторов [25, 45, 48—50], посткондиционирование снижает интенсивность реоксигенационного апоптоза в 2—3 раза.

По всей видимости, антиапоптотический эффект посткондиционирования может иметь место и у человека. В 2009 г пекинские кардиологи опубликовали результаты своих наблюдений, выполненных на пациентах с острым инфарктом миокарда, у которых осуществляли ангиопластику «инфаркт-связанной» коронарной артерии [52]. Посткондиционирование осуществляли с помощью раздувания интракоронарного баллона, использовали три цикла реперфузии (30 с) и ишемии (30 с) или три сеанса реперфузии (60 с) и ишемии (60 с). Через 7 сут. после ангиопластики в сыворотке крови определяли концентрацию Fas-лигандов [52]. Известно, что Fas-лиганды могут индуцировать апоптоз клеток, содержащих Fas-рецепторы [53]. Эти лиганды встроены в клеточные мембраны некоторых иммунокомпетентных клеток (макрофаги, активированные T-лимфоциты, натуральные киллеры) [54]. В результате частичного протеолиза под действием матриксных металлопротеиназ мембраносвязанные Fas-лиганды превращаются в свободные Fas-лиганды, которые действуют как гуморальные факторы, индуцирующие апоптоз [55]. Выше упомянутые китайские кардиологи установили, что посткондиционирование с помощью трех сеансов реперфузии (60 с) и ишемии (60 с) приводит к снижению уровня циркулирующих в крови Fas-лигандов на 25% по сравнению с пациентами с инфарктом, но без посткондиционирования. Сходные данные опубликовали в 2010 г X.M. Lin и соавт. [56]. Они обнаружили, что посткондиционирование, выполненное

у пациентов с ОИМ и чрескожным коронарным вмешательством, способствует увеличению фракции выброса левого желудочка. Одновременно у этих больных отмечалось снижение в крови уровня фактора некроза опухолей-TNF α [56], который, как известно, является провоспалительным цитокином и индуктором апоптоза [53]. Эти данные можно рассматривать, как косвенное доказательство антиапоптотического эффекта посткондиционирования. Вместе с тем, авторы не осуществляли сцинтиграфию миокарда с маркером апоптоза — меченым аннексином-V, поэтому категорично утверждать, что посткондиционирование проявляет антиапоптотический эффект у человека, пока нельзя.

Впрочем, некоторые исследователи не смогли подтвердить существование антиапоптотического эффекта посткондиционирования. Китайские кардиологи подвергали изолированное сердце крысы воздействию глобальной ишемии (30 мин) и реперфузии (2 ч) [57]. Посткондиционирование воспроизводили с помощью 3 циклов реперфузии (10 с или 30 с) и ишемии (10 с или 30 с). При использовании 3 циклов реперфузии по 10 с и ишемии по 10 с авторам удалось обнаружить инфаркт-лимитирующий эффект, но не антиапоптотический эффект. Второй протокол (3 цикла реперфузии по 30 с и ишемии по 30 с) оказался неэффективен в отношении некроза и апоптоза [57].

Таким образом, подавляющее число публикаций свидетельствует о том, что посткондиционирование препятствует апоптозу кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии сердца.

Аутофагия — это процесс удаления поврежденных органелл, таких как митохондрии и саркоплазматический ретикулум [58]. Кроме этого, аутофагия обеспечивает клетку питательными веществами при их дефиците. Распространенная аутофагия приводит к гибели клетки. Морфологически она выявляется присутствием многочисленных аутофагических вакуолей (аутофаголизосом) [59]. Процесс аутофагии включает индукцию, формирование аутофагосом, слияние аутофагосом с лизосомами и деградацию аутофаголизосом [58]. Ишемия и реперфузия приводят к активации Р13-киназного пути, способствующей активации беклина-1 (beclin1) — белка, признанного одним из важнейших триггеров аутофагии [58, 59]. В последние годы сформировалось мнение о благоприятном влиянии аутофагии на течение ишемического и реперфузионного повреждения сердца, об аутофагии как позитивном процессе относительно некроза и апоптоза [58, 59]. Так, показано усугубление повреждения кардиомиоцитов при ингибировании запуска аутофагии в фазу ишемии [59], обнаружено, что подавление экспрессии беклина-1 снижает ише-

мическую и реперфузионную активацию аутофагии и увеличивает клеточную гибель [58], что говорит о благотворной роли аутофагии.

Результаты первого исследования, посвященного изучению влияния посткондиционирования на процессы аутофагии кардиомиоцитов, были опубликованы в 2013 г. [60]. Опыты проводили на крысах с коронароокклюзией (30 мин) и реперфузией (2 ч). Посткондиционирование индуцировали с помощью трёх циклов реперфузии (10 с) и реокклюзии (10 с). Посткондиционирование способствовало уменьшению соотношения РИ/ОР в 2 раза. Ингибитор аутофагии 3-метиладенин (15 мг/кг внутривентрикулярно) полностью устранял инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к реперфузии. Кроме того, после посткондиционирования авторы зафиксировали в зоне риска увеличение уровня белков, принимающих участие в аутофагии: баклин 1; LC3-II (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A); лизосома-ассоциированный мембранный протеин 2; катепсин D; а так же увеличение уровня мРНК, кодирующей баклин 1, LC3-II [60]. Авторы обнаружили, что посткондиционирование способствует появлению в кардиомиоцитах аутофагических вакуолей. Представленные данные свидетельствуют, что посткондиционирование индуцирует аутофагию, которая может играть важную роль в повышении устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

Заключение

Посткондиционирование ограничивает некроз кардиомиоцитов, индуцированный реперфузией. Антинекротический эффект посткондиционирования ограничен строгими временными рамками и во многом зависит от продолжительности ишемии и использованного протокола посткондиционирования. Посткондиционирование ингибирует апоптоз кардиомиоцитов, вызванный реперфузией. Адаптация к реперфузии препятствует реоксигенационному онкозу клеток сердца, а посткондиционирование усиливает аутофагию кардиомиоцитов.

References

1. Марков В.А., Рябов В.В., Максимов И.В., Вышлов Е.В., Демьянов С.В., Сыркина А.Г. и др. Вчера, сегодня, завтра в диагностике и лечении острого инфаркта миокарда. *Сиб. мед. журн.* 2011; 26(2), Выпуск 1: 8-14.
2. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang N.P., Guyton R.A. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 285(2): H579-88.
3. Fujita M., Asanuma H., Hirata A., Wakeno M., Takahama H., Sasaki H. et al. Prolonged transient acidosis during early re-

- perfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292(4): H2004-08.
4. Argaud L., Gateau-Roesch O., Raïsky O., Loufouat J., Robert D., Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005; 111(2): 194-7.
 5. Argaud L., Gateau-Roesch O., Augeul L., Couture-Lepetit E., Loufouat J., Gomez L. et al. Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in postconditioned (but not preconditioned) hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 294(1): H386-91.
 6. Iliodromitis E.K., Zoga A., Vrettou A., Andreadou I., Paraskevaïdis I.A., Kaklamanis L. et al. The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits. *Atherosclerosis.* 2006; 188(2): 356-62.
 7. Wang C., Neff D.A., Krolikowski J.G., Weihrauch D., Bienengraeber M., Warltier D.C. et al. The influence of B-cell lymphoma 2 protein, an antiapoptotic regulator of mitochondrial permeability transition, on isoflurane-induced and ischemic postconditioning in rabbits. *Anesth. Analg.* 2006; 102(5): 1355-60.
 8. Yang X.M., Philipp S., Downey J.M., Cohen M.V. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res. Cardiol.* 2005; 100(1): 57-63.
 9. Schwartz L.M., Lagranha C.J. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 290(3): H1011-18.
 10. Zhao J.L., Yang Y.J., You S.J., Cui C.J., Gao R.L. Different effects of postconditioning on myocardial no-reflow in the normal and hypercholesterolemic mini-swines. *Microvasc. Res.* 2007; 73(2): 137-42.
 11. Gomez L., Thibault H., Gharib A., Dumont J.M., Vuagniaux G., Scalfaro P. et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293(3): H1654-61.
 12. Gomez L., Paillard M., Thibault H., Derumeaux G., Ovize M. Inhibition of GSK3 by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation.* 2008; 117(21): 2761-68.
 13. Kaljusto M.L., Rutkovsky A., Stenslokken K.O., Vaage J. Postconditioning in mouse hearts is inhibited by blocking the reverse mode of the sodium-calcium exchanger. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2010; 10(5): 743-8.
 14. Lauzier B., Delemasure S., Debin R., Collin B., Sicard P., Acar N. et al. Beneficial effects of myocardial postconditioning are associated with reduced oxidative stress in a senescent mouse model. *Transplantation.* 2008; 85(12): 1802-8.
 15. Tsutsumi Y.M., Yokoyama T., Horikawa Y., Roth D.M., Patel H.H. Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: *in vivo* and *in vitro* characterization. *Life Sci.* 2007; 81(15): 1223-7.
 16. Kloner R.A., Dow J., Bhandari A. Postconditioning markedly attenuates ventricular arrhythmias after ischemia-reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2006; 11(1): 55-63.
 17. Manintveld O.C., Te Lintel Hekkert M., van den Bos E.J., Suurenbroek G.M., Dekkers D.H., Verdouw P.D. et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292(3): H1551-60.
 18. Tang X.L., Sato H., Tiwari S., Dawn B., Bi Q., Li Q. et al. Cardioprotection by postconditioning in conscious rats is limited to coronary occlusions <45 min. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2006; 291(5): H2308-17.
 19. Yang X.M., Liu Y., Liu Y., Tandon N., Kambayashi J., Downey J.M. et al. Attenuation of infarction in cynomolgus monkeys: preconditioning and postconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 2010; 105(1): 119-28.
 20. Staat P., Rioufol G., Piot C., Cottin Y., Cung T.T., L'Huillier I. et al. Postconditioning the human heart. *Circulation.* 2005; 112(14): 2143-48.
 21. Thibault H., Piot C., Ovize M. Postconditioning in man. *Heart Fail. Rev.* 2007; 12(3-4): 245-48.
 22. Tsang A., Hausenloy D.J., Mocanu M.M., Yellon D.M. Postconditioning: a form of «modified reperfusion» protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ. Res.* 2004; 95(3): 230-2.
 23. Halkos M.E., Kerendi F., Corvera J.S., Wang N.P., Kin H., Payne C.S. et al. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 78(3): 961-9.
 24. Kin H., Zhao Z.Q., Sun H.Y., Wang N.P., Corvera J.S., Halkos M.E. et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 2004; 62(1): 74-85.
 25. Kin H., Wang N.P., Mykytenko J., Reeves J., Deneve J., Jiang R. et al. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor- κ B translocation and TNF release. *Shock.* 2008; 29(6): 761-8.
 26. Vinten-Johansen J., Zhao Z.Q., Zatta A.J., Kin H., Halkos M.E., Kerendi F. Postconditioning — a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* 2005; 100(4): 295-310.
 27. Peng L.Y., Ma H., He J.G., Gao X.R., Zhang Y., He X.H. et al. Ischemic postconditioning attenuates ischemia/reperfusion injury in isolated hypertrophied rat heart. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2006; 34(8): 685-9.
 28. Penna C., Mancardi D., Rastaldo R., Losano G., Pagliaro P. Intermittent activation of bradykinin B₂ receptors and mitochondrial K_{ATP} channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc. Res.* 2007; 75(1): 168-77.
 29. Wang J., Gao Q., Shen J., Ye T.M., Xia Q. Kappa-opioid receptor mediates the cardioprotective effect of ischemic postconditioning. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2007; 36(1): 41-7.
 30. Cserepes B., Jancso G., Gasz B., Racz B., Ferenc A., Benko L. et al. Cardioprotective action of urocortin in early pre- and postconditioning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1095: 228-39.
 31. Sun H.Y., Wang N.P., Kerendi F., Halkos M., Kin H., Guyton R.A. et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 288(4): H1900-8.
 32. Wang H.C., Zhang H.F., Guo W.Y., Su H., Zhang K.R., Li Q.X. et al. Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation. *Apoptosis.* 2006; 11(8): 1453-60.
 33. Cai M., Li Y., Xu Y., Swartz H.M., Chen C.L., Chen Y.R. et al. Endothelial NOS activity and myocardial oxygen metabolism define the salvageable ischemic time window for ischemic postconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011; 300(3): H1069-77.
 34. Dow J., Kloner R.A. Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an *in vivo* regional ischemia rodent model. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2007; 12(2): 153-63.

35. Hale S.L., Mehra A., Leeka J., Kloner R.A. Postconditioning fails to improve no reflow or alter infarct size in an open-chest rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008; 294(1): H421-5.
36. Sato H., Bolli R., Rokosh G.D., Bi Q., Dai S., Shirk G. et al. The cardioprotection of the late phase of ischemic preconditioning is enhanced by postconditioning via a COX-2-mediated mechanism in conscious rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293(4): H2557-64.
37. Bodi V., Ruiz-Nodar J.M., Feliu E., Minana G., Nunez J., Husser O. et al. Effect of ischemic postconditioning on microvascular obstruction in reperfused myocardial infarction. Results of a randomized study in patients and of an experimental model in swine. *Int. J. Cardiol.* 2014; 175(1): 138-46.
38. Maslov L.N., Gorbunov A.S., Lishmanov Y.B. Cardioprotective effect of ischemic postconditioning on the model of isolated heart. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 153(3): 313-4.
39. Moriguchi A., Otani H., Yoshioka K., Shimazu T., Fujita M., Okazaki T. et al. Inhibition of contractile activity during postconditioning enhances cardioprotection by restoring sarcolemmal dystrophin through phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ. J.* 2010; 74(11): 2393-402.
40. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995; 146(1): 3-15.
41. Mocanu M.M., Baxter G.F., Yellon D.M. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 130(2): 197-200.
42. Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc. Res.* 2006; 70(2): 200-1.
43. Li Y., Ge X., Liu X. The cardioprotective effect of postconditioning is mediated by ARC through inhibiting mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis.* 2009; 14(2): 164-72.
44. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994; 84(5): 1415-20.
45. Dong S., Teng Z., Lu F.H., Zhao Y.J., Li H., Ren H. et al. Post-conditioning protects cardiomyocytes from apoptosis via PKCε-interacting with calcium-sensing receptors to inhibit endo(sarco)plasmic reticulum-mitochondria crosstalk. *Mol. Cell. Biochem.* 2010; 341(1-2): 195-206.
46. Liu X.H., Zhang Z.Y., Sun S., Wu X.D. Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress. *Shock.* 2008; 30(4): 422-7.
47. Zhu H.L., Wei X., Qu S.L., Zhang C., Zuo X.X., Feng Y.S. et al. Ischemic postconditioning protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by inducing MIP2. *Exp. Mol. Med.* 2011; 43(8): 437-45.
48. Fang J., Wu L., Chen L. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta Cardiol.* 2008; 63(3): 377-87.
49. Taki J., Higuchi T., Kawashima A., Fukuoka M., Kayano D., Tait J.F. et al. Effect of postconditioning on myocardial ^{99m}Tc-annexin-V uptake: comparison with ischemic preconditioning and caspase inhibitor treatment. *J. Nucl. Med.* 2007; 48(8): 1301-7.
50. Sun H., Guo T., Liu L., Yu Z., Xu W., Chen W. et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after acute myocardial infarction in pigs. *Heart Surg. Forum.* 2010; 13(5): E305-10.
51. Vincent A., Gahide G., Sportouch-Dukhan C., Covinhas A., Franck-Miclo A., Roubille F., Bagnire C. et al. Down-regulation of the transcription factor ZAC1 upon pre- and postconditioning protects against I/R injury in the mouse myocardium. *Cardiovasc. Res.* 2012; 94(2): 351-8.
52. Zhao W.S., Xu L., Wang L.F., Zhang L., Zhang Z.Y., Liu Y. et al. A 60-s postconditioning protocol by percutaneous coronary intervention inhibits myocardial apoptosis in patients with acute myocardial infarction. *Apoptosis.* 2009; 14(10): 1204-11.
53. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии. В кн.: Актуальные проблемы патофизиологии: избранные лекции. Под ред. Б.Б. Мороза. — М. Медицина, 13-56. 2001.
54. Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995; 267 (5203): 1449-56.
55. Musial K., Zwoliczka D. Matrix metalloproteinases and soluble Fas/FasL system as novel regulators of apoptosis in children and young adults on chronic dialysis. *Apoptosis.* 2011; 16 (7): 653-9.
56. Lin X.M., Zhang Z.Y., Wang L.F., Zhang L., Liu Y., Liu X.L. et al. Attenuation of tumor necrosis factor-α elevation and improved heart function by postconditioning for 60 seconds in patients with acute myocardial infarction. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2010; 123(14): 1833-9.
57. Ren Y., Cai Y., Jia D. Comparative antiapoptotic effects of kb-r7943 and ischemic postconditioning during myocardial ischemia reperfusion. *Cell. Biochem. Biophys.* 2012; 64(2): 137-45.
58. Takagi H., Matsui Y., Sadoshima J. The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart. *Antioxid. Redox. Signal.* 2007; 9(9): 1373-82.
59. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н. Ишемические и реперфузионные повреждения сердца: основные проявления и молекулярный механизм. *Бюлл. федер. центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова.* 2012; 5: 56-67. Naryzhnaya N.V., Maslov L.N. *Bull. Feder. Tsentra serdtsa, krovi i endokrinol. im. V.A. Almazova.* 2012; 5: 56-67.
60. Wei C., Li H., Han L., Zhang L., Yang X. Activation of autophagy in ischemic postconditioning contributes to cardioprotective effects against ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2013; 61(5): 416-22.

Сведения об авторах:

Нарыжная Наталья Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии

Горбунов Александр Сергеевич, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии

Семенцов Андрей Сергеевич, лаборант-исследователь лаб. экспериментальной кардиологии

Мухомедзянов Александр Валерьевич, лаборант-исследователь лаб. экспериментальной кардиологии

Саприна Т.В.¹, Прохоренко Т.С.¹, Новицкий В.В.¹, Ворожцова И.Н.¹, Рязанцева Н.В.²

Механизмы формирования аутоиммунных заболеваний поджелудочной и щитовидной желез

¹ — ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, г.Томск, ул. Московский тракт, д. 2

² — ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, г.Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

В обзоре представлены сведения о триггерных факторах развития аутоиммунных заболеваний поджелудочной и щитовидной желез, а также систематизирована информация об особенностях реализации клеточных и гуморальных иммунных реакций, определяющих клиническую гетерогенность аутоиммунных заболеваний одной локализации.

Ключевые слова: аутоиммунный сахарный диабет, латентный аутоиммунный диабет взрослых, аутоиммунный тиреодит, болезнь Грейвса, механизмы формирования заболевания

Для корреспонденции: Саприна Татьяна Владимировна, доктор мед. наук, доцент, доцент каф. эндокринологии и диабетологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, e-mail: tanja.v.saprina@mail.ru

Для цитирования: Саприна Т.В., Прохоренко Т.С., Новицкий В.В., Ворожцова И.Н., Рязанцева Н.В. Механизмы формирования аутоиммунных заболеваний поджелудочной и щитовидной желез. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; (2): 101—106.

Финансирование. Работа подготовлена в рамках реализации гранта Совета при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-4184.2014.7.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с проведенным исследованием и публикацией настоящей статьи.

Поступила 22.12.14

Saprina T.V.¹, Prokhorenko T.S.¹, Novitsky V.V.¹, Vorozhtsova I.N.¹, Ryazantseva N.V.²

Mechanism of formation of autoimmune diseases pancreatic and thyroid glands

¹ — Siberian State Medical University, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634055, Russia

² — Krasnoyarsk State Medical University named Professor Voyno-Yasenetsky, 1 ul. Partizana Zheleznyaka, Krasnoyarsk, 660022, Russia

The review provides information about triggering factors in the development of autoimmune diseases of the pancreas and thyroid glands, information about the specific cellular and humoral immune responses, defining the clinical heterogeneity of autoimmune diseases one location.

Keywords: autoimmune diabetes mellitus, latent autoimmune diabetes in adults, autoimmune thyroiditis, Graves' disease, mechanisms of disease

For correspondence: Tatiana V. Saprina, Doctor of Medical Sciences, assistant professor, Endocrinology and Diabetology Department Siberian State Medical University, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation, e-mail: tanja.v.saprina@mail.ru.

For citation: Saprina T.V., Prokhorenko T.S., Novitsky V.V., Vorozhtsova I.N., Ryazantseva N.V. Mechanism of formation of autoimmune diseases pancreatic and thyroid glands. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (2): 101—106. (in Russ).

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

Funding. This work was supported by Grants of the President of the Russian Federation SS-4184.2014.7.

Information about authors:

Novitsky V.V., <http://orcid.org/0000-0002-9577-8370>

Received 22.12.14

Введение

Проблема изучения аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий (хронический аутоиммунный тиреодит и болезнь Грейвса) относится к числу наиболее актуальных в современной эндокринологии, что во многом объясняется достаточно высокой степенью заболеваемости населения. На мировом уровне активно обсуждаются вопросы поиска новых высокоинформативных предикторов риска развития этих заболеваний, профилактических терапевтических стратегий. Прогрессу в данной области способствует непрерывная консолидация результатов научных исследований, посвященных механизмам формирования аутоиммунного повреждения эндокринных желез, позволяющая открывать новые грани дисрегуляции в системе иммунитета.

Теории о триггерных факторах

В процессе изучения возможных причин возникновения аутоиммунных эндокринопатий был сформирован ряд концепций. Одной из них является теория молекулярной мимикрии [1—3], согласно которой, пептиды бактериального или вирусного происхождения имеют структурное сходство с аутоантигенами, а специфические клоны иммунокомпетентных клеток реагируют как на чужеродный, так и на аутоантиген. Приводятся данные, что существенный вклад в индукцию аутоиммунных тиреопатий вносят вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус [4], вирус гепатита С, парвовирус В19, вирус Коксаки и вирус герпеса [5]. Предполагается существование мимикрии между бактериальными антигенами *Yersinia Enterocolitica* и антигеном мембраны тиреоцита, включающего рецептор тиреотропного гормона [6]. Установлено, что у ряда вирусов, в частности Коксаки, цитомегаловирусов, часть белковой молекулы состоит из последовательности аминокислот, такой же, как и в β -клетках островков Лангерганса. В результате сенсibilизированные к вирусам Т-лимфоциты реагируют на собственный белок β -клеток как на вирус, разрушая инсулин-продуцирующие клетки поджелудочной железы [7].

В отдельную группу триггерных механизмов развития эндокринопатий аутоиммунного генеза можно выделить факторы окружающей среды неинфекционной природы. Так, например, аутоиммунный тиреодит вызывали у крыс воздействием гамма-облучения в сублетальных дозах [8]. Предполагается, что данный эффект связан с модификацией собственных антигенов при действии ионизирующего излучения, в результате чего аутоантигены распознаются иммунной системой как чужеродные [7, 8].

Подобное развитие аутоиммунных заболеваний при действии неблагоприятных факторов внешней среды во многом обусловлено генетической предрасположенностью. Для аутоиммунного сахарного диабета и аутоиммунных тиреопатий выявлена связь с наследованием определенных генов главного комплекса гистосовместимости (HLA) [9—13]. Особенно детально исследуется связь различных аллелей HLA с развитием аутоиммунного сахарного диабета. Констатируется, что у лиц, предрасположенных к развитию аутоиммунного сахарного диабета, выявлена нестабильность молекулы HLA и сниженная способность к связыванию Т-клеточного рецептора (TCR) и антигена [14, 15]. Предполагается, что подобный дефект ведет к уменьшению сродства комплекса TCR/антиген/HLA и быстрой диссоциации пептидов в процессе негативной селекции в тимусе и ускользанию аутореактивных Т-лимфоцитов на периферию. С учетом накопленных данных, полученных на примере изучения патогенеза аутоиммунного сахарного диабета, была сформулирована теория о роли взаимодействия генов, способствующих или препятствующих развитию аутоиммунного заболевания.

Иммунологические аспекты формирования аутоиммунного сахарного диабета

В механизмах формирования (а также прогрессирования) аутоиммунного сахарного диабета (СД) важная роль принадлежит аутореактивным Т-лимфоцитам и регуляторным Т-клеткам.

В качестве основных антигенов, приводящих к активации Т-клеток с последующим формированием клеточного инфильтрата поджелудочной железы, рассматриваются декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAD), тирозинфосфатоподобный пептид, инсулин и поверхностный антиген β -клеток островков Лангерганса [16]. При аутореактивном инсулите поджелудочную железу в большом количестве инфильтрируют CD4-лимфоциты Th1- и Th2-типа и цитотоксические CD8-лимфоциты [17], приводя к клеточно-опосредованной аутоиммунной деструкции β -клеток поджелудочной железы. Кроме того, лимфоциты выделяют широкий спектр цитокинов, выполняющих функции медиаторов межклеточной коммуникации, привлекающих в поджелудочную железу различные иммунокомпетентные клетки, индуцируя механизмы деструкции инсулинпродуцирующей паренхимы [18—20].

Особая роль в патогенезе аутоиммунного диабета принадлежит регуляторным Т-лимфоцитам (T-reg), способным подавлять аутоиммунный ответ [21]. В Т-регуляторных клетках экспрессируется транскрипционный фактор FOXP3, биологическая функ-

ция которого заключается в блокировании транскрипционных факторов NFAT и NF- κ B, и, как следствие, депрессии продукции цитокинов (IL-2, -4, IFN γ), а также снижению функциональной активности аутореактивных клеток [22, 23]. У пациентов с аутоиммунным диабетом рядом исследований установлено значительное снижение супрессорной функции T-reg, по сравнению с T-reg-клетками здоровых доноров, в то время как их количество в крови остается либо нормальным [24], либо снижается [25].

Дополнительный вклад в дисбаланс между эффекторными и регуляторными свойствами T-лимфоцитов вносят такие антигенпредставляющие клетки, как моноциты, макрофаги и, особенно, дендритные клетки [26]. При попадании в очаг воспаления незрелые дендритные клетки взаимодействуют с антигенами, под воздействием провоспалительных сигналов созревают и обретают способность стимулировать пролиферацию антигенспецифичных T-reg-клеток [27], поддерживая тем самым иммунологическую толерантность. При аутоиммунном диабете в эксперименте на линии NOD-мышей выявлено затруднение созревания дендритных клеток и снижение способности к стимуляции ими T-лимфоцитов [28—30].

Следует подчеркнуть, что T-клеточная популяция лимфоцитов не является единственной, определяющей развитие аутоиммунного сахарного диабета. Это подтверждает исследование, в котором ингибитор T-клеток (циклоспорин) не предотвращал развитие сахарного диабета, а лишь задерживал его [31]. Большой вклад в развитие заболевания вносят B-лимфоциты, роль которых в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета состоит в наработке органоспецифических антител, опосредующих комлемент- и антителозависимый механизм цитотоксичности, а также способности влиять на локальные T-клеточные реакции в поджелудочной железе [32—35].

Рассматривая аутоиммунный сахарный диабет, можно выделить классический сахарный диабет 1 типа (СД1) и латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA). Данные заболевания имеют ряд общих генетических и иммунологических черт, однако, между СД1 типа и LADA существует важная отличительная особенность — скорость развития недостаточности инсулина, которая при LADA наступает значительно позже, чем при СД1 [26, 36]. Проведенные исследования указывают на наличие различий в реактивности иммунных клеток при LADA и СД1 [37-39], что подразумевает существование разных механизмов формирования и прогрессирования этих форм диабета. Существуют указания на то, что при СД1 иммунный ответ поддерживается Th1- и Th17-клонами лимфоцитов [40, 41]. В свою очередь, LADA (диабет, протекающий с преобладанием тит-

ров GAD-антител [42-44]) связан с пролиферацией Th2-клонов лимфоцитов [45]. При этом существовавшая гипотеза о строгой поляризации иммунного ответа по Th1-типу иммунного ответа при СД1 и Th2-типу при LADA существенно изменилась. В качестве причин различий между СД1 и LADA в скорости развития инсулиновой недостаточности все больше рассматриваются дефекты реализации рецепторного (в частности Fas- и TNF-зависимого) пути апоптоза аутореактивных клонов лимфоцитов, а также разная степень выраженности дисрегуляции системы цитокинов [39, 46, 47].

Иммунологические аспекты формирования аутоиммунных тиреопатий

Подобно аутоиммунному СД, при аутоиммунных тиреопатиях, несмотря на наличие общего аутореактивного компонента, существуют определенные различия в механизмах развития каждой нозологии, что в первую очередь отражается на функции эндокринной железы.

При хроническом аутоиммунном тиреоидите (АИТ) в регуляцию клеточно-опосредованного иммунного ответа вовлечены CD8-лимфоциты и Th-клоны лимфоцитов, выделяющие цитокины различного спектра действия. В патогенезе АИТ преобладающим считают Th1-иммунный ответ, но при этом реализуют свое действие Th2- и Th3-клоны лимфоцитов. Th1-клетки посредством локальной продукции цитокинов могут ослабить функцию щитовидной железы через изменение синтеза гормонов и снижение числа тиреоцитов путем активации их гибели. Th2-клоны лимфоцитов, очевидно, участвуют в контроле производства антител, подавлении иммунного ответа, а синтезируемые цитокины Th2-профиля способны блокировать тиреоспецифический эффект цитокинов Th1-профиля [3, 48, 49].

Активация гуморального звена иммунитета в присутствии аутоантигенов сопровождается синтезом аутоантител к структурам фолликулярного эпителия. Считается, что наиболее выраженное цитотоксическое действие на тиреоциты оказывают антитела к тиреоидной пероксидазе и тиреоглобулину [50]. Помимо действия комлементфиксирующих цитотоксических аутоантител, гибель тиреоцитов связана с активацией программы апоптоза. Наиболее изучен путь активации апоптотической программы, в которой задействован Fas-рецептор (CD95), экспрессирующийся на мембране тиреоцитов [50—52]. Исследователи отмечают, что в щитовидной железе у больных АИТ количество тиреоцитов, экспрессирующих CD95 и претерпевающих апоптоз, повышено. Наибольшее число апоптотических тиреоцитов находится

вблизи от лимфоцитарного инфильтрата. Данный факт согласуется с информацией о том, что при АИТ инфильтрирующие железу лимфоциты характеризуются повышенной экспрессией FasL. Кроме того, для морфологической картины ткани щитовидной железы при АИТ характерно большое скопление плазматических вокруг CD95-позитивных тиреоцитов [51, 53, 54].

В отличие от АИТ, протекающего с деструкцией тиреоцитов, для болезни Грейвса (БГ) характерна их пролиферация, а также развитие синдрома тиреотоксикоза (вызванного действием стимулирующих антител к рецептору тиреотропного гормона).

В щитовидной железе у пациентов с БГ лимфоидная инфильтрация выражена в меньшей степени, чем при АИТ. При этом выявлена корреляция между степенью лимфоидной инфильтрации щитовидной железы и экспрессией маркера пролиферации Ki-67 на тиреоцитах: чем больше выражена очаговая лимфоидная инфильтрация, тем интенсивнее оказываются рост и пролиферация тиреоцитов [50, 55, 56].

Предполагается, что, помимо активации пролиферации, увеличение количества тиреоцитов при БГ связано с замедлением их гибели. Показано, что титр антител к тиреоидной пероксидазе при БГ намного ниже, чем при АИТ, что можно трактовать как минимизацию эффектов антителозависимой комплемент-опосредованной цитотоксичности [50, 57]. Изучение механизмов апоптотической гибели тиреоцитов указывает на ограничение презентации на мембране данных клеток Fas-рецептора [51], что может защищать тиреоциты от воздействия FasL-экспрессирующих лимфоцитов. Представлены также данные об отсутствии выраженной экспрессии рецептора к TNF α клетками фолликулов эпителия щитовидной железы, что свидетельствует об их низкой готовности к TNF-зависимому апоптозу [58].

Большинство внутритиреоидных лимфоцитов при БГ — это Т-лимфоциты. В-клеточные скопления встречаются гораздо реже, чем при АИТ. В отличие от АИТ, среди клеток лимфоидного инфильтрата при БГ преобладают лимфоциты Th2-типа, которые секретируют цитокины, стимулирующие продукцию антител В-лимфоцитами [56]. В то же время показана вовлеченность Th1- и Th3-клонов лимфоцитов в формирование интратиреоидного цитокинового окружения при БГ [48, 59].

При анализе данных о состоянии субпопуляционного состава лимфоцитов в крови при БГ особый интерес представляет информация о функциональном [60] и количественном [61] дефекте натуральных киллеров (NK-клеток). Данные факты согласуются с представлениями о роли вирусных инфекций в развитии тиреопатий. Недостаточность одного из компо-

нентов врожденного иммунного ответа (NK-клеток) угнетает реакции цитотоксичности по отношению к внутриклеточным патогенам, что создает благоприятные условия для возникновения интратиреоидного воспаления под влиянием триггерных инфекций.

С учетом накопленных данных о популяциях Th-лимфоцитов в крови и инфильтрате щитовидной железы, секреции цитокинов при АИТ и БГ формируется мнение о том, что при аутоиммунных тиреопатиях (как и при аутоиммунном СД) отсутствует выраженный пролиферативный сдвиг в сторону Th1- или Th2-типа клеток. При этом течение интратиреоидного воспаления (и, как следствие, особенность клинических проявлений) определяется комбинацией факторов, связанных с выраженностью пролиферативных клеточных реакций и реакций клеточной гибели.

Заключение

Аутоиммунный процесс представляет достаточно сложную проблему в клинике эндокринных заболеваний, требуя адекватных диагностических подходов и расшифровки молекулярных механизмов индукции и прогрессирования процесса. В последние десятилетия успешно реализованы программы по улучшению диагностики в эндокринологии, освещаются отдельные механизмы формирования осложнений при различных эндокринных заболеваниях, однако понимания молекулярных механизмов индукции заболевания и хронизации аутоиммунного процесса до сих пор нет.

В настоящее время в литературе накоплен значительный фактический материал, в котором раскрывается непосредственное участие иммунной системы в патогенезе аутоиммунных тиреопатий и сахарного диабета, и теоретические знания в данной области непрерывно дополняются новыми фактами. Это позволяет надеяться на появление методов иммунотерапии и иммунопрофилактики, направленных на коррекцию (компенсацию) непосредственных причин развития аутоиммунной патологии эндокринных желез.

References

1. Davies J.M. . Molecular mimicry: can epitope mimicry induce autoimmune disease? *Immunol. Cell. Biol.* 1997; 75(2): 113-26.
2. Roep B.O., Hiemstra H.S., Schloot N.C., De Vries R.R., Chaudhuri A., Behan P.O. et al. Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackievirus. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2002; 958: 163-5.
3. Weetman A.P. Cellular immune responses in autoimmune thyroid. *Clin. Endocrinol.* 2004; 61: 405-13.
4. Kravets E.B., Urazova O.I., Nedosekova Ju.V., Rogaleva A.V. About apoptosis of lymphocytes in autoimmune

- thyropathies. *Problemy jendokrinologii*. 2010; 3: 16-20. (in Russian)
5. Mori K., Yoshida K. Viral infection in induction of Hashimoto's thyroiditis: a key player or just a bystander? *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2010; 5: 418-24.
 6. Wilkin T.J. The primary lesion theory of autoimmunity: a speculative hypothesis. *Autoimmunity*. 1990; 7(4): 225-35.
 7. Sarvilina I.V., Karpishhenko V.N., Gorshkova Ju.V. *Interdisciplinary research in medicine. [Mezhdisciplinarnye issledovaniya v medicine]. Moscow: Tehnosfera; 2007. 368 p.* (in Russian)
 8. Seddon B., Mason D. Peripheral autoantigen induced regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J. Exp. Med.* 1999; 189(5): 877-82.
 9. Nerup J., Christy M., Kromann H., Platz P., Ryder L.P., Thomsen M. et al. HLA and insulin-dependent diabetes mellitus. *Postgrad Med. J.* 1979; 55(2): 8-13.
 10. Eisenbarth G.S., Atkinson M.A. Type 1 diabetes: news perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001; 358: 221-9.
 11. Atkinson M.A. Thirty years of investigating the autoimmune basis for the type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54: 1253-63.
 12. Tommer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid*. 2010; 20(7): 715-25.
 13. Jang H.W., Shin H.W., Cho H.J., Kim H.K., Lee J.I., Kim S.W. et al. Identification of HLA-DRB1 alleles associated with Graves' disease in Koreans by sequence-based typing. *Immunol. Invest.* 2011; 40(2): 172-82.
 14. Atkinson M.A., Leiter E.H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat. Med.* 1999; 5: 601-4.
 15. Corper A.L., Stratmann T., Apostolopoulos V., Scott C.A., Garcia K.C., Kang A.S. et al. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes. *Science*. 2000; 288(5465): 505-11.
 16. Pugliese A. Pathogenesis of type 1 diabetes: genetics. *Int. Diabetes*. 2010; 22: 101-11.
 17. Dogan Y., Akarsu S., Ustundag B., Yilmaz E., Gurgoze M.K. Serum IL-1beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators Inflamm.* 2006; 1: 59206-10.
 18. Rabinovitch A. Immunoregulation by cytokines in autoimmune diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 520: 159-93.
 19. Chang Y., Piao S.L., Gao S., Zheng D.M. Regulatory effects of micronutrient complex on the expression of Th1 and Th2 cytokines in diabetic C57BL mice. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2005; 34(1): 64-6.
 20. Kravets E.B., Saprina T.V., Lazarenko F.Je., Prokhorenko T.S., Ryazanceva N.V. The role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes, immuno-intervention questions. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2010; 1: 76-83. (in Russian)
 21. Cools N., Ponsaerts P., Van Tendeloo V.F., Zwi N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Clin. Dev. Immunol.* 2007; 34: 543-57.
 22. Bettelli E., Carrieri J., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M. et al. Reciprocal developmental pathways for the generations of pathogenic effector Th17 and regulatory T-cells. *Nature*. 2006; 441: 235-8.
 23. Rudensky A.Y., Gavin M., Zheng Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. *Cell*. 2006; 126(2): 253-6.
 24. Lindley S., Dayan C.M., Bishop A., Roep B.O., Peakman M., Tree T.I. Defective suppressor function in T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54(1): 92-9.
 25. Lawson J.M., Tremble J., Dayan H., Beyan H., Leslie R.D., Peakman M. et al. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory t cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 154(3): 353-9.
 26. Korf H., Gysemans C., Overbergh L. Pathogenesis of type 1 diabetes: immunological pathways. *Int. Diabetes*. 2010; 22: 121-7.
 27. W.K., A., H.A. Animal models of endocrine/organ-specific autoimmune diseases: do they really help us to understand human autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol.* 2002; 24(3): 297-321.
 28. Tandon N., Metcalfe R.A., Barnett D. Expression of the costimulatory molecule B7/BB1 in autoimmune thyroid disease. *Q. J. Med.* 1994; 87: 231-6.
 29. Many M.C., Maniratunga S., Varis I. Two-step development of Hashimoto-Like thyroiditis in genetically autoimmune non-obese diabetic mice: effects of iodine-induced cell necrosis. *J. Endocrinol.* 1995; 147: 311-20.
 30. Salmaso C., Olive D., Pesce G. Costimulatory molecules and autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity*. 2002; 35: 159-67.
 31. Carel J.C., Boitard C., Eisenbarth G. Cyclosporine delays but does not prevent clinical onset in glucose intolerant pre-type 1 diabetic children. *J. Autoimmun.* 1996; 9(6): 739-45.
 32. Kolesnik Ju.M., Orlovskij M.A. Pancreatic islets: some aspects of morphology, physiology and destruction processes in diabetes mellitus type 1. *Problemy endokrinologii*. 2004; 2: 3-10. (in Russian)
 33. Wong F.S., Hu C., Xiang Y., Wen L. To B or not to B-pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.* 2010; 22(6): 723-31.
 34. Chamberlain J.L., Attridge K., Wang C.J., Ryan G.A., Walker L.S. B cell depletion in autoimmune diabetes: insights from murine models. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 2011; 15(6): 703-14.
 35. Salinas G.F., Braza F., Brouard S., Tak P.P., Baeten D. The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clin. Immunol.* 2013; 146(1): 34-45.
 36. Tuomi T., Andersen M., Lundgren V. LADA: is it distinct from type 1 diabetes? *Int. Diabetes*. 2010; 22: 128-31.
 37. Naik R.G., Brooks-Worrell B.M., Palmer J.P. Latent autoimmune diabetes in adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94: 4635-44.
 38. Saprina T.V., Lazarenko F.Je., Prokhorenko T.S., Ryazanceva N.V., Vorozhcova I.N. The role of Th1/Th2 immune response imbalance determination in clinical features of autoimmune diabetes. *Saharnyj diabet*. 2011; 2: 12-7. (in Russian)
 39. Prokhorenko T.S., Saprina T.V., Lazarenko F.Je., Ryazanceva N.V., Novitsky V.V., Vorozhcova I.N. System tumor necrosis factor α in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2011; 1: 64-9. (in Russian)
 40. Dardalhon V., Korn T., Kuchroo V.K., Anderson A.C. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J. Autoimmun.* 2008; 31(3): 252-6.
 41. Saprina T.V., Lazarenko F.Je., Prokhorenko T.S., Ryazantseva N.V., Vorozhcova I.N. Features of cytokine

production by Th1/Th2-profile in patients with different clinical variants autoimmune diabetes. *Citokiny i vospalenie*. 2012; 2: 51-7. (in Russian)

42. Amrouche C., Jamoussi Kamoun H., Trabelsi N., Blouza Chabchoub S. Latent autoimmune diabetes in Tunisian adults (LADA): identification of autoimmune markers *Tunis. Med.* 2008;86(4): 316-8.

43. Andersen M.K., Lundgren V., Turunen J.A., Forsblom C., Isomaa B., Groop P.H. et al. Latent autoimmune diabetes in adults differs genetically from classical type 1 diabetes diagnosed after the age of 35 years. *Diabetes Care*. 2010; 33(9): 2062-4.

44. Maruyama T., Nakagawa T., Kasuga A., Murata M. Heterogeneity among patients with latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011; 27: 971-4.

45. Zhang Y., Zhou Z.G., Yang L., Lin J., Li X., He W.M. Abnormal T cell autoimmunity against GAD65 in LADA patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2010; 90(28): 1963-5.

46. Kim K.A., Lee M.S. *Front Biosci*. 2009; 14: 657-64.

47. Saprina T.V., Prokhorenko T.S., Lazarenko F.Je., Zima A.P., Vasil'eva O.A., Ryazantseva N.V. et al. The role of Fas and Fas-L systems in mechanisms of development latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Byulleten' SO RAMN*. 2012; 4: 59-65. (in Russian)

48. Glazanova T.V., Bubnova L.N., Trunin E.M., Kuzmichev A.S., Pavlova I.E., Rozanova O.E. Production of some cytokines in patients with autoimmune thyroid disease. *Problemy endokrinologii*. 2004; 3: 29-32. (in Russian)

49. Poncin S., Lengele B., Colin I.M., Gerard A.C. Differential interactions between Th1/Th2, Th1/Th3, and Th2/Th3 cytokines in the regulation of thyroperoxidase and dual oxidase expression, and of thyroglobulin secretion in thyrocytes in vitro. *Endocrinol*. 2008; 149(4): 1534-42.

50. Kandror V.I., Krajnova S.I., Krjukova I.V., Mkrtumova N.A. About the mechanisms of cell proliferation and death thyrocytes in autoimmune diseases of the thyroid gland. *Vestnik RAMN*. 2006; 9-10: 56-60. (in Russian)

51. Krajnova S.I., Krjukova I.V., Mkrtumova N.A., Kushlinskij N.E., Antonova S.S., Jushkov P.V. et al. Complement dependent cytotoxicity antithyroid sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Problemy endokrinologii*. 2004; 5: 7-11. (in Russian)

52. Stojanovic J., Srefanovic D., Vulovic D., Puskas L., Markovic L. Role of apoptosis in pathogenesis of thyroiditis. *Med. Pregl*. 2009; 62(1-2): 49-52.

53. Bretz J.D., Baker J.R. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction? *Clin. Endocrinol*. 2001; 55(1): 1-11.

54. Gevorkjan A.G., Cogoev A.S., Bolieva L.Z. Comparative characteristics of the immune status of patients with diffuse toxic goiter and autoimmune thyroiditis. *Vestnik novykh meditsinskikh tehnologiy*. 2007; 3: 155-6. (in Russian)

55. Arao T., Morimoto I., Karinuma A., Ishida O., Zeki K., Tanaka Y. et al. Thyrocyte proliferation by cellular adhesion to infiltrating lymphocytes through the intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen-1 pathway in Graves disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2000; 85(1): 382-9.

56. Kandror V.I. Mechanisms of development of Graves' disease and thyroid hormone action. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2008; 1: 26-34. (in Russian)

57. Isaeva M.A., Bogatyreva Z.I., Suchkova E.N., Cagurija K.G., Anciferov M.B., Pal'cev M.A. et al. Antibodies of different levels of specificity and functionality in the pathogenesis and diagnosis of autoimmune thyroid disease. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2007; 4: 27-34. (in Russian)

58. Saprina T.V., Prokhorenko T.S., Martynova S.Ju., Dzjuman A.N., Zima A.P., Popov O.S. et al. System imbalance «ligand-receptor» tumor necrosis factor α and TNF-RI expression in the thyroid gland in patients with Graves' disease tissue. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2013; 3: 56-65. (in Russian)

59. Gianoukakis A.G., Khadavi N., Smith T.J. Cytokines, Graves' Disease, and Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Thyroid*. 2008; 18(9): 953-8.

60. Solerte S.B. Defect of a subpopulation of natural killer immune cells in Graves disease and Hashimotos thyroiditis: normalizing effect of dehydroepiandrosterone sulfate. *Eur. J. Endocrinol*. 2005; 152: 703-12.

61. Saprina T.V. Features of production and reception of interleukin-2 and of interleukin-4 in autoimmune thyropathies. *Meditsinskaya immunologiya*. 2012; 4-5: 365-72. (in Russian)

Сведения об авторах:

Прохоренко Татьяна Сергеевна, канд. мед. наук, ассистент каф. биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, e-mail: mmikld.ssmu@gmail.com

Новицкий Вячеслав Викторович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Ворожцова Ирина Николаевна, доктор мед. наук, проф., зав. кафедрой эндокринологии и диабетологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Рязанцева Наталья Владимировна, доктор мед. наук, проф., каф. биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО КрасГМУ Минздрава России

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.13.002.2-004.6

Мельниченко А.А.¹, Мясоедова В.А.¹, Елизова Н.В.¹,
Никитина Н.А.², Карагодин В.П.¹, Собенин И.А.¹, Орехов А.Н.¹

Оценка содержания циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины» ФМБА России, 119435, Москва, ул. Б. Пироговская, д. 1а

Цель исследования. Циркулирующие множественно модифицированные ЛНП (цмЛНП) и антитела к ним являются атерогенными компонентами сыворотки больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Цель исследования — разработка метода для определения содержания циркулирующих множественно модифицированных ЛНП в сыворотке крови. **Результаты.** Метод основан на связывании цмЛНП с помощью иммобилизованного на пластике агглютинина рицина, с последующим измерением связавшегося апоВ конъюгированными с пероксидазой поликлональными антителами. Предложенный метод обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью. **Заключение.** Разработанный метод позволяет определять уровень множественно модифицированных ЛНП в сыворотке крови без предварительного выделения фракции липопротеидов.

Ключевые слова: десалирированные липопротеиды; иммуноферментный анализ; диагностика атеросклероза

Для корреспонденции: Александра Александровна Мельниченко, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: inat-science@yandex.ru

Для цитирования: Мельниченко А.А., Мясоедова В.А., Елизова Н.В., Никитина Н.А., Карагодин В.П., Собенин И.А., Орехов А.Н. Оценка содержания циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; (2): 107–111.

Благодарности. Работа проведена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.616.21.0031 о предоставлении субсидии на расходы для выполнения научных исследований).

Поступила 11.10.14

Melnichenko A.A.¹, Myasoedova V.A.¹, Elizova N.V.¹, Nikitina N.A.², Sobenin I.A.¹, Orekhov A.N.¹

Method for measurement of circulating multiply modified low-density lipoprotein in the blood serum

¹ — FGBNU Institute of General Pathology and Pathophysiology, Laboratory of angiopathology, 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

² — FGBU FNKTS Physico-Chemical Medicine FMBA of Russia, Laboratory of Molecular Immunology and biochemistry 119435 B. Pirogovskaya str., 1a.

The purpose of research was development of method for the measurement of naturally occurring multiply modified LDL (nomLDL) in serum. nomLDL are atherogenic components of patients with cardiovascular diseases serum. **Results.** We have developed a lectin-sorbent assay for the determination of desialylated LDL in serum. The assay is based on the binding of desialylated LDL by immobilized *Ricinus communis* agglutinin with subsequent measurement of lipoprotein through use of anti-apolipoprotein (apo) B antibody. **Conclusion.** Developed method for measurement of circulating multiply modified low-density lipoprotein in the blood serum characterized with high accuracy and reproducibility and may help establish the diagnostic value of this lipoprotein as a risk factor of atherosclerosis.

Key words: desialylated LDL, lectin-sorbent assay, atherosclerosis diagnostics

For correspondence: Alexandra A. Melnichenko (Ph.D., Senior Researcher, Laboratory angiopathology department of molecular and cellular pathophysiology of the Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology), e-mail: inat-science@yandex.ru

For citation: Melnichenko A.A., Myasoedova V.A., Elizova N.V., Nikitina N.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Method for measurement of circulating multiply modified low-density lipoprotein in the blood serum. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2016; 60 (2): 107–111. (in Russ.).

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

Funding. The work carried out with the financial support of the Russian Federation represented by the Ministry of Education of Russia (Project# 14.616.21.0031).

Information about authors:

Melnichenko A.A. <http://orcid.org/0000-0002-4989-7600>

Myasoedova V.A. <http://orcid.org/0000-0001-8414-5300>

Elizova N.V. <http://orcid.org/0000-0002-9646-8091>

Nikitina N.A. <http://orcid.org/0000-0003-4246-9950>

Sobenin I.A. <http://orcid.org/0000-0003-0978-6444>

Orekhov A.N. <http://orcid.org/0000-0002-6495-1628>

Received 11.10.14

Введение

Ранее было показано, что сыворотка больных с коронарным атеросклерозом вызывает накопление липидов в клетках, полученных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, т.е. атерогенны [1]. Циркулирующие множественно модифицированные ЛНП (цмЛНП) и антитела к ним также являются атерогенными компонентами сыворотки больных сердечно-сосудистыми заболеваниями [2]. Было показано, что биохимический состав, физические характеристики, а также взаимодействие с клеточными рецепторами данных липопротеидов кардинально отличается от нативных ЛНП. Основное различие заключается в низком содержании сиаловой кислоты, терминальном сахаре биантенной цепи апополипротеина (апо) В [3, 4]. Учитывая, что после удаления сиаловой кислоты, терминальным сахаром становится галактоза, был разработан способ выделения модифицированных ЛНП на сорбенте с иммобилизованным агглютинином *Ricinus communis* (РКА120). Данный агглютинин имеет высокое сродство к терминальной бета-галактозе и низкое сродство к другим сахарным остаткам, входящим в состав полисахаридных цепей ЛНП [5]. Таким образом, цмЛНП связывались на колонке с пришитым РКА120 и элюировались 50 мМ раствором галактозы [6].

Цель исследования — разработка метода для определения содержания циркулирующих множественно модифицированных (цмЛНП) в сыворотке крови.

Методика

Метод основан на связывании цмЛНП с помощью иммобилизованного на пластике РКА120, с последующим измерением связавшегося апоВ конъюгированными с пероксидазой поликлональными антителами. Изучены образцы крови 22 мужчин в возрасте от 28 до 56 лет. Содержание общего холестерина и триглицеридов в сыворотке не превышало 5,2 и

1,7 ммоль/л соответственно. Кровь для исследований забирали натощак в пробирку с ЭДТА, полученную сыворотку стерилизовали пропусканием через фильтр с размером пор 45 нм. ЛНП и цмЛНП были выделены и охарактеризованы, как описано в [6].

Для определения содержания десиалированных ЛНП в сыворотке использовали 96-луночные плашки. В лунки вносили по 100 мкл раствора РСА₁₂₀ в изотоническом фосфатном буфере в концентрации 30 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем лунки промывали 4 раза ИФБ, содержащем 2 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА) (ИФБ/БСА), после чего в лунки вносили по 100 мкл раствора БСА в ИФБ в концентрации 20 г/л и оставляли при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем лунки снова промывали раствором ИФБ/БСА вносили в них 100 мкл исследуемого образца в ИФБ и инкубировали в течение 2 ч при 20°C. Потом лунки снова промывали раствором ИФБ/БСА и вносили по 100 мкл меченых пероксидазой поликлональных антител (1 мкг/мл) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Последующее проявление проводили добавлением цитратного буфера, рН 4,5, содержащего ортофенилендиамин и перекись водорода. Инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на многоканальном спектрофотометре.

Результаты и обсуждение

Для определения оптимальной концентрации РКА120, необходимой для связывания цмЛНП, был проведен ряд экспериментов. Из данных, представленных на рис. 1, видно, что количество десиалированных ЛНП, связывающихся с РКА120 остается постоянным при концентрации агглютинина 30—50 мг/л. Таким образом, в дальнейшем РКА120 использовали в концентрации 30 мг/л.

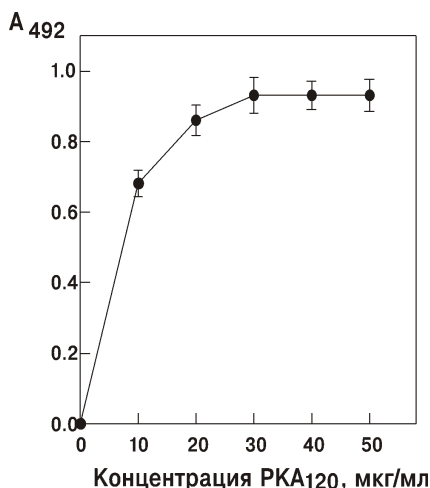


Рис. 1. Концентрационная зависимость для покрывающего раствора.

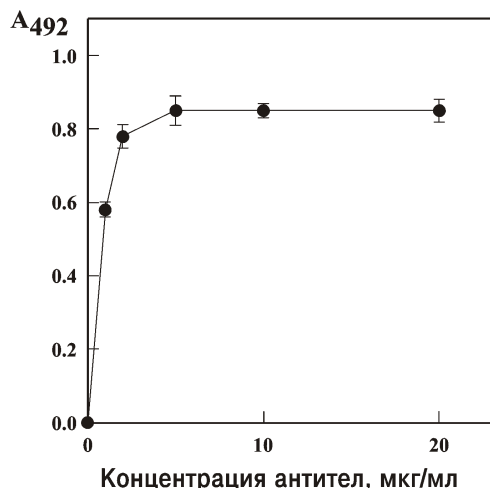


Рис. 2. Определение оптимальной концентрации анти-апоВ поликлональных антител.

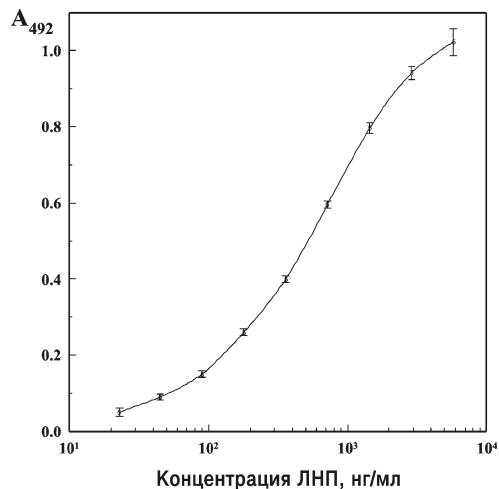


Рис. 3. Калибровочная кривая для ЛНП, обработанные нейраминидазой.

Для определения оптимальной концентрации анти-апо-В поликлональных антител были исследованы 5 разведений последних. На рис. 2 видно, что в диапазоне концентраций 5—20 мкг/л количество определяющегося апоВ остается неизменным, поэтому в качестве оптимальной была выбрана концентрация поликлональных антител к апоВ100 в 10 мкг/л.

На рис. 3 представлена типичная кривая титрования обработанных нейраминидазой десалирированных ЛНП при использовании оптимальных концентраций лектина (30 мкг/л) и антител к апоВ (10 мкг/л).

Калибровочные кривые обработанных нейраминидазой ЛНП, выделенных из крови больных цмЛНП , и нативных ЛНП представлены на рис. 4. Видно, что кривые обработанных нейраминидазой ЛНП и цмЛНП практически совпадают. Также видно, что данный метод может использоваться при определении концентрации десалирированных ЛНП в сыворотке крови в диапазоне 20—800 г/л. При этом сиалирированные (нативные) ЛНП, выделенные с помощью лектиновой хроматографии, не связываются с РКА120 вплоть до концентрации 1000 г/л.

Для определения специфичности РКА120 при определении содержания десалирированных ЛНП, образцы ЛНП были обработаны галактозидазой для удаления углеводных остатков, как описано у Nagai с соавт. [7] Данная методика позволяет удалить более 95% галактозы, содержащейся в ЛНП. Обработанные галактозидазой десалирированные ЛНП не связывались с лектиновой подложкой, в отличие от необработанных ЛНП.

На рис. 5 представлено сравнение кривых титрации сыворотки и ЛНП, выделенных из крови больных ССЗ и здоровых лиц. Видно, что данные кривые практически совпадают при определении содержания десалирированных ЛНП как в сыворотке, так и в липопротеидах, выделенных из крови. Таким образом, можно сделать вывод о том, что компоненты сыворотки практически не влияют на точность определения содержания десалирированных ЛНП в ней в диапазоне концентраций 20—200 мкг/л. При сравнении содержания цмЛНП в сыворотке крови от 12 пациентов и в общей фракции ЛНП, выделенной из крови тех же пациентов, коэффициент корреляции составил 0,9 (рис. 6).

На рис. 7 представлены данные определения уровня десалирированных ЛНП в сыворотке методами ИФА и лектиновой хроматографии. Видно, что данные, полученные этими методами практически совпадают (коэффициент корреляции 0,96, $p < 0,005$). Чувствительность метода составляет 5 нг цмЛНП на мл пробы.

Измерение уровня цмЛНП в крови 30 здоровых доноров показало, что их содержание варьирует от 12 до 105 мкг/мл (1,4—19,7% от общего уровня апоВ в сыворотке). Средняя концентрация составила

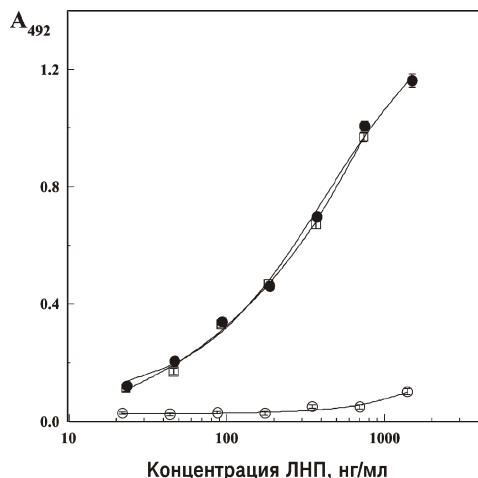


Рис. 4. Калибровочные кривые для нативных ЛНП (О), цмЛНП (●) и ЛНП, обработанные нейраминидазой (□).

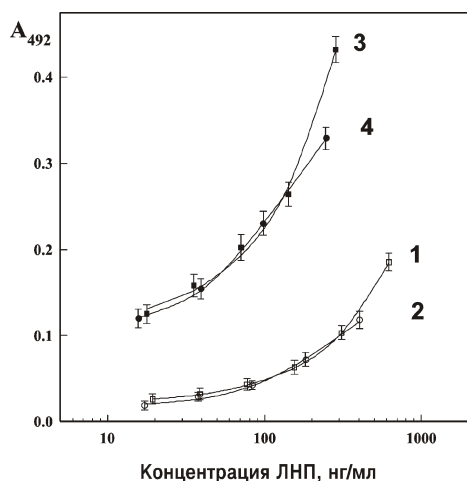


Рис. 5. Определение уровня цмЛНП у здоровых лиц (1, 2) и больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (3, 4) в цельной сыворотке (1, 4) и в ЛНП (2, 3).

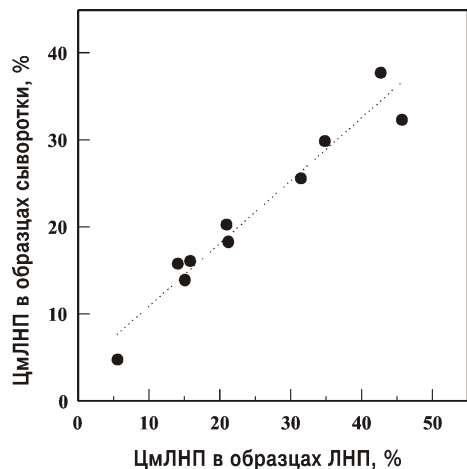


Рис. 6. Корреляционная зависимость между уровнем цмЛНП, определенном в сыворотке и в препарате липопротеидов.

49+10 мкг/мл (7,1+1,7% от уровня апоВ). Уровень цмЛНП в крови у 30 пациентов с коронарным атеросклерозом составлял от 173 мкг/мл (14,0% от уровня апоВ в сыворотке) до 774 мкг/мл (56,5%) (в среднем 402+54 мкг/мл или 35,9+4,3%). Различия средних уровней содержания десалированных ЛНП в крови здоровых лиц и пациентов было статистически значимым ($p < 0,05$).

В литературе представлены противоречивые данные относительно диагностической роли десалированных ЛНП в отношении атеросклероза. Было показано, что содержание сиаловой кислоты в ЛНП не является маркером ранних стадий развития сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Этими же исследователями [9] данный параметр был изучен у пациентов с прогрессирующим атеросклерозом коронарной артерии. Было обследовано 100 пациентов после коронарной ангиографии и показано, что содержание сиаловой кислоты в ЛНП возрастает в процессе развития атеросклероза.

С другой стороны, было продемонстрировано, что у больных с ССЗ уровень десалированных или циркулирующих множественно модифицированных ЛНП значительно снижен по сравнению со здоровыми лицами [4, 10, 11].

Позднее другими авторами было сделано предположение о том, что в дополнение к усилению поглощения холестерина клетками, десалирование ЛНП может способствовать преждевременному развитию атеросклероза, ослабляя обратный транспорт холестерина [12]. А терапия ССЗ статинами способствует увеличению содержания сиаловой кислоты в ЛНП пациентов [13, 14].

Таким образом, есть основания предполагать, что десалированные ЛНП являются маркером развития атеросклероза. Необходимость в разработке ускоренного и

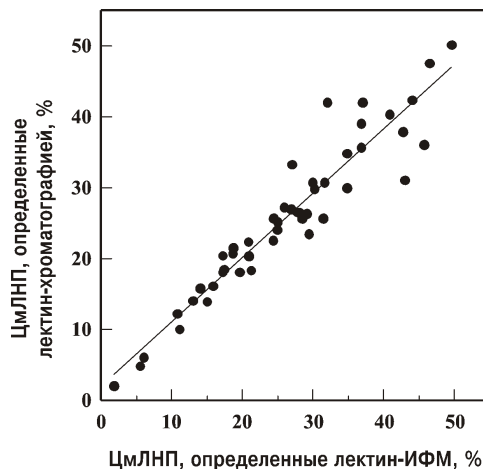


Рис. 7. Сравнение результатов определения количества цмЛНП в препарате с помощью колоночной хроматографии и твердофазным лектин-иммуноферментным методом (лектин-ИФМ).

улучшенного метода определения данного параметра очевидна. Это позволит провести более масштабные клинические исследования для подтверждения диагностической значимости уровня модифицированных ЛНП в крови.

Твердофазный лектин-иммуноферментный метод определения цмЛНП, описанный в данной статье, обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Сравнение результатов измерений, проведенных с помощью колоночной лектин-хроматографии и этим методом, выявило их тесную корреляцию. Разработанный метод позволяет точно и надежно измерять концентрацию цмЛНП без предварительного выделения фракции липопротеидов. Эта методика может быть использована в дальнейшем для рутинного определения содержания цмЛНП в сыворотке крови для экспресс-диагностики атерогенных дислипидемий при сердечно-сосудистых заболеваниях [15—19].

References

1. Chazov E.I., Tertov V.V., Orekhov A.N. et al. Atherogenicity of blood serum from patients with coronary heart disease. *Lancet*. 1986; 2 (8507): 595-8.
2. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*. 2002; 110 (7): 905-11.
3. Tertov V.V., Bittolo-Bon G., Sobenin I.A. and others. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Exp Mol Pathol*. 1995; 62 (3): 166-72.
4. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. et al. Carbohydrate composition of protein and lipid components in sialic acid-rich and -poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease. *J Lipid Res*. 1993; 34 (3): 365-75.
5. Baenziger J.U., Fiete D. Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxinspecificity for oligosaccharides. *J Biol Chem*. 1979; 254: 9795-9.
6. Tertov V.V., Sobenin I.A., Tonevitsky A.G. et al. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 167: 1122-7.
7. Nagai T., Miyaichi Y., Tomimori T., Yamada H. Inhibition of mouse liver sialidase by plant flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 163: 25-32.
8. Chappey B., Myara I., Giral P. et al. Evaluation of the sialic acid content of LDL as a marker of coronary calcification and extracoronary atherosclerosis in asymptomatic hypercholesterolemic subjects. PCV-METRA Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 334-9.
9. Chappey B., Beyssen B., Foos E. et al. Sialic acid content of LDL in coronary artery disease: no evidence of desialylation in subjects with coronary stenosis and increased levels in subjects with extensive atherosclerosis and acute myocardial infarction: relation between desialylation and in v. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18 (6): 876-83.
10. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N. Desialylated low density lipoprotein — naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency. *Atherosclerosis*. 1991; 86: 153-61.
11. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. and others. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. *Circ Res*. 1992; 71: 218-28.
12. Harada L.M., Carvalho M.D., Passarelli M., Quintro E.C. Lipoprotein desialylation simultaneously enhances the cell cholesterol uptake and impairs the reverse cholesterol transport system: in vitro evidences utilizing neuraminidase-treated lipoproteins and mouse peritoneal macrophages. *Atherosclerosis*. 1998; 139 (1): 65-75.
13. VN Titov Clinical biochemistry lipid-lowering therapy and the mechanisms of action of statins. *Pathogenesis*. 2013; 11: 16-26.
14. Lindbohm N., Gylling H., Miettinen TE, Miettinen TA. Statin treatment increases the sialic acid content of LDL in hypercholesterolemic. *Atherosclerosis*. 2000; 151 (2): 545-50.
15. Davydov D.M. Asymmetry in the cardiovascular system: its nature and role in maintaining stability and adaptation to stressful influences. *Pathogenesis*. 2013; 11: 26-31.
16. Kushlinsky N.E., Timofeev Yu. The role of the RANK / RANKL / OPG in the pathogenesis of primary and metastatic bone tumors. *Pathogenesis*. 2013; 11: 9-15.
17. Lysko A.I., Dudchenko A.M. Catalytic Antioxidants: potential therapeutic agents for the correction of pathologies caused by oxidative stress. *Pathogenesis*. 2013; 11: 22-8.
18. Markov N.A., Shevtsova E.F. Stress-induced depression as a risk factor for Alzheimer's disease: the role of glycogen synthase kinase-3. *Pathogenesis*. 2013; 11: 4-8.
19. Hugaeva V.K. Legends and actual patterns of microcirculation. *Pathogenesis*. 2013; 11: 32-41.

Сведения об авторах:

Мельниченко Александра Александровна, e-mail: inat-science@yandex.ru

Мясоедова Вероника Александровна, e-mail: myika@yandex.ru

Никитина Надежда Александровна, e-mail: nikitinanadyaa@mail.ru; лаборатория молекулярной иммунологии и биохимии, 119435, Москва, ул. Б. Пироговская, д. 1а; Елизова Наталья Владимировна, e-mail: natalina5@ya.ru

Собенин Игорь Александрович, e-mail: sobenin@cardio.ru

Орехов Александр Николаевич, e-mail: a.h.opexob@gmail.com

For citation: Onischenko N.A., Mesherin S.S., Alekseeva L.S., Sevastyanov V.I. The model of chronic transplantational nephropathy. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(2): 112—117. (In Russian).

For correspondence: *Sergey S. Meshcherin*, chief of the donor surgery department Federal State Budgetary Institution «Academician V.I.Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation, e-mail: ssergeevi4@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Acknowledgments. None.

Information about authors:

Meshcherin S.S., <http://orcid.org/0000-0001-5700-7906>

Received 20.02.16

Введение

Общепризнано, что основной причиной утраты почечных трансплантатов на отдаленных сроках является прогрессирующая хроническая трансплантационная нефропатия (ХТН) [1—3], морфологические признаки которой (тубулоинтерстициальный склероз, тубулярная атрофия и гломерулопатия) начинают формироваться уже к концу первого года после трансплантации у 94,2% реципиентов [4]. Полагают [5], что развитию ХТН способствуют 3 группы факторов: продолжающаяся активность иммунных реакций на аллоантигены трансплантата, нефротоксический эффект иммуносупрессивных препаратов (ингибиторов кальциневрина) и действие на трансплантат различных факторов, не связанных с иммуносупрессией. Не отрицая значения всех вышеперечисленных факторов как способствующих развитию ХТН, нами сделано предположение, что ведущая и патогенетически важная роль в развитии и прогрессировании ХТН принадлежит 2 биологически-значимым факторам: фактору децентрализации (денервации-делимфатизации) трансплантата, способствующему развитию местного иммунного воспаления, и фактору спонтанной активации процессов регенерации, которые взаимодействуют в организме реципиента в течение всего посттрансплантационного периода и повышают чувствительность трансплантата к повреждающему действию различных специфических и неспецифических факторов. Между тем, значению этих общебиологических факторов в развитии ХТН при трансплантации почки до сих пор не уделяется должного внимания. Доказательства ведущей патогенетической роли факторов децентрализации (денервации-делимфатизации) почки и спонтанной активации процессов регенерации в ускоренном развитии ХТН могут быть получены лишь путем моделирования этих факторов в условиях ауто трансплантации почки (АТП), исключая влияние на результаты фактора иммуногистонесовместимости. Однако такая модель на мелких лабораторных животных, удобных для выполнения хронического эксперимента, отсутствует.

Цель работы — создание модели ускоренного развития ХТН у крыс в условиях АТП.

Методика

Исследование проведено на 80 крысах-самцах Вистар с исходной массой 120—160 г. Содержание лабораторных животных и все манипуляции с ними выполнялись в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях», Страсбург, Франция (1986) и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003).

Выполнено 4 группы хронических экспериментов. 1-ю группу (n = 25) составили крысы с нефрэктомией левой почки и ауто трансплантацией правой почки (АТП) (контроль-1); во 2-ю группу были включены крысы (n = 25), которым через 35—40 сут. после нефрэктомии левой почки и моделирования АТП правой, вводили однократно в хвостовую вену аутологичные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ) в дозе 3,0—5,0 × 10⁶ клеток для активизации процессов регенерации в децентрализованной почке (модель ХТН). Указанную дозу обычно используют в эксперименте для индукции репаративной регенерации почек при их остром или хроническом повреждении, но без нарушения целостности системы их нейро-иммуно-гуморальной регуляции [6]. 3-ю группу (n = 15) составили интактные животные (контроль-2). В 4-й группе интактным животным внутривенно однократно вводили МСК КМ как и во 2-й группе в дозе 3,0—5,0 × 10⁶ клеток (контроль-3). Моделирование АТП в 1-й и 2-й группах включало 2 этапа:

1. Под ингаляционным эфирным наркозом выполняли срединную лапаротомию, иссекали левую почку, затем правую почку хирургически децентрализовывали — проводили денервацию и делимфатизацию. Для этого правую почку выделяли из забрюшинных тканей, тупым и острым путем выполняли прецизионную дис-

секцию нервных и лимфатических путей в области ворот почки, что достигалось не только путем хирургического разрушения и удаления адвентиции и клетчатки, окутывающих почечную артерию, вену и мочеточник в области ворот почки, но и путем частичной хирургиче-

ческой декапсуляции почки в области ворот и до зоны, включающей ее полюса в радиусе 7—10 мм.

2. Спустя 7—10 сут. после хирургического вмешательства животных иммунизировали трехкратным введением водно-солевого раствора почечного аутоантигена. Для этого готовили экстракт из целой удаленной левой аутологичной почки в 3—4 мл физиологического раствора, смешивали с неполным адьювантом Фрейнда в отношении 1:1. Экстракт вводили в подкожную клетчатку 4 лапок три раза через каждые 7—10 сут. (по 1,8—2,0 мл смеси водно-солевого раствора антигена с адьювантом Фрейнда в отношении 1:1 с суммарным содержанием белка 35 мг/мл).

Моделирование ХТН осуществляли во 2-й группе крыс через 7—10 сут. после завершения иммунизации или через 35—40 сут. после моделирования АТП. Для этого под эфирным наркозом внутривенно (в хвостовую вену) вводили заранее выделенные культивированные МСК аутологичного КМ в количестве $3,0—5,0 \times 10^6$ клеток в 1 мл физиологического раствора. Заготовку аутологичного КМ проводили за 1 нед. до моделирования АТП под эфирным наркозом из костномозгового канала двух бедренных костей. Очистку и получение культуры МСК КМ осуществляли по [7]. Кроме животных 2-й группы, МСК КМ в той же дозе вводили крысам 4-й группы (контроль-3).

На сроках 1, 3, 5 и 7 мес. после моделирования АТП во всех группах проводили в динамике исследование суточного диуреза, рассчитывали экскрецию натрия с мочой, определяли содержание белка в суточной моче по Лоури, а также содержание креатинина и мочевины в плазме крови общепринятыми лабораторными методами. Кроме того, проводили морфологические исследования кусочков ткани почек, фиксированных в 10% нейтральном формалине и залитых в парафин по общепринятой методике. Депарафинизированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Маллори. Статистическую обработку результатов биохимических исследований производили на персональном компьютере с использованием специального статистического пакета Biostat. Статистическую значимость в сравниваемых группах оценивали по критерию t Стьюдента, при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследование показателей азотовыделительной функции почек в всех контрольных группах опыта в течение 1—7 мес. позволило установить, что децентрализованные почки крыс в 1-й и 2-й группах так же, как почки животных других групп в течение всего периода наблюдений сохраняют свою основную гоме-

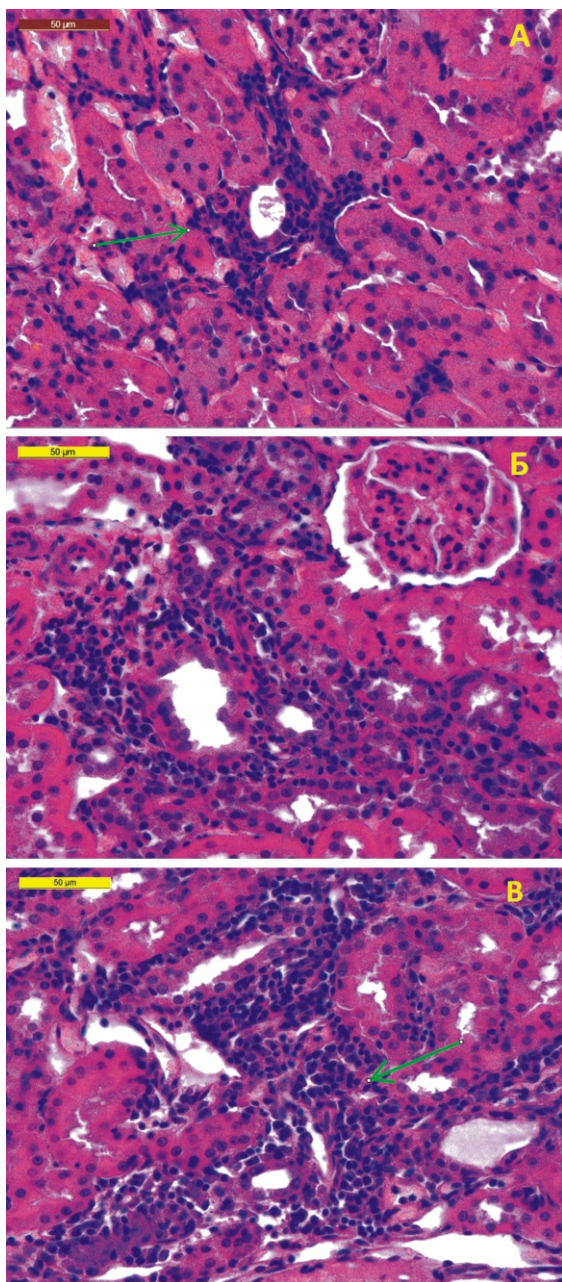


Рис. 1. Морфологические изменения в корковом слое почки через 3 мес. после моделирования АТП без (А — контроль) и с однократным введением МСК КМ (Б и В). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 400$:

А — редкие очаги инфильтрации полинуклеарными клетками;
Б — различная степень повреждения лимфоцитами стенки канальцев;
В — интенсивная воспалительная инфильтрация.

остатическую функцию: уровень креатинина и мочевины в крови поддерживается в пределах референтных значений. Между тем, некоторые канальцевые функции почек крыс 1-й и 2-й групп по сравнению с исходными значениями и значениями показателей в 3-й группе (контроль 2) были нарушены (таблица): повышена экскреция натрия с мочой, причем во 2-й группе она была повышена в значимо большей степени, чем в 1-й. Примечательно, что в 1-й, и особенно во 2-й группе на всех сроках наблюдения имела место прогрессирующая протеинурия, которая была более выражена во 2-й группе, где к 7-му мес. она достигала $12,6 \pm 2,4$ мг/сутки/100 г массы, а к 10-му мес. — $15,1 \pm 1,4$ мг/сутки/100 г. В 3-й группе (контроль 2) статистически значимых отклонений от исходного (фоновая) уровня обнаружено не было, а в 4-й группе (контроль 3) белок в моче вообще не был обнаружен.

Более выраженные нарушения канальцевых (экскреция натрия) и клубочковых (протеинурия) функций во 2-й группе опытов были подтверждены при морфологическом исследовании почек. У крыс 1-й группы (рис. 1) через 3 мес. в почках отмечается незначительно выраженное полнокровие капилляров и редкие очаги инфильтрации коркового слоя почек клетками воспалительного ряда (рис. 1, А).

В то же время в почках крыс 2-й группы на этом сроке значительно чаще встречаются очаги интенсивной клеточной инфильтрации (рис. 1, Б, В). Через 5 мес. морфологические признаки ХТН в почках крыс 2-й группы нарастают: в клубочках выявляется неравномерность кровенаполнения капилляров, пролиферация эндотелиальных и мезангиальных клеток, инфильтрация клубочков воспалительными клетками. Эпителий извитых канальцев и собирательных трубочек в состоянии белковой дистрофии; часть клубочков и канальцев рас-

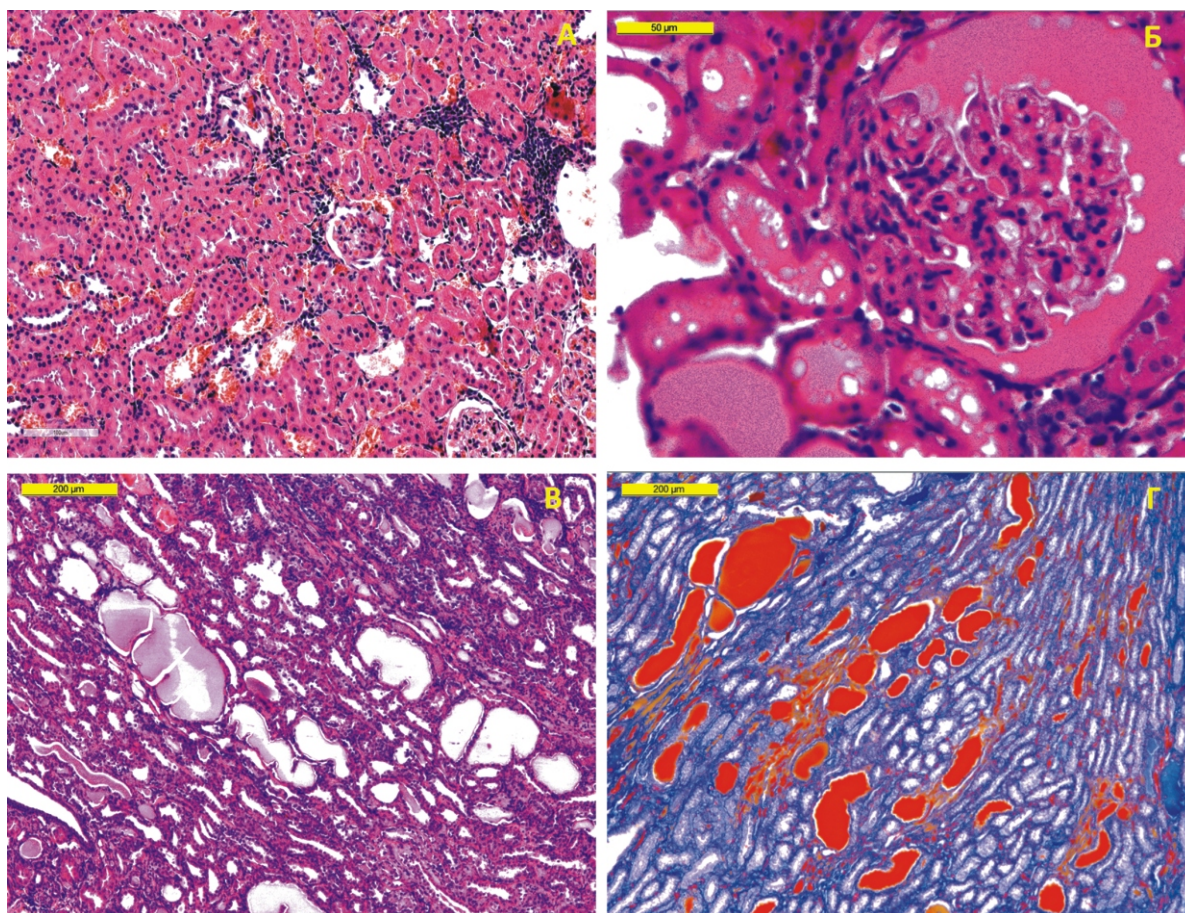


Рис. 2. Морфологические изменения в почке через 7 мес. после моделирования АТГ без (А — контроль) и с однократным введением МСК КМ (Б, В, Г). — Окраска гематоксилин эозином (А, Б, В) и по Маллори (Г). Ув. X100 (А, В, Г) и X400 (Б):

А — очаговая воспалительная инфильтрация; Б — скопление белкового ультрафильтрата в просвете расширенной капсулы клубочка; В — кистозно-расширенные канальцы с белковым ультрафильтратом («щитовидная» почка); Г — большое количество белка в просвете собирательных трубочек мозгового слоя почки.

Некоторые показатели выделительной функции почек
при динамическом наблюдении в разных экспериментальных группах (M ± m)

Показатели	Группы	Исходные значения	Сроки наблюдения (месяцы)			
			1	3	5	7
Диурез, мл/сут./100 г	I (контроль 1)	2,2 ± 0,15	3,25 ± 0,4	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,35	2,0 ± 0,3
	II		4,8 ± 0,7 ^{х)}	3,2 ± 0,20 ^{х)}	2,15 ± 0,2	1,76 ± 0,2 ^{х)}
	III (контроль 2)		2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,1
	IV (контроль 3)		2,45 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1
Экскреция натрия с мочой, ммоль/сут./100 г	I (контроль 1)	0,15 ± 0,05	0,29 ± 0,01 ^{х)}	0,30 ± 0,02 ^{х)}	0,29 ± 0,05 ^{х)}	0,29 ± 0,02 ^{х)}
	II		0,26 ± 0,07 ^{х)}	0,40 ± 0,04 ^{х),0)}	0,41 ± 0,05 ^{х),0)}	0,41 ± 0,0 ^{5х),0)}
	III (контроль 2)		0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,04
	IV (контроль 3)		0,17 ± 0,05	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,08
Экскреция белка с мочой, мг/сут./100 г	I (контроль 1)	0,5 ± 0,4	1,7 ± 0,3 ^{х)}	2,2 ± 0,7 ^{х)}	3,2 ± 0,2 ^{х)}	3,6 ± 0,5 ^{х)}
	II		1,6 ± 0,05 ^{х)}	7,2 ± 0,1 ^{х),0)}	10,3 ± 2,7 ^{х),0)}	12,6 ± 2,4 ^{х),0)}
	III (контроль 2)		0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,3
	IV (контроль 3)		—	—	—	—

Примечание. ^{х)} — $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем; ⁰⁾ — $p < 0,05$ по сравнению с контролем 1 на том же сроке исследования

ширена, выстлана уплощённым эпителием и заполнена гомогенной белковой эозинофильной жидкостью.

К 7-му месяцу у крыс 2-й группы количество клубочков и канальцев, содержащих белковый ультрафильтрат (типа белка Тамма—Хорсфила), нарастает: выявляется в клубочках (рис. 2, Б), в просвете извитых канальцев коркового слоя (рис. 2, В) и в собирательных трубочках мозгового слоя (рис. 2, Г), что создаёт морфологическую картину «щитовидной» почки. У крыс 2-й группы на этом сроке в почках сохраняются также умеренно выраженные перитубулярные и перигломерулярные лимфоцитарные инфильтраты, что позволяет считать их проявлением развивающегося перигломерулярного и перитубулярного склероза. Однако, в почках крыс 1-й группы к 7-му месяцу признаки деструкции не нарастали (рис. 2, А), а при динамическом исследовании почек во 2-й и 4-й группах каких-либо отклонений от нормы нам вообще выявить не удалось. Из представленных результатов следует, что сама по себе модель АТП не вызывает глубоких структурных изменений в почках в указанные сроки наблюдения и, очевидно, поэтому фактору децентрализации трансплантата до сих пор в клинике не уделяется должного внимания. Между тем, во 2-й группе морфологические признаки ХТН становились отчетливо выраженными, прогрессировали и были аналогичны тем, которые возникают, при аллогенной трансплантации на отдаленных сроках [2—4] на фоне длительного применения иммуносупрессивных препаратов или при воздействии на почку других факторов. Децентрализация почки при АТП, таким образом, является фактором, сенси-

билизирующим ткань почки, а при длительном применении препаратов (например, иммуносупрессоров) даже в терапевтически допустимых дозах — становится фактором их ускоренного токсического повреждения. Об определяющей роли фактора ненарушенной иннервации в нормализации метаболических процессов в почке с фиброзирующим процессом при введении МСК КМ свидетельствуют результаты опытов Alfaraño и соавт. (2012) [8].

Вышеизложенное позволяет заключить, что моделирование у крыс АТП путем её децентрализации и индукции воспаления в сочетании с однократным введением терапевтической дозы аутологических МСК КМ позволяет к 3—5 мес. создать модель ХТН. Показано так же, что децентрализация почки сенсibiliзирует её ткань, снижает порог токсического повреждения и при действии различных неспецифических факторов становится одним из ведущих механизмов развития хронической трансплантационной нефропатии.

References

1. Artero M., Biava C., Amend W. et al. Recurrent focal glomerulosclerosis: natural history and response therapy. *Am J Med.* 1992; 92 (4): 375-83.
2. Tejani A., Stablein D.H. Recurrence of focal glomerulosclerosis posttransplantation: a special report of the North American Pediatric Renal Transplantant Cooperative Study. *J Am Soc Nephrol.* 1992; V2, (12): S258-263
3. Stolyarevich E.S., Tomilina N.A. Morphology and diagnostic criteria of the chronic kidney transplant dysfunction. *Transplantologiya.* 2009; t.1 (1):19-31.
4. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl. J Med.* 2003; Dec 11; 349(24): 2326-33.

5. Tomilina N.A., Stolyarevich E.S., Kim I.G., Artyuhina L.Yu. Long-term results of kidney transplantation in point of view of the different ways of the basis immunosepression. *Transpantologiya* 2014; 3: 6-16.

6. Rinders E.J., Fibbe W.E., Rabelink T.J. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant* 2010; 25: 17-24

7. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells *J. Orthop. Res.*, 1991; N9:641-650

8. Alfarano C., Roubeix C., Chaaya R., Ceccaldi C., Calise D., Mias C. et al. Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats. *Cell Transplant.* 2012; 21 (9): 2009-2019

Сведения об авторах:

Онищенко Нина Андреевна — главный научный сотрудник, доктор медицинских наук, профессор, отдела «Биомедицинских технологий и тканевой инженерии», ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва

Мещерин Сергей Сергеевич — зав. отделения координации органного донорства ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва Тел. +7-963-644-96-36. E-mail: ssergevi4@mail.ru

Алексеева Лидия Сергеевна — научный сотрудник отд. клинической патоморфологии, кандидат медицинских наук

Севастьянов Виктор Иванович — доктор биологических наук, профессор, зав. отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии

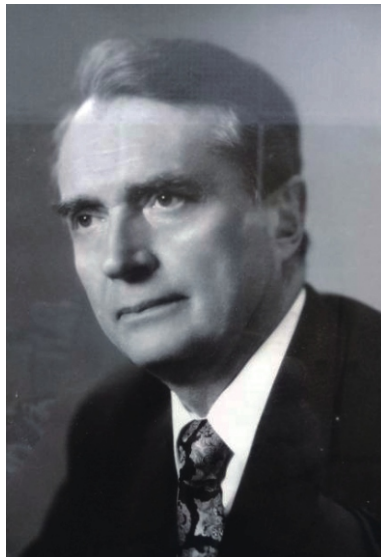
Хугаева В.К.

Алексей Михайлович Чернух (1916—1982)

Исполнилось 100 лет со дня рождения видного ученого, организатора медицинской науки, общественного деятеля, вице-президента АМН СССР, лауреата Государственной премии СССР, академика Алексея Михайловича Чернуха.

Алексей Михайлович Чернух родился 23 марта 1916 г. в селе Старые Санжары Полтавской области. После окончания школы в 1932 г. он с родителями переезжает в Ленинград, где поступает на рабфак Института киноинженеров. Через год он был принят во 2-й Ленинградский медицинский институт, который окончил в 1938 г. Жизнь и учеба в Ленинграде, по словам Алексея Михайловича, имели для него большое значение. По распределению молодой врач был направлен на работу в Читинскую область на Уровскую научно-исследовательскую станцию, где изучали Уровскую (Кашино-Бека) болезнь. Стремление посвятить себя научной деятельности Алексей Михайлович реализовал в 1939 г., поступив в аспирантуру Всесоюзного института экспериментальной медицины (ВИЭМ) в Москве к выдающемуся ученому академику АН СССР А.Д. Сперанскому. Однако начавшаяся в 1941 г. война прервала обучение. В августе 1941 г. по распоряжению Наркомздрава он направляется в г. Сталинск (ныне Новокузнецк), где заведует неврологическим отделением городской больницы и одновременно является консультантом эвакогоспиталя. После окончания войны в 1945 г. А.Д. Сперанский собрал своих учеников в институте общей и экспериментальной патологии АМН СССР. В 1946 г. он защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Долевые пневмонии в эксперименте», а в 1955 г. — докторскую: «Нервное раздражение в процессе воспаления». С 1954 по 1957 гг. Алексей Михайлович являлся заместителем директора Института общей и экспериментальной патологии.

С 1939 г. по 1957 г. Алексей Михайлович исследовал различные аспекты проблемы воспаления: воспроизведение моделей воспаления, (в частности, пневмонии), экспериментальное изучение механизмов ограничения и подавления воспалительной реакции, роль резистентности организма, механизмы действия лекарственных веществ у животных при различных моделях воспаления. Анализ полученных результатов позволил ему представить общепатологическую оценку реакции целостного организма на повреждение. Новым для того времени были, полученные им результаты, расширившие представления о воз-



никновении общих реакций организма в ответ на локальное повреждение. Полученные результаты вошли в монографию Алексея Михайловича «Инфекционный очаг воспаления» (1965, М., Медицина, 333 с.). В 1979 г. А.М. Чернух вновь вернется к проблеме воспаления. В своей монографии «Воспаление», анализируя собственные и литературные данные о роли медиаторов воспаления в развитии и терапии патологического процесса, он излагает и обосновывает «взаимосвязь калликреин-кининовой системы с свертывающей и фибринолитической системами крови, которые определяют биохимический состав, реологические свойства крови, функциональное состояние эндотелия и тонус стенки сосудов».

С 1957 по 1965 гг. А.М. Чернух работал заведующим отделом химиотерапии Института фармакологии и химиотерапии АМН СССР. В 1958 г. ему было присвоено звание профессора. Этот период научной деятельности был связан с изучением механизмов действия различных лекарственных препаратов (антибиотики, противотуберкулезные, противовирусные, противоопухолевые, противовоспалительные и др.). Традиционное изучение чисто фармакологического действия препаратов на микробную, опухолевую и другие клетки, изолированные от целостного организма, имело свои ограничения. Параллельно с фармакологической оценкой эффективности препаратов он оценивает их влияние на макроорганизм. В результате были обнаружены существенные побочные эффекты.

Исследование механизмов действия препаратов на различных уровнях интеграции (на уровне целостного организма, тканевом, клеточном, субклеточном, молекулярном), при различных воздействиях (охлаждение, перегревание, облучение, действие электричества и др.) показали в какой мере эффективность действия препаратов зависит от функционального состояния организма. В 1958 г. Алексею Михайловичу было присвоено звание профессора. Результаты исследований А.М. Чернуха были обобщены в трех монографиях: «Антибиотики группы тетрациклинов» (1962), «Инфекционный очаг воспаления» (1965), «О тератогенном действии химических (лекарственных) веществ» (1969).

Наиболее яркой и плодотворной была научная деятельность Алексея Михайловича с 1965 г. и продолжалась до конца его жизни. В 1965 г. он становится директором Института нормальной и патологической физиологии, а

после его реорганизации в 1974 г. до конца жизни — директором Института общей патологии и патологической физиологии АМН СССР. В 1967 г. он был избран членом-корреспондентом АМН СССР, в 1971 г. становится академиком АМН СССР, с 1974 г. по 1982 г. вице-президентом АМН СССР. Алексей Михайлович много внимания уделял организации медицинской науки в различных направлениях, международному сотрудничеству ученых разных стран, популяризации медицинских знаний, занимая пост заместителя председателя Всесоюзного общества «Знание» (1974—1982 гг.). Большая научно-организационная работа была проведена им в качестве председателя Всесоюзного общества патофизиологов (1967—1982 гг.), члена редколлегии журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия». Он организовал первые конгрессы по патофизиологии, заложил основы для создания международного общества патофизиологов, был председателем Совета научного медицинского общества Минздрава СССР (1970—1972 гг.). А.М. Чернух был членом редакционной коллегии Большой медицинской энциклопедии. Алексей Михайлович достойно представлял достижения советской медицинской науки, являясь членом консультативного Совета по медицинским исследованиям при ВОЗ.

Несмотря на колоссальную загруженность, главным своим делом он всегда считал научно-исследовательскую деятельность. Общий патолог — Алексей Михайлович вникал в сущность исследований, проводимых в различных аспектах, стремясь вместе с авторами определять место полученных результатов в общих представлениях о механизмах. Вместе с тем он обращал внимание на общие закономерности. В частых зарубежных командировках, в рамках международного сотрудничества, которые выполнял вице-президент АМН, Алексей Михайлович пристальное внимание уделял новейшим техническим достижениям в области экспериментальной медицины и особенно исследованиям микроциркуляции в капиллярах, играющих важную роль в развитии воспалительной реакции.

Впервые термин «микроциркуляция» появился в 1954 г., когда первые международные конференции по ангиологии стали включать материалы по капиллярному кровообращению. С удивительной интуицией Алексей Михайлович увидел в зарождавшемся учении о микроциркуляции его теоретическую и практическую перспективность. Огромной заслугой А.М. Чернуха стало внедрение в практику экспериментальных и клинических исследований методов изучения микроциркуляции в прижизненных условиях. Лаборатория общей патологии и экспериментальной терапии, руководимая А.М. Чернухом, Института нормальной и патологической физиологии АМН СССР превратилась не только в Всесоюзный и международный научно-методический центр обучения методам изучения микроциркуляции, но стала центром создания новых и модификации известных методов исследования кровотока и лимфотока в микрососудах. В результате сотрудничества с Ленинградским оптико-механическим объединением (ЛОМО) была создана полифункциональная по своим возможностям примене-

ния (регистрация частоты дыхания и пульсации кровеносных микрососудов, моторики стенки и клапанов лимфатических микрососудов, моторики стенки кишки, состава и плотности клеток крови, тучных клеток, других клеток периваскулярного пространства) фотометрическая насадка, входящая в комплект микроскопов ЛЮМАМ. Первые контактные объективы — достижение отечественной оптики (ЛОМО), позволяющие наблюдать микроциркуляцию на глубине до 500 мкм от поверхности органа, проверяются и используются в лаборатории. Первый видеоманитофон и первое использование лазерной установки для изучения метастазирования опухолевых клеток, развития тромбоза и др. патологических процессов начинались в нашей стране с лаборатории, возглавляемой Алексеем Михайловичем. Рост интереса к микроциркуляции со стороны сотрудников института выражался в создании и использовании установок: для изучения микроциркуляции легких в лаборатории патофизиологии дыхания, камерной методики в лаборатории экстремальных состояний и гемореологии. Микроциркуляцию бульбоконъюнктивы глаза у человека изучали в лаборатории клинической патофизиологии. В биоинженерной лаборатории Института работали над созданием лазерной установки. Там же создают прибор, позволяющий проводить импульсную фотосъемку с выдержкой одна миллионная секунды, то есть получить стоп-кадр в условиях биомикроскопии. Использование такой короткой выдержки при фотосъемке позволило получить новые данные о перераспределении кровотока и отдельных эритроцитов в динамике ишемии, определить перспективный прогноз изменения кровотока на основании поведения эритроцитов при ишемии ткани, обнаружить, ранее неизвестные, пути компенсации дефицита притока крови в зону ишемии.

Каждый новый метод изучения микроциркуляции позволял получить новую информацию, порой не соответствующей сложившимся представлениям, которые были получены с помощью гистологических методов исследования. Например, наличие большого количества артериоло-венулярных анастомозов в дерме кожи не соответствовало данным биомикроскопии. Анастомозы в дерме действительно имелись, но только венуло-венулярные. Наличие лимфовенозных анастомозов в брыжейке кишки также отсутствовало. Помимо двух известных закономерностей распределения кровотока в бифуркации в зависимости от угла ответвления сосудов обнаружены еще два типа не зависящие от угла ответвления микрососуда от магистрального сосудистого ствола.

С именем А.М. Чернуха связаны новые представления о механизмах иннервации капилляров, о возможной сократительной функции эндотелия, о причинах внезапной смерти и многие другие.

В лаборатории Алексея Михайловича всегда царила творческая атмосфера, которую создавали многочисленные ученики, каждый из которых должен был привнести в методическое оснащение лаборатории свою новизну.

В 2004 г. часть методов, созданных и используемых учениками и сотрудниками А.М. Чернуха были собраны в виде отписок статей и опубликованы П.Н.Александровым в книге «Методы исследования микроциркуляции», содержащей прижизненные ме-

тоды изучения функционирования кровеносных и лимфатических микрососудов, а также методы изучения текучести крови в микрососудах.

Частые гости Института и лаборатории из социалистических стран, интересующиеся микроциркуляцией, способствовали взаимному творческому обогащению, благодаря своим докладам и знакомству с достижениями сотрудников института.

Данные о функционировании микрососудистого русла в различных органах и тканях при различных патологических процессах (атеросклероз, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь, инфаркт миокарда, диабет, воспаление, стресс, шок, гипокинезия и др.) позволили выдвинуть Алексею Михайловичу концепцию о функциональном элементе органа.

«Функциональный элемент представляет собой пространственно ориентированный комплекс, состоящий из клеточных и волокнистых образований органа, микроциркуляторной единицы, включающей в себя приносящие, обменные и отводящие микрососуды, а также лимфатические капилляры и нервные образования.» «Основной формой деятельности функционального элемента органа является осуществление тканевого гомеостаза, т.е. единства кровообращения, метаболизма, регуляции и функционирования» (Чернух А.М., Актовая речь, М., 1979).

Плодотворность концепции о функциональном элементе заключается в необходимости проведения патогенетического анализа микроциркуляторных, нейродистрофических нарушений, воспаления и др. типовых патологических процессов в неразрывном единстве и взаимовлиянии всех компонентов функционального элемента. За цикл научных работ по микроциркуляции А.М. Чернух был удостоен Государственной премии СССР за 1977 г.

Под руководством Алексея Михайловича на базе Института общей патологии и патологической физиологии проводились Всесоюзные конференции по микроциркуляции.

А.М. Чернух является автором более 300 научных работ и 5 монографий. Одной из самых важных книг Алексея Михайловича стала книга «Микроциркуляция» (1975 г., 1984 г.), написанная совместно с его учениками и соратниками П.Н. Александровым и О.В. Алексеевым.

Концепция А.М. Чернуха и его труды нашли признание в нашей стране

и за рубежом. Он был награжден орденами: Ленина, Трудового Красного Знамени, «Знак Почета» и медалями. Международное признание его вклада в развитие микроциркуляции выразилось в избрании его вице-президентом Европейской ассоциации по микроциркуляции, членом редакционных коллегий ряда зарубежных журна-

лов по микроциркуляции, членом научных медицинских обществ Италии, США, СССР и др. советских и зарубежных научных обществ. Он был удостоен почетных медалей имени Вирхова (ГДР), И. Земмельвейса (ВНР), Г. Селье (учреждена в СССР), Я. Пуркинье (СССР).

Каким же был в повседневной жизни этот выдающийся ученый и общественный деятель? Повлияло ли признание его заслуг и высокие должности, награды на его отношение к окружающим? Абсолютно не повлияло. Алексей Михайлович Чернух доброжелательно относился к людям, был простым и доступным человеком. Старался помогать людям в работе и в личной жизни.

Заботился о своих учениках, помогал материально и морально. Хлопотал о предоставлении им жилья. Он всегда, независимо от конъюнктуры и времени, высоко чтит своего учителя — Алексея Дмитриевича Сперанского. В Институте бережно сохраняли кабинет, его обстановку, личные вещи Алексея Дмитриевича. Музей А.Д. Сперанского был гордостью Института общей патологии и патологической физиологии АМН СССР. По инициативе А.М. Чернуха проводились научные чтения, посвященные А.Д. Сперанскому. Была учреждена медаль имени А.Д. Сперанского. Он очень любил музыку классическую и народную, эстрадную и современную. Собирал пластинки и записи.

После скоропостижной смерти его идеи получили развитие в современных исследованиях его учеников и других ученых, которых очаровала микроциркуляция. Большой вклад в развитие прижизненных исследований текучести крови внес первый и самый талантливейший ученик, соратник и последователь Алексея Михайловича — это Петр Николаевич Александров. Методические разработки для клиники с помощью методов лазерной доплеровской флоуметрии создавал профессор Валентин Иванович Козлов в содружестве с инженерами фирмы ЛАЗМА В.В. Сидоровым, Крупаткиным А.И. и др. В настоящее время лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) стала самым популярным методом изучения микроциркуляции не только в эксперименте, но и в клинике. Тяжелый груз в условиях перестройки и кризиса по организации конференций с международным участием по микроциркуляции и гемореологии в Ярославле несет профессор Александр Васильевич Муравьев. В Москве конференции по клиническим исследованиям микроциркуляции с помощью ЛДФ организует В.И. Козлов на базе Университета дружбы народов.

14 апреля 2016 г. в родном институте Алексея Михайловича состоялась защита кандидатской диссертации по проблеме микроциркуляции, выполненной под руководством в прошлом аспирантки Алексея Михайловича, которую посвятили памяти учителя.

Хугаева Валентина Каргеевна — глав.н.с. д.м.н. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИ ОППФ Балтийская, 8. Тел.: 8-916-951-39-22.