

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«НИИ Общей патологии и патофизиологии»
Российской академии медицинских наук
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: ООО «Гениус Медиа»
E-mail: genius-media@mail.ru

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

ИФРИНЦ 0,413

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**

ISSN 0031-2991

Патологическая физиология и
экспериментальная терапия.
2015. Том 59. №1. 1—.

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

Тираж 300 экз.

© ООО Издательство «Гениус Медиа», 2014.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НИИ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК**

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

Т. 59, №1, 2015
ЯНВАРЬ—МАРТ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

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

Редакционный совет

Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
Ф. Дауни (США), В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),
А.Я. Евтушенко (Кемерово), 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: ООО «Гениус Медиа»
E-mail: genius-media@mail.ru
ИФРИНЦ 0,413

ISSN 0031-2991
Pathological
physiology
and experimental
therapy
2014. Vol. 58. №4. 1—.

Moscow

© ООО «Гениус Медиа», 2014.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY

Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya

*Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol.59, №1, 2015

January—March

Editor in chief B.B. Moroz

Assistant editors in chief:

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

Executive editor, scientific editor: N.S. Gourko

Members of editorial board:

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

Staff

Yu.V. Balyakin (Moskva), Yu.Yu. Byalovskiy (Ryazan),
F. Downey (USA), V.T. Dolgikh (Omsk), A.M. Dygay (Tomsk),
A.Ya. Evtushenko (Kemerovo), 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

- Собенин И.А., Желанкин А.В., Чернова Е.В., Кириченко Т.В., Орехова В.А., Сафарова М.С., Сергиенко И.В., Дорошчук А.Д., Трубинов С.С., Карагодин В.П., Орехов А.Н.* Традиционные и новые факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и предрасположенность к развитию атеросклероза
- Желанкин А.В., Сазонова М.А., Хасанова З.Б., Синёв В.В., Митрофанов К.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н., Постнов А.Ю.* Анализ митохондриальных гаплогрупп у лиц с доклиническим атеросклерозом на основе данных высокоэффективного секвенирования мтДНК
- Сазонова М.А.* Ассоциация мутаций митохондриального генома с липофиброзными бляшками интимы аорты человека
- Гриненко Е.А., Кульчиков А.Е., Мусин Р.С., Морозов С.Г.* Патогенез сосудистых последствий нестабильности шейного отдела позвоночника и алгоритм их фармакотерапии
- Кузник Б.И., Богданов И.Г., Исакова Н.В., Серебрянский И.И., Касьяненко Н.В.* Тромбодинамические свойства артериальной и венозной крови у больных ибс в дооперационном и раннем послеоперационном периодах при выполнении коронарного шунтирования
- Бондаренко Л.А., Мищенко Т.В.* Динамика изменений суточного ритма артериального давления при гипопинеализме
- Кульчиков А.Е., Гриненко Е.А., Емельянов В.К., Морозов С.Г.* Патопатология мозгового кровообращения при краниocereбральной диспропорции, обусловленной пневмоцефалией
- Милош Т.С., Максимович Н.Е.* Состояние эндотелия сосудов и прооксидантно-антиоксидантный баланс у беременных крыс в условиях эндотоксемии
- Митчиев А.К.* Роль активации процессов липопероксидации в механизмах развития патологии сердечно-сосудистой системы при действии тяжелых металлов в эксперименте
- Калиш С.В., Буданова О.П., Лямина С.В., Малышев И.Ю.* Генетические особенности систем генерации оксида азота определяют устойчивость организма к развитию карциномы
- Белова С.В., Норкин И.А., Пучиньян Д.М.* Влияние биополимера хондроитинсульфата на репаративную регенерацию соединительной ткани
- Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л.* Характеристика клеток Лейдига у новорожденного потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза
- Тараско А.Д., Ибатуллин И.А., Арефьева А.К.* Влияние поясничной (пара-нефральной) новокаиновой блокады на микроциркуляцию и обмен протеогликанов при экспериментальном гонартрозе

ОБЗОРЫ

- Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф.* Возможности медикаментозного управления процессом перепрограммирования фенотипа макрофагов
- Ветрилэ Л.А., Карпова М.Н., Кузнецова Л.В.* Аутоантитела к глутамату, ГАМК и их рецепторам при эпилепсии

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Sobenin I.A., Zhelankin A.V., Chernova E.V., Kirichenko T.V., Safarova M.S., Sergienko I.V., Doroshchuk A.D., Trubinov S.S., Karagodin V.P., Orekhov A.N.* Conventional and novel cardiovascular risk factors and predisposition to the development of atherosclerosis
- Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Khasanova Z.B., Sinyov V.V., Mitrofanov K.Yu., Sobenin I.A., Orekhov A.N., Postnov A.Yu.* Analysis of mitochondrial haplogroups in persons with subclinical atherosclerosis based on high-throughput mtDNA sequencing
- Sazonova M.A.* Association of mitochondrial genome mutations with lipofibrous plaques in human aortic intima
- Grinenko E.A., Kulchikov A.E., Musin R.S., Morozov S.G.* Pathogenesis of the vascular consequences caused by cervical instability and their algorithm for pharmacotherapy
- Kuznik B.I., Bogdanov I.G., Isakova N.V., Serebrijskij I.I., Kas'janenko N.V.* Thrombodynamic properties of arterial and venous blood in ischemic patients in preoperative and early postoperative periods
- Bondarenko L.A., Mishchenko T.V.* Dynamics of daily rhythm changes of arterial blood pressure in hypopinealism
- Kulchikov A.E., Grinenko E.A., Emelyanov V.K., Morozov S.G.* Cerebral circulation pathophysiology into pneumocephalus craniocerebral disportion
- Milosh T.S., Maksimovich N.Ye.* The endothelium of the vessels and prooxidative-antioxidative balance in pregnancy rats with endotoxaemia
- Mitsiev A.K.*
- Kalish S.V., Budanova O.P., Lyamina S.V., Malyshev I.Yu.* Genetic features of nitric oxide generating systems predetermine the body's resistance to the development of carcinoma
- Belova S.V., Norkin I.A., Puchinyan D.M.* The effect of the biopolymer chondroitin sulfate on reparative regeneration of connective tissue
- Bryukhin G.V., Sizonenko M.L.* Characteristics of Leydig cells in the newborn posterity of female rats with chronic injury of the hepatobiliary system of various genesis
- Tarasco A.D., Ibatullin I.A., Aref'eva A.K.* Effect of lumbar (perirenal) procaine blockade on microcirculation and exchange proteoglycans with experimental gonarthrosis

REVIEWS

- Sakharov V.N., Litvitskiy P.F.* Opportunities for pharmacological management of macrophage polarization
- Vetrite L.A., Karpova M.N., Kuznetsova L.V.* Autoantibodies to glutamate, GABA and their receptors in epilepsy

BRIEF REPORTS

ANNIVERSARY

© Коллектив авторов, 2015
УДК 616-004.6

Собенин И.А.^{1,2}, Желанкин А.В.^{1,2}, Чернова Е.В.², Кириченко Т.В.^{2,3}, Орехова В.А.^{1,2}, Сафарова М.С.¹, Сергиенко И.В.¹, Дорошчук А.Д.¹, Трубинов С.С.³, Карагодин В.П.⁴, Орехов А.Н.^{2,3}

Традиционные и новые факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и предрасположенность к развитию атеросклероза

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15 а

² — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

³ — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, 100

⁴ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российская экономическая академия им. Г.В.Плеханова», 117997, Россия, Москва, Стремянный пер., 36

В эпидемиологическом кросс-секционном исследовании приняли участие 472 условно здоровых человека с повышенным риском развития атеросклеротических заболеваний, в том числе, 300 пациентов с гиперхолестеринемией. Для оценки предрасположенности к развитию атеросклероза использовали метод ультразвукового сканирования сонных артерий в режиме высокого разрешения. Было подтверждено и расширено представление о существовании европейского географического градиента толщины интимо-медиаляльного слоя (ТИМС) и его ассоциации с градиентом сердечно-сосудистой смертности. Было установлено, что совокупность традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний объясняет только 21% вариабельности ТИМС общих сонных артерий — маркера генерализованного атеросклероза. Было установлено, что предрасположенность к атеросклерозу, оцениваемая по патологическому увеличению ТИМС сонных артерий, должна быть обусловлена взаимодействием не только традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, но также генетических и средовых факторов.

Ключевые слова: атеросклероз, факторы риска, предрасположенность, толщина интимо-медиаляльного слоя сонных артерий

Sobenin I.A.^{1,2}, Zhelankin A.V.^{1,2}, Chernova E.V.², Kirichenko T.V.^{2,3}, Safarova M.S.¹, Sergienko I.V.¹, Doroshchuk A.D.¹, Trubinov S.S.³, Karagodin V.P.⁴, Orekhov A.N.^{2,3}

Conventional and novel cardiovascular risk factors and predisposition to the development of atherosclerosis

¹ — Federal State Budgetary Institute «Russian Cardiology Research and Production Complex», 121552, Moscow, 3rd Cherepkovskaya str., 15-a

² — Federal State Budgetary Research Institute «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

³ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 143025, Skolkovo, Moscow Region, Russia, Novaya street, 100

⁴ — Plekhanov Russian University of Economics, 117997, Russia, Moscow, Stremyanny Pereulok, 36

This population-based cross-sectional study included 472 apparently healthy study participants with an increased risk of cardiovascular disease, including 300 patients with hypercholesterolemia. To assess the susceptibility to the development of atherosclerosis, an ultrasonic evaluation of common carotid arteries was used. It has been confirmed that there exists the geographical gradient of carotid intima-media thickness (cIMT), and it has been shown that this gradient is highly correlated with the known gradient of cardiovascular mortality. It was found that the combination of conventional cardiovascular risk factors can help explaining only 21% variability of cIMT, the marker of generalized atherosclerosis. It was found that a predisposition to atherosclerosis, as measured by a pathological increase in cIMT, should be due to the interaction not only conventional cardiovascular risk factors, but also to genetic and environmental factors.

Key words: atherosclerosis, risk factors, predisposition, carotid intima-media thickness

Для корреспонденции: Собенин И.А., д.м.н., вед. науч. сотр. отдела сердечно-сосудистой патологии НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии и НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8, e-mail: igor.sobenin@gmail.com

Раннее выявление и лечение лиц с высоким риском развития атеросклероза является актуальной медико-социальной задачей, решение которой должно привести к снижению сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности. В решении этой задачи идентификация маркеров субклинического атеросклероза является основополагающим фактором [1]. Толщина интимо-медиаляного слоя (ТИМС) сонных артерий, определяемая методом ультразвукографии высокого разрешения, считается общепризнанным неинвазивным маркером субклинического атеросклероза, используемым в клинических и эпидемиологических исследованиях для оценки влияния традиционных и новых факторов сердечно-сосудистого риска на развитие атеросклероза [2]. Поскольку существует корреляция ТИМС сонных артерий со степенью развития коронарного атеросклероза [3], и этот фактор обладает прогностической значимостью в отношении клинических проявлений атеросклероза [4], то он предложен в качестве суррогатного маркера системного (в том числе, и коронарного) атеросклероза. Классические факторы сердечно-сосудистого риска слабо ассоциированы с ТИМС сонных артерий, что предполагает наличие других факторов, определяющих риск развития атеросклероза. Результаты недавнего европейского многоцентрового исследования IMPROVE выявили существование географического градиента ТИМС сонных артерий, сопряженного с известным градиентом сердечно-сосудистой смертности [5]. Обнаруженный географический градиент ТИМС сонных артерий не зависел от межпопуляционных различий в совокупном воздействии традиционных факторов сердечно-сосудистого риска. Было высказано предположение, что в происхождении этого градиента играют роль другие механизмы, включающие наследственные, социально-экономические и экологические факторы. С целью проверки этого предположения нами было проведено кросс-секционное исследование на репрезентативной выборке из московской популяции, методология которого позволяла бы расценивать полученные результаты как существенное дополнение к данным европейского исследования IMPROVE.

Методика

Исследование проводили на базе поликлиники №202 г.Москвы. В исследовании участвовали 472 чел. (179 мужчин и 293 женщины), не имеющих клинических проявлений атеросклероза, в том числе 300 лиц с гиперхолестеринемией. Исследование было организовано в соответствии с международными и отечественными стандартами качественной клинической практики. Критерии включения в исследование и исключения из исследования были выдержаны в полном соответствии с критериями европейского иссле-

дования IMPROVE, что позволило сформировать группу наблюдения, полностью сравнимую с выборками из европейских популяций.

В исследование включали мужчин и женщин в возрасте от 55 до 79 лет, имеющих не менее трех традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. К последним относились: гиперхолестеринемия (уровень холестерина липопротеидов низкой плотности >160 мг/дл или постоянный прием холестеринснижающих лекарственных средств), гипертриглицеридемия (уровень триглицеридов >200 мг/дл или постоянный прием триглицеридснижающих лекарственных средств), гипоальфахолестеринемия (уровень холестерина липопротеидов высокой плотности <40 мг/дл), артериальная гипертензия (уровень диастолического артериального давления >90 мм рт.ст. и/или систолического артериального давления >140 мм рт.ст., или постоянный прием гипотензивных лекарственных средств), наличие сахарного диабета или нарушенной толерантности к глюкозе (уровень сахара крови >110 мг/дл или постоянный прием инсулина и/или сахароснижающих лекарственных средств), курение (потребление >10 сигарет в день в течение тридцати предшествующих месяцев), наличие отягощенного семейного анамнеза по сердечно-сосудистым заболеваниям. Для женщин дополнительным критерием включения служило наличие предшествующей менопаузы (спонтанной или хирургической) длительностью более 5 лет.

Критериями исключения являлись: ненормальная анатомическая конфигурация шеи и шейных мышц, выраженная извитость или необычное залегание сонных артерий и ее ветвей, наличие клинических проявлений атеросклероза в анамнезе (инфаркта миокарда, стенокардии, острых и преходящих нарушений мозгового кровообращения, аневризмы аорты, перемежающейся хромоты, хирургической реваскуляризации сонных, коронарных или периферических артерий), хроническая сердечная недостаточность 3—4 функционального класса, наличие тяжелых сопутствующих заболеваний.

Обследование участников исследования заключалось в проведении биохимического анализа липидного спектра сыворотки крови, выявлении основных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, расчете прогностического 10-летнего риска развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и внезапной коронарной смерти, ультразвуковой диагностике атеросклероза сонных артерий.

Кровь для липидного анализа в количестве 6 мл брали утром натощак из локтевой вены в сухую пластиковую пробирку объемом 15 мл, не содержащую антикоагулянтов. После свертывания крови в течение 2 часов при комнатной температуре и ретракции сгу-

стка при 4°C в течение 1 часа сгусток отделяли от стенок пробирки стеклянной палочкой. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 4500 об/мин в центрифуге Beckman TJ-6 (США). Сыворотку крови отбирали в пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и хранили при -20°C до проведения липидного анализа.

Содержание общего холестерина и триглицеридов определяли ферментативным методом с помощью наборов Холестерин-12-Витал (Витал Диагностикс СПб, Санкт-Петербург, Россия). Содержание холестерина липопротеидов высокой плотности определяли также ферментативным методом после осаждения липопротеидов других классов с помощью преципитирующего реагента Boehringer Mannheim (Германия). Содержание холестерина липопротеидов низкой плотности определяли по формуле Фридевальда. Индекс атерогенности рассчитывали как соотношение холестерина липопротеидов низкой плотности к холестерину липопротеидов высокой плотности.

Для оценки состояния стенки сонных артерий использовали ультрасонографию высокого разрешения в В-режиме с использованием линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц на ультразвуковом сканере SonoScape SSI-1000 (Китай). Протокол обследования включал сканирование левой и правой сонных артерий, области каротидного синуса, а также наружной и внутренней сонных артерий с фокусировкой на задней стенке артерии в трех фиксированных проекциях — переднебоковой, боковой и заднебоковой [6]. Обследование проводили в положении лежа после 15-минутного отдыха. Измерения ТИМС проводили на участке общей сонной артерии длиной 10 мм, противолежащем началу каротидного синуса. Толщину интимо-медиального слоя задней стенки общей сонной артерии определяли как расстояние от ведущего края первой экзогенной зоны до ведущего края второй экзогенной зоны. Среднее значение трех измерений (в переднебоковой, боковой и заднебоковой проекциях) рассматривали как интегральный показатель толщины интимо-медиального слоя. Соответствующие кадры ультразвуковых сканов записывали в цифровом формате для последующего анализа с помощью специализированного программного пакета M'Ath (Metris SRL, Франция), который обеспечивает полуавтоматическое определение ведущего края экзогенных линий интимо-медиального комплекса [7].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета SPSS версии 14.0 (SPSS Inc., США). Использовали подпрограммы описательной статистики, вариационного анализа, параметрической и непараметрической статистики, ковариационного анализа и линейной регрессии. Данные представляли в виде среднего значения и 95%

доверительного интервала [8]. Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза.

Результаты и обсуждение

Клинико-антропометрические характеристики участников исследования представлены в табл. 1, липидологические характеристики — в табл. 2.

Критерии включения, применявшиеся в данном исследовании, обусловили высокую долю участников, имеющих диагностированную гипертоническую болезнь (77%). Высока была доля участников, имеющих отягощенный семейный анамнез по инфаркту миокарда (30%), гипертонической болезни (49%) и сахарному диабету (13%). Вместе с тем, в самой группе участников доля страдающих сахарным диабетом (6%) была вполне сравнима с частотой сахарного диабета в российской популяции (по различным данным, от 4,5 до 6%). Примечательно, что доля курящих участников (13%) была существенно ниже, чем в среднем по российской популяции (около 60% для мужчин и 25% для женщин). Последнее может говорить о специфических особенностях обследованного контингента (пожилые люди, преимущественно имеющие высшее образование, в определенной степени ориентированные на поддержание здорового образа жизни).

Практически по всем клинико-антропометрическим параметрам мужчины статистически достоверно отличались от женщин. Прежде всего, мужчины были моложе в среднем на 5 лет ($p < 0,001$). Это различие отражает демографическую ситуацию в России, характеризующуюся меньшей средней продолжительностью жизни мужчин. По-видимому, это же возрастное различие во многом определило всю дальнейшую картину сравнения.

Так, женщины имели больший индекс массы тела ($p = 0,033$) преимущественно за счет избыточного содержания абдоминального жира (среднее значение 35,3% явно превосходило верхнюю границу нормы, определяемой как 33%). У большинства мужчин, напротив, содержание абдоминального жира находилось в пределах нормы, определяемой как 18—25%.

Несмотря на более молодой возраст, мужчины отличались повышенными, по сравнению с женщинами, показателями артериального давления; при этом женщины значительно чаще имели семейный анамнез, отягощенный по гипертонической болезни. Различия по семейному анамнезу, отягощенному по инфаркту миокарда, не достигли статистической значимости. Не имелось различий между мужчинами и женщинами по семейному анамнезу, отягощенному по сахарному диабету.

Как и следовало ожидать, у мужчин была выше доля курящих (и, соответственно, средняя длительность курения), и ниже доля никогда не куривших. При этом у мужчин также была выше доля отказавшихся от курения, что опять-таки свидетельствует о нацеленности обследованного контингента на соблюдение норм здорового образа жизни.

По липидологическим характеристикам (табл. 2) среднестатистический участник исследования мог быть охарактеризован как человек, имеющий умеренные отклонения в липидном профиле сыворотки

крови. Представленные средние значения профиля говорят о наличии умеренной гиперхолестеринемии и нормотриглицеридемии. Повышенный уровень общего холестерина был обусловлен, прежде всего, липопротеидами низкой плотности. При этом наблюдался достаточный уровень холестерина липопротеидов высокой плотности, в результате чего липидный индекс атерогенности оставался в пределах нормы (верхняя граница нормальных показателей определена в 3,0 ед.), что в целом свидетельствовало о сохранении сбалансированного липидного обмена.

Таблица 1

Клинико-антропометрические характеристики участников исследования

Показатель	Мужчины, n = 179	Женщины, n = 293	P	Вся группа, n = 472
Возраст, лет	61,2 (59,9 — 62,5)	66,3 (65,5 — 67,1)	<0,001	64,4 (63,6 — 65,1)
Индекс массы тела, кг/м ²	27,0 (26,5 — 27,5)	27,8 (27,3 — 28,3)	0,033	27,5 (27,1 — 27,9)
Масса абдоминального жира, % от массы тела	23,3 (21,1 — 25,4)	35,3 (34,0 — 36,6)	<0,001	31,8 (30,4 — 33,1)
Систолическое АД, мм рт. ст.	148 (145 — 150)	144 (142 — 146)	0,026	145 (144 — 147)
Диастолическое АД, мм рт. ст.	89 (87 — 90)	85 (84 — 86)	<0,001	86 (85 — 87)
Частота сердечных сокращений, мин ⁻¹	77 (75 — 79)	78 (76 — 79)	0,4	77 (76 — 78)
Курящие, % от количества участников	15	12	0,4	13
Никогда не курившие, %	56	78	<0,001	70
Отказавшиеся от курения, %	29	10	<0,001	17
Длительность курения, лет	10,0 (7,8 — 12,3)	4,8 (3,4 — 6,1)	<0,001	6,8 (5,6 — 8,0)
Сахарный диабет, %	8	5	0,2	6
Артериальная гипертензия, %	76	77	0,8	77
Гипертрофия левого желудочка, %	23	30	0,09	27
Длительность менопаузы, лет	—	16,1 (15,2 — 17,0)	—	—
Отягощенный семейный анамнез: по инфаркту миокарда по гипертонической болезни по сахарному диабету	25 35 14	33 57 12	0,059 <0,001 0,6	30 49 13

Таблица 2

Липидологические характеристики участников исследования

Показатель	Мужчины, n = 179	Женщины, n = 293	P	Вся группа, n = 472
Общий холестерин, мг/дл	238 (230 — 245)	261 (255 — 267)	<0,001	252 (248 — 257)
Триглицериды, мг/дл	152 (140 — 165)	134 (127 — 140)	0,004	140 (134 — 147)
Холестерин ЛВП, мг/дл	60 (58 — 62)	70 (69 — 72)	<0,001	66 (65 — 68)
Холестерин ЛНП, мг/дл	147 (141 — 154)	164 (159 — 169)	<0,001	158 (154 — 162)
Липидный индекс атерогенности, ед.	2,6 (2,4 — 2,7)	2,5 (2,4 — 2,6)	0,2	2,5 (2,4 — 2,6)

Таблица 3

Ультразвуковые характеристики каротидного атеросклероза

Показатель	Мужчины, n = 179	Женщины, n = 293	P	Вся группа, n = 472
Средняя ТИМС, мм	0,819 (0,798 — 0,840)	0,827 (0,813 — 0,842)	0,5	0,824 (0,812 — 0,836)
Диаметр просвета артерии, мм	7,66 (7,55 — 7,78)	7,24 (7,17 — 7,31)	<0,001	7,40 (7,34 — 7,47)

Следует отметить, что высокий уровень холестерина липопротеидов высокой плотности (принимая рекомендуемый нижний порог за 50 мг/дл) также косвенно может свидетельствовать о приверженности обследованного контингента здоровому образу жизни, в частности, регулярному потреблению свежих овощей и фруктов.

При этом по всем липидным параметрам женщины существенно отличались от мужчин. Так, они имели более высокие уровни холестерина обеих фракций липопротеидов (и в результате, общего холестерина) и более низкий уровень триглицеридов. Тем не менее, липидный индекс атерогенности у них оставался в норме, как и у мужчин.

Прямые количественные характеристики атеросклероза, полученные методом ультразвукового сканирования бассейна сонных артерий, приведены в табл. 3. У мужчин диаметр просвета сонных артерий был достоверно больше, чем у женщин ($p < 0,001$). Тем не менее, не было выявлено существенных различий между мужчинами и женщинами по средней ТИМС сонных артерий. Отсутствие таких различий позволило провести регрессионный анализ зависимости ТИМС от традиционных факторов риска без учета половых различий. Этот анализ показал, что средняя толщина интимо-медиаляного слоя зависит от возраста ($p < 0,001$), систолического АД ($p < 0,001$), холестерина ЛВП ($p = 0,039$) и холестерина ЛНП ($p = 0,003$). Модель регрессии была достоверной при $p < 0,001$; значение скорректированного R^2 составило 0,209.

Полученные в нашем исследовании данные о прямых количественных характеристиках атеросклероза были сравнены с результатами европейского исследования IMPROVE [5]. Результаты сравнения представлены в табл. 4. Несмотря на то, что использованные критерии включения в исследование позволили сформировать группу наблюдения, сравнимую с европейскими выборками по совокупному воздействию традиционных факторов сердечно-сосудистого риска, средняя ТИМС сонных артерий в московской популяции была достоверно выше, чем в любой из европейских популяций при $p < 0,001$.

Корреляционный анализ подтвердил существование географического градиента ТИМС сонных артерий, выявленного в исследовании IMPROVE для европейских популяций. Коэффициент корреляции между средней ТИМС сонных артерий и географическим положением исследовательского центра, вычисленным как среднее геометрическое географической широты и долготы, составил 0,905 ($p = 0,005$).

Был проведен анализ взаимосвязи средней ТИМС сонных артерий и стандартизованных показателей смертности от ишемической болезни сердца, полученных из базы данных Всемирной организации здравоохранения (<http://www.euro.who.int>). Коэффициент корреляции между этими показателями составил 0,853 ($p = 0,015$). В графическом виде логарифмическая модель данной регрессии представлена на рисунке; она является достоверной при $p = 0,003$; значение скорректированного R^2 составляет 0,860.

Поскольку традиционные факторы риска далеко не в полной мере объясняют вариабельность ТИМС как в европейских популяциях, так и в московской группе высокого риска, то следует предположить, что в формировании предрасположенности к атеросклерозу играют роль другие факторы. Одним из этих факторов могут служить неблагоприятные воздействия внешней среды. В качестве возможной характеристики экологической обстановки мы использовали среднегодовой интегрированный индекс загрязнения атмосферы. Он рассчитывается как сумма соотношений концентраций пяти основных загрязняющих компонентов (оксида азота, диоксида азота, оксида углерода, озона и формальдегида) к максимально допустимой концентрации в атмосфере. Было установлено, что стандартизованная смертность от ИБС имеет тенденцию к корреляции с индексом загрязнения атмосферы: коэффициент корреляции составил 0,742 при $p = 0,056$. При этом индекс загрязнения атмосферы коррелировал со средней ТИМС сонных артерий: коэффициент корреляции составил 0,812 при $p = 0,026$.

В данном исследовании мы использовали один из общепризнанных методов оценки предрасположенно-

Таблица 4

Межпопуляционное сравнение ультразвуковых характеристик каротидного атеросклероза

Популяция	Средняя ТИМС сонных артерий, мм	Географическая широта	Географическая долгота
Перуджа, Италия, n = 542	0,70 (0,69 — 0,71)	43°	12°
Милан, Италия, n = 553	0,72 (0,71 — 0,73)	45°	9°
Париж, Франция, n = 501	0,68 (0,67 — 0,69)	48°	2°
Гронинген, Нидерланды, n = 532	0,72 (0,71 — 0,73)	53°	7°
Стокгольм, Швеция, n = 533	0,79 (0,78 — 0,80)	59°	18°

сти к атеросклерозу, а именно неинвазивное ультразвуковое сканирование сонных артерий в режиме высокого разрешения. Данный подход позволил получить прямую количественную оценку степени развития субклинического атеросклероза у лиц с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний. Характеристика толщины интимо-медиаляного слоя общих сонных артерий получена для московской популяции впервые. Используемые критерии включения в исследование позволили сформировать группу наблюдения, сравнимую с европейскими выборками исследования IMPROVE по совокупному воздействию традиционных факторов сердечно-сосудистого риска. Прямое сравнение результатов измерения ТИМС сонных артерий с европейскими показателями продемонстрировало, что при наличии одинакового совокупного риска московская популяция в большей степени предрасположена к атеросклерозу.

Нам удалось существенно расширить имеющиеся представления о существовании географического градиента вариабельности ТИМС сонных артерий, причем этот градиент связан не только с географической широтой, как было продемонстрировано в исследовании IMPROVE, но и с географической долготой. Была подтверждена связь градиента ТИМС с градиентом сердечно-сосудистой смертности, что указывает на ТИМС как на самостоятельный и независимый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений.

Как и в зарубежных исследованиях, было подтверждено, что вариабельность ТИМС в недостаточной степени объясняется совокупным воздействием факторов риска: экспланаторность используемых моделей оценки связи факторов риска с ИБС составила только 21%. Поэтому вполне закономерно возникло предположение о том, что в формировании предрасположенности к атеросклерозу, оцениваемой ультразвукографическим методом, могут иметь существенное значение ранее не изученные (или недостаточно изученные) механизмы. Последние могут включать генетические, социально-экономические и экологические факторы. Проведенное кросс-секционное исследование в московской популяции, методология которого позволила расценивать его результаты как существенное дополнение к данным европейского исследования IMPROVE, показало, что экологическая обстановка может быть фактором, ассоциированным как с развитием субклинического атеросклероза, так и с его клиническими проявлениями и осложнениями.

Несомненно, результаты исследования имеют определенные ограничения. Так, исследование было выполнено на ограниченном и достаточно специфическом контингенте (москвичи, пожилые люди, преимуще-



Связь сердечно-сосудистой смертности и толщины интимо-медиаляного слоя общих сонных артерий.

ственно с высшим образованием, ориентированные на поддержание здорового образа жизни). Данные европейского исследования показывают, что вариабельность ТИМС существенно различается даже между популяциями, близкими в географическом плане. Понятно, что в России на удаленных друг от друга территориях, различающихся не только в географическом, но и в социально-экономическом, экологическом и этническом аспектах, вариабельность ТИМС (равно как и сердечно-сосудистой смертности) может различаться существенным образом. Единственным возможным разрешением этого ограничения может быть выполнение сходных по дизайну исследований в различных регионах России.

Следующим ограничением является то, что в исследовании не были задействованы социально-экономические и генетические подходы. Эти неучтенные факторы вполне могут играть существенную роль в формировании предрасположенности к атеросклерозу и, несомненно, должны быть изучены в дальнейших эпидемиологических исследованиях. Так, ранее было показано, что ранее малоизученные мутации митохондриального генома могут быть ассоциированы как с атеросклеротическими поражениями артериальной интимы, так и со степенью развития каротидного атеросклероза [9—11].

Наконец, из всех возможных факторов внешней среды, теоретически способных влиять на формирование физической предрасположенности к атеросклерозу (а именно, диффузного интимального утолщения, диагностируемого ультразвукографически как увеличенная ТИМС), был оценен только интегральный показатель загрязнения атмосферы. Этот по-

казатель не является ни стандартизованным, ни общепринятым. До сих пор не существует единой базы данных о степени загрязнении атмосферы. В каждой стране используются собственные стандарты, предельно допустимые нормы содержания загрязняющих веществ в атмосфере, методы их определения. Одним из неблагоприятных факторов внешней среды является пылевая нагрузка, которая не регламентируется и не оценивается в подавляющем большинстве стран мира. В нашем исследовании также не оценена связь ТИМС сонных артерий с содержанием пылевых частиц в атмосфере, главным образом, из-за отсутствия валидных данных. В Москве в течение последних лет наблюдается эскалация количества автомобилей, что усугубляет нагрузку на окружающую среду. Более 3 млн автомобилей производят тонны оксида углерода и других вредных химических веществ. Выброс твердых частиц с выхлопными газами составляет около 1,7 млн тонн в год, что составляет 87% от всего уровня загрязнения воздуха. Кроме того, существуют 12 тепловых электростанций, 53 станции теплоснабжения и 3000 промышленных предприятий в границах города. В результате концентрации вредных веществ в отдельных районах часто превышают предельно допустимые уровни в 10—20 раз. Следует отметить, что доля промышленного загрязнения в течение последних лет снизилась на 40% и в настоящее время составляет не более 7% от общего загрязнения воздуха. Таким образом, транспортные средства в настоящее время являются одним из основных источников загрязнения окружающей среды в городских районах. В недавнем исследовании в Германии было показано, что содержание твердых пылевых частиц выхлопных газов в атмосферном воздухе связано со степенью субклинического атеросклероза, распространенностью ишемической болезни сердца и заболеваемостью инфарктом миокарда [12].

Несмотря на изложенные выше ограничения, результаты нашего исследования однозначно говорят о том, что экологические и генетические факторы участвуют в формировании предрасположенности к атеросклерозу и должны изучаться как самостоятельные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение №14.616.21.0030.

Список литературы

1. Marcovina S.M., Crea F., Davignon J. et al. Biochemical and bioimaging markers for risk assessment and diagnosis in major cardiovascular diseases: a road to integration of complementary diagnostic tools. *J. Int. Med.* 2007; Vol.261: 214-34.
2. Stein J.H., Korcarz C.E., Hurst R.T. et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2008; V.21: 93-111.
3. Amato M., Montrosi P., Ravani A. et al. Carotid intima-media thickness by B-mode ultrasound as surrogate of coronary atherosclerosis: correlation with quantitative coronary angiography and coronary intravascular ultrasound findings. *Eur. Heart J.* 2007; Vol.28.-pp.2094-101.
4. Chambless L.E., Heiss G., Folsom A.R., et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am. J. Epidemiol.* 1997; Vol.146: 483-94.
5. Baldassarre D., Nyyssonen K., Rauramaa R. et al. Cross-sectional analysis of baseline data to identify the major determinants of carotid intima-media thickness in a European population: the IMPROVE study. *Eur Heart J.* 2009. Dec 1.-Epub ahead of print.
6. Salonen R., Nyyssonen K., Porkkala E. et al. Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries. *Circulation.* 1995;Vol.92: 1758-64.
7. Beux F., Carmassi S., Salvetti M.V. et al. Automatic evaluation of arterial diameter variation from vascular echographic images. *Ultrasound Med. Biol.* 2001; Vol.27: 1621-9.
8. Lang T.A., Secic M. *How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors, and reviewers.* Second edition. American College of Physicians, Philadelphia, 2006.
9. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2011; 4: 81-4.
10. Сазонова М.А., Нурбаев С.Д., Чичева М.М. и соавт. Детекция митохондриальных мутаций генов цитохромов В и С в липофиброзных бляшках интимы аорты человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2012; 4: 62-6.
11. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Salonen J.T., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mitochondrial genetic variation with carotid atherosclerosis. *PLoS One.* 2013; Vol.8.-P.e68070.
12. Hoffmann B., Moebus S., Dragano N. et al. Residential traffic exposure and coronary heart disease: results from the Heinz Nixdorf Recall Study. *Biomarkers.* 2009; Vol.14.-Suppl.1:74-8.

Поступила 17.12.14

Сведения об авторах:

Желанкин А.В. — к.биол.н., науч. сотр. отдела сердечно-сосудистой патологии НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а, мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: zhelankin.andrey@gmail.com

Чернова Е.В. — аспирант лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: katrincorde@gmail.com

Кириченко Т.В. — к.м.н., науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: t-gorchakova@mail.ru

Орехова В.А. — аспирант отдела сердечно-сосудистой патологии НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а, младший научный сотрудник лаборатории ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail:

Сафарова М.С. — к.м.н., ст. науч. сотр. НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а, e-mail: dr.maya@bk.ru

Сергиенко И.В. — д.м.н., вед. науч. сотр. НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а, e-mail: igorcardio@mail.ru

Дорошук А.Д. — к.биол.н., науч. сотр. отдела сердечно-сосудистой патологии НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а, e-mail: doroschuk_n@mail.ru

Трубинов С.С. — мл. науч. сотр., Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, д. 100, e-mail: sstruba@gmail.com.

Карагодин В.П. — вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, вед. науч. сотр., Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, д. 100, e-mail: vprka@mail.ru

Орехов А.Н. — д.биол.н., проф., зав. лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН; директор, Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, д. 100, e-mail: a.h.orexob@gmail.com

Желанкин А.В.¹, Сазонова М.А.^{1,2}, Хасанова З.Б.¹, Синёв В.В.¹,
Митрофанов К.Ю.², Собенин И.А.^{1,2}, Орехов А.Н.^{1,3}, Постнов А.Ю.¹

Анализ митохондриальных гаплогрупп у лиц с доклиническим атеросклерозом на основе данных высокоэффективного секвенирования мтДНК

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

² — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

³ — НИИ атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, 100

Генетическая предрасположенность играет важную роль среди факторов риска таких мультифакторных социально значимых заболеваний, как атеросклероз и его клинические проявления. Данное пилотное исследование направлено на выявление взаимосвязи между типом митохондриальной гаплогруппы и риском доклинического атеросклероза у человека. Для точного выявления митохондриальных гаплогрупп было проведено высокоэффективное секвенирование митохондриального генома по технологии Roche 454. Результаты исследования показали, что в российской популяции принадлежность к гаплогруппе H ассоциирована с повышенным риском атеросклероза, а принадлежность к гаплогруппам T и U — со сниженным риском. Полученные данные могут быть использованы для оценки индивидуального риска атеросклероза и дальнейшего изучения роли отдельных мутаций митохондриального генома в развитии атеросклероза и его клинических проявлений.

Ключевые слова: атеросклероз, гаплогруппа, митохондриальный геном, секвенирование нового поколения

Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Khasanova Z.B., Sinyov V.V.,
Mitrofanov K.Yu., Sobenin I.A., Orekhov A.N., Postnov A.Yu.

Analysis of mitochondrial haplogroups in persons with subclinical atherosclerosis based on high-throughput mtDNA sequencing

¹ — Federal State Institute «Russian Production Complex of Cardiology Research» of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, 121552, Moscow, 3th Cherepkovskaya street, 15-a

² — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8

³ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 143025, Skolkovo, Moscow Region, Russia, Novaya street, 100

Genetic predisposition plays an important role among other risk factors in multifactorial socially significant diseases such as atherosclerosis and its clinical manifestations. This pilot study was aimed to identify the relationship between the type of mitochondrial haplogroup and the risk of subclinical atherosclerosis in humans. For accurate detection of mitochondrial haplogroups, high-throughput sequencing of the mitochondrial genome using the Roche 454 technology was carried out. The results have shown that in Russian population, the belonging to haplogroup H is associated with an increased risk of atherosclerosis, but belonging to haplogroups T and U — with reduced risk. The data obtained can be used to assess individual risk of atherosclerosis and for further studies on the role of mitochondrial genome mutations in the development of atherosclerosis and its clinical manifestations.

Key words: atherosclerosis, haplogroup, mitochondrial genome, next-generation sequencing

Атеросклероз является наиболее распространенной патологией в современном обществе и морфологической основой для развития сердечно-сосудистых заболеваний. Вклад клинических проявлений атеросклероза в общую смертность в России и в большинстве индустриальных

стран является наиболее весомым [1]. В связи с этим, большое значение имеет ранняя диагностика доклинического атеросклероза, в том числе с использованием генетических биомаркеров повышенного риска. Ассоциация с атеросклерозом и ИБС была обнаружена для полиморфизмов в генах, продукты которых так или иначе вовлечены в метаболизм сосудистой стенки. На развитие и прогрессирование ИБС могут повлиять генетически обусловленные вариации активности белков, вовлеченных в патогене-

Для корреспонденции: Желанкин А.В., к.биол.н., науч. сотр. отдела сердечно-сосудистой патологии Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, e-mail: zhelankin.andrey@gmail.com

нез атеросклероза и его осложнений, в том числе участвующие в процессах активации эндотелия, развитии воспалительных реакций, регуляции миграции и пролиферации гладкомышечных клеток, а также связанные с коагуляцией и фибринолизом [2, 3]. Одним из аспектов индивидуальной генетической предрасположенности к атеросклерозу являются мутации митохондриального генома человека [4, 5]. Ряд исследований подтверждает, что принадлежность человека к той или иной митохондриальной гаплогруппе, определяемой на основе совокупности наследуемых мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК), может влиять на прогрессирование различных мультифакторных заболеваний, в том числе сахарного диабета 2-го типа, рака пищевода и болезни Альцгеймера [6—10]. Так, Palacin и соавторы обнаружили, что принадлежность к гаплогруппе H ассоциирована с ранним инфарктом миокарда в популяции Астурии (север Испании) [11]. Также выявлена повышенная встречаемость гаплогруппы T у лиц, страдающих ишемической болезнью сердца, в популяции Австрии [12]. Ассоциация митохондриальных гаплогрупп с сердечно-сосудистыми заболеваниями атеросклеротического генеза позволяет предположить наличие взаимосвязи однонуклеотидных замен мтДНК, определяющих гаплогруппы, с развитием атеросклероза.

Методика

Обследованная выборка составила 77 чел. (34 мужчины [м] и 43 женщины [ж]) из Москвы и Московской области, со средним возрастом 63,0 лет (м: 60,5, ж: 64,9). 45 участников исследования (м: 23, ж: 22) характеризовались наличием атеросклеротических поражений сонных артерий по результатам ультразвукографического исследования (средний возраст 63,2 лет, м: 60,0, ж: 66,5). Количество условно здоровых доноров составило

32 (м: 11, ж: 21) со средним возрастом 62,7 лет (м: 61,6, ж: 63,2). Артериальная гипертензия, сахарный диабет и перенесенный инфаркт миокарда были критериями исключения при формировании выборки.

Для оценки состояния стенки сонных артерий проводили ультразвукографию высокого разрешения в В-режиме с использованием линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц на ультразвуковом сканере SonoScape SSI-1000 (Китай). Протокол обследования включал сканирование левой и правой сонных артерий, области каротидного синуса, а также наружной и внутренней сонных артерий с фокусировкой на задней стенке артерии в трех фиксированных проекциях — переднебоковой, боковой и заднебоковой. Обследование проводили в положении лежа после 15-минутного отдыха. Предварительные измерения проводили на участке общей сонной артерии длиной 10 мм, противоположащем началу каротидного синуса. Толщину интимо-медиального слоя задней стенки общей сонной артерии определяли как расстояние от ведущего края первой эхогенной зоны до ведущего края второй эхогенной зоны. Среднее значение трех измерений (в переднебоковой, боковой и заднебоковой проекциях) рассматривали как интегральный показатель толщины интимо-медиального слоя. Всю процедуру сканирования записывали на sVHS-видеомагнитофон для последующего анализа с помощью специализированного программного пакета. Результаты ультразвукографического исследования — значения средней толщины интимо-медиального слоя (ТИМС) и наличие атеросклеротических бляшек в бассейне сонных артерий — приведены в табл. 2.

Для характеристики доклинического атеросклероза сонных артерий были использованы пограничные возраст-половые значения ТИМС для жителей Московского региона [13]. При наличии атеросклеротической бляшки со стенозом сонной артерии более 20% или при

Ультразвукографические характеристики сонных артерий в различных возрастных группах

Таблица 1

Возрастная группа	Средняя ТИМС, мкм (кол-во участников)				Доля пациентов с наличием стеноза сосудов более 20%	
	Больные атеросклерозом		Условно здоровые		Больные атеросклерозом	Условно здоровые
	м	ж	м	ж		
До 50 лет	1,03 (4)	—	0,70 (1)	0,58 (1)	0,00	0,00
51—60 лет	1,09 (5)	0,91 (4)	0,71 (3)	0,62 (8)	0,50	0,00
61—70 лет	1,01 (13)	1,04 (13)	0,77 (5)	0,67 (9)	0,62	0,00
Старше 70 лет	0,94 (1)	1,17 (5)	0,79 (2)	0,73 (3)	0,67	0,00

Распространенность основных гаплогрупп митохондриального генома в исследованной выборке, %

Таблица 2

Гаплогруппа	H	U	T	J	I	W	K	M	N	V	D	R
Условно здоровые	31,3	25,0	18,8	12,5	0,0	0,0	3,1	3,1	3,1	3,1	0,0	0,0
Больные атеросклерозом	51,1	15,6	6,7	11,1	4,4	4,4	2,2	0,0	0,0	0,0	2,2	2,2

наличии утолщения интимо-медиального слоя, превышающего границу 75-й перцентили, а также при совокупности этих факторов, лицам присваивалась принадлежность к группе больных доклиническим атеросклерозом. Условно здоровые участники исследования характеризовались значениями ТИМС, не превышающими медианное значение для данной возрастной группы, а также отсутствием атеросклеротических бляшек (для ряда пациентов — наличием стеноза не более 20%).

Забор крови для определения липидных показателей крови и индекса атерогенности производили натощак из локтевой вены, в качестве антикоагулянта использовали 0,1 М Na-ЭДТА (рН = 8,0). Содержание общего холестерина и триглицеридов определяли ферментативным методом с помощью наборов Fluitest (Analyticon Biotechnologies AG, Германия). Содержание холестерина липопротеидов высокой плотности определяли также ферментативным методом после осаждения липопротеидов других классов с помощью преципитирующего реагента Fluitest (Analyticon Biotechnologies AG, Германия). Содержание холестерина липопротеидов низкой плотности определяли по формуле Фридевальда. Липидный индекс атерогенности рассчитывали, как соотношение холестерина липопротеидов низкой плотности к холестерину липопротеидов высокой плотности.

ДНК из замороженной цельной крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К. Концентрацию раствора ДНК в нг/мкл измеряли на наноспектрофотометре IMPLen NanoPhotometr™ с использованием микроюветы LabelGuard™ в режиме «DS DNA» при длине волны 260 нм. Для последующего использования ДНК была разведена до концентрации 20—30 нг/мкл. После выделения тотальной ДНК было проведено обогащение митохондриальной ДНК с использованием набора QiaGen™ REPLI-g Mitochondrial Kit. В 50 мл реакционной смеси было внесено около 50 нг исходной ДНК. Размер полученных фрагментов оценивали с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле, полученная обогащенная фракция копий мтДНК содержала фрагменты размером 10—15 тыс. п.н. (пар нуклеотидов). Концентрацию обогащенной фракции мтДНК оценивали с помощью флуориметрии с использованием прибора QuantiFluor-ST Fluorimeter (Promega, США) и набора для флуориметрии Quant-IT PicoGreen Kit (Invitrogen-Life Technologies, США).

Для проведения высокоэффективного секвенирования митохондриального генома была использована система Roche 454 GS Junior Titanium (Roche Applied Science, США). Из обогащенной мтДНК фракции отбирали 500 нг — количество, необходимое для создания библиотеки фрагментов ДНК и дальнейшего секвенирования. Пробоподготовка для секвенирования была проведена в соответствии с рекомендациями производителя и с

использованием соответствующих приборов и реагентов. Запуск прибора и анализ качества секвенирования проводились посредством программ GS Sequencer и GS Run Browser (Roche Applied Science, США).

Анализ последовательностей митохондриальных ДНК производился с использованием программы GS Reference Mapper (Roche Applied Science, США). Для картирования использовалась Кембриджская эталонная последовательность митохондриального генома человека NC_012920.1 [14]. В результате картирования была получена информация о всех мутациях мтДНК, отличающихся от сравнительной последовательности. Для определения митохондриальных гаплогрупп на основе совокупности мутаций мтДНК использовался сервис MitoTool [15, 16], а также базы данных Mitomap и Phylotree [17, 18].

Статистический анализ данных проводился с использованием программных пакетов Microsoft Excel 2010 и IBM SPSS Statistics v.21.0.

Результаты и обсуждение

Основные параметры, определяющие эффективность секвенирования митохондриального генома для одного образца, имели следующие значения: средняя длина прочтения — $432,8 \pm 4,3$ п.н.; среднее количество прочтений — 2653 ± 317 ; среднее количество нуклеотидов — $1,15 \pm 0,14$ млн п.н.; средний процент картируемых прочтений от общего количества — $16,4 \pm 1,8\%$. Исходя из этих параметров, несмотря на относительно низкий процент картируемых прочтений от их общего количества, можно сделать вывод о том, что при секвенировании было обеспечено в среднем 70-кратное покрытие митохондриального генома, достаточное для высокоточной детекции однонуклеотидных замен.

Возможности секвенирования с использованием технологии Roche 454 позволили максимально точно определить гаплогруппу митохондриального генома, учитывая совокупность всех однонуклеотидных замен на протяжении мтДНК. Среди здоровых лиц были представлены следующие гаплогруппы: H1, H11a1, H15a1, H1a, H1a1, H2a2a1, H49, H4a1a1a, HV5, J1c2r, J1c4, J1c4b, J2a1a1, K1a9, M10a1a2, N1b1a2a, T1a1, T2a1a, T2b, T2b25, T2b3, U2e1b1, U3b, U4a2b, U4d2, U5a2a1, U5a2b1, U7b, U8a1a1b, V1a1; среди лиц с доклиническим атеросклерозом: D4e4, H1, H13a1a1, H1b2, H1bk, H1c, H1e4, H2a1a, H2a1c, H2b, H3h, H4, H46b, H5a1a, H5a1q, H5a2, H6a1a, H85, HV0a1, HV5, I1a1a, I3a, J1b1a1, J1c4, J1c4b, J1d3b, J2a1a1a3, K1c, R1a1a1, T1a1, T2b4, T2e2, U2e1, U2e1b1, U4a1, U5a1b1, U5a2a1b, U5b2b, U8a1a1, W1e, W3a1.

В исследованной выборке гаплогруппы H, U, T и J были наиболее распространенными (85,7% случаев), что соответствует общим данным по российской популяции [19]. Гаплогруппы I, W, R и D были представлены только среди лиц с доклиническим атеросклерозом;

в свою очередь, гаплогруппы N, V и M были обнаружены только среди условно здоровых лиц. При подсчете соотношения шансов для доклинического атеросклероза установлено, что среди наиболее распространенных гаплогрупп принадлежность к гаплогруппе H ассоциирована с повышенным риском атеросклероза ($\chi^2 = 3,97$, $p = 0,046$; OR = 2,76, 95%CI 1,01—7,58), а принадлежность к гаплогруппам T и U — со сниженным риском (OR = 0,31 и OR = 0,57, соответственно). Полученные данные по гаплогруппе H согласуются с исследованием раннего инфаркта миокарда, проведенным Palacin и соавторами на популяции Астурии [11]. Однако следует учитывать, что в астурийской популяции гаплогруппа H встречается заметно чаще, чем в российской (54,1% против 41,2%), а гаплогруппа T — заметно реже (1,1% против 9,2%). Результаты данного исследования расходятся с данными, полученными на популяции Австрии, где наблюдается тенденция к повышенному риску ИБС у лиц с гаплогруппой T. Это может быть объяснено недостаточным размером исследованной выборки, а также тем, что бессимптомный атеросклероз не имеет клинических проявлений ИБС.

Не было обнаружено достоверных различий между значениями липидных характеристик крови, в частности липидного индекса атерогенности, как между лицами, принадлежащими к различным гаплогруппам, так и между группами с наличием и отсутствием доклинического атеросклероза. Тем не менее, среднее значение индекса атерогенности в группе больных доклиническим атеросклерозом было несколько повышено по сравнению с контрольной группой ($3,02 \pm 1,65$ против $2,7 \pm 1,10$).

Таким образом, результаты данного пилотного исследования говорят о том, что принадлежность к митохондриальной гаплогруппе H ассоциирована с повышенным риском доклинического атеросклероза. В целом, повышенный риск атеросклероза и его клинических проявлений (например, инфаркта миокарда) у представителей гаплогруппы H может быть связан с различиями в функциональной активности митохондрий. Известно, что повышенный окислительный стресс играет немаловажную роль в патогенезе атеросклероза и его клинических последствий [20]. Для митохондрий, принадлежащих к гаплогруппе H, была обнаружена повышенная функциональная активность по сравнению с другими гаплогруппами на основании анализа интенсивности окислительного фосфорилирования и активности цитрат-синтазы [21].

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение №14.616.21.0030, уникальный идентификатор RFMEFI61614X0030.

Список литературы

1. Шальнова С.А., Деев А.Д. Ишемическая болезнь сердца в России: распространенность и лечение (по данным клинико-эпидемиологических исследований). *Терапевтический архив*. 2011; 1: 7-12.
2. Marian A.J. Genetic markers: genes involved in atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk*. 1997; 4 (5-6): 333-9.
3. Szabo G.V. The role and importance of gene polymorphisms in the development of atherosclerosis. *Interv Med Appl Sci*. 2013; 5 (1): 46-51. doi: 10.1556/IMAS.5.2013.1.10.
4. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Salonen J.T., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mitochondrial genetic variation with carotid atherosclerosis. *PLoS One*. 2013; 8 (7). doi: 10.1371/journal.pone.0068070.
5. Sazonova M., Budnikov E., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A., Orekhov A. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. *Atherosclerosis*. 2009; 204 (1): 184-90.
6. Лебкова Н.П., академик РАЕН Клембовский А.И. Эволюционные проблемы митохондриальной патологии. *Патогенез*. 2008; 6 (4): 24-30.
7. Castro M.G., Huerta C., Reguero J.R., Soto M.I., Domínech E., Alvarez V. et al. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2006; 112 (2): 202-6.
8. Feder J., Ovadia O., Blech I., Cohen J., Wainstein J., Harman-Boehm I. et al. Parental diabetes status reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes. *BMC Medical Genetics*. 2009; 10 (60). doi: 10.1186/1471-2350-10-60.
9. Li X.Y., Guo Y.B., Su M., Cheng L., Lu Z.H., Tian D.P. Association of mitochondrial haplogroup D and risk of esophageal cancer in Taihang Mountain and Chaoshan areas in China. *Mitochondrion*. 2011; 11 (1): 27-32.
10. Van der Walt J.M., Dementieva Y.A., Martin E.R., et al. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neuroscience Letters*. 2004; 365 (1): 28-32.
11. Palacin M., Alvarez V., Martin M., Diaz M., Corao A.I., Alonso B. et al. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion*. 2011; 11 (1): 176-81.
12. Kofler B., Mueller E.E., Eder W., Stanger O., Mair R., Weger M. et al. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Medical Genetics*. 2009; 10 (35). doi: 10.1186/1471-2350-10-35.
13. Собенин И.А., Сурнин С.А., Карагодин В.П., Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Чупракова О.В. и др. Варибельность показателя толщины комплекса интима-медиа общих сонных артерий в московской городской популяции среди лиц без клинических проявлений атеросклероза. *Терапевтический архив*. 2011; 12: 58-62.
14. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowers R.N., Turnbull D.M., Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999; 23: 147.
15. Fan L., Yao Y.-G. An update to MitoTool: Using a new scoring system for faster mtDNA haplogroup determination. *Mitochondrion*. 2013; 13: 360-3.
16. Fan L., Yao Y.-G. MitoTool: A web server for the analysis and retrieval of human mitochondrial DNA sequence variations. *Mitochondrion*. 2011; 11: 351-6.
17. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2013.
18. van Oven M., Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*. 2009; 30 (2). E386-E394. <http://www.phylotree.org>. doi:10.1002/humu.20921.

19. *Distribution of European mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups by region in percentage*. URL: <http://www.mtdna.eu/> (дата обращения 11.12.2014).

20. Madamanchi N.R., Runge M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*. 2007; 100 (4): 460-73.

21. Larsen S., Diez-Sanchez C., Rabol R., Ara I., Dela F., Helge J.W. Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1837 (2): 226-31.

Поступила 17.12.15

References

1. Shalnova S.A., Deev A.D. Coronary heart disease in Russia: prevalence and treatment (according to clinical and epidemiological studies). *Therapeutic Archives*. 2011; 1: 7-12. (in Russian)

2. Marian A.J. Genetic markers: genes involved in atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk*. 1997; 4 (5-6): 333-9.

3. Szabo G.V. The role and importance of gene polymorphisms in the development of atherosclerosis. *Interv Med Appl Sci*. 2013; 5 (1): 46-51. doi: 10.1556/IMAS.5.2013.1.10.

4. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Salonen J.T., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mitochondrial genetic variation with carotid atherosclerosis. *PLoS One*. 2013; 8 (7). doi: 10.1371/journal.pone.0068070.

5. Sazonova M., Budnikov E., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A., Orekhov A. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. *Atherosclerosis*. 2009; 204 (1): 184-90.

6. Lebkova N.P., academician of Natural Sciences Klembovsky A.I. Evolutionary problems of mitochondrial pathology. *Pathogenesis*. 2008; 6 (4): 24-30. (in Russian).

7. Castro M.G., Huerta C., Reguero J.R., Soto M.I., Domínguez E., Alvarez V. et al. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2006; 112 (2): 202-6.

8. Feder J., Ovadia O., Blech I., Cohen J., Wainstein J., Harman-Boehm I. et al. Parental diabetes status reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes. *BMC Medical Genetics*. 2009; 10 (60). doi: 10.1186/1471-2350-10-60.

9. Li X.Y., Guo Y.B., Su M., Cheng L., Lu Z.H., Tian D.P. Association of mitochondrial haplogroup D and risk of esophageal cancer in Taihang Mountain and Chaoshan areas in China. *Mitochondrion*. 2011; 11 (1): 27-32.

10. Van der Walt J.M., Dementieva Y.A., Martin E.R., et al. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neuroscience Letters*. 2004; 365 (1): 28-32.

11. Palacin M., Alvarez V., Martin M., Diaz M., Corao A.I., Alonso B. et al. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion*. 2011; 11 (1): 176-81.

12. Kofler B., Mueller E.E., Eder W., Stanger O., Maier R., Weger M. et al. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Medical Genetics*. 2009; 10 (35). doi: 10.1186/1471-2350-10-35.

13. Sobenin I.A., Surnin S.A., Karagodin V.P., Myasovdova V.A., Kirichenko T.V., Chuprakova O.V. et al. Variability of intima-media thickness of common carotid arteries index in the Moscow city population among persons without clinical manifestations of atherosclerosis. *Therapeutic Archives*. 2011; 12: 58-62. (in Russian)

14. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowers R.N., Turnbull D.M., Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999; 23: 147.

15. Fan L., Yao Y.-G. An update to MitoTool: Using a new scoring system for faster mtDNA haplogroup determination. *Mitochondrion*. 2013; 13: 360-3.

16. Fan L., Yao Y.-G. MitoTool: A web server for the analysis and retrieval of human mitochondrial DNA sequence variations. *Mitochondrion*. 2011; 11: 351-6.

17. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2013.

18. van Oven M., Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*. 2009; 30 (2). E386-E394. <http://www.phylotree.org>. doi:10.1002/humu.20921.

19. *Distribution of European mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups by region in percentage*. URL: <http://www.mtdna.eu/> (дата обращения 11.12.2014).

20. Madamanchi N.R., Runge M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*. 2007; 100 (4): 460-73.

21. Larsen S., Diez-Sanchez C., Rabol R., Ara I., Dela F., Helge J.W. Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1837 (2): 226-31.

Received 17.12.15

Сведения об авторах:

Сазонова М.А. — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

Хасанова Э.Б. — мл. науч. сотр. ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, e-mail: zukhra@yandex.ru

Синёв В.В. — аспирант, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, e-mail: centaureaceanus@mail.ru

Собенин И.А. — д. мед. наук, вед. науч. сотр. отдела сердечно-сосудистой патологии Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: igor.sobenin@gmail.com

Орехов А.Н. — д. биол. наук, проф., руководитель лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: a.h.orexob@gmail.com

Постнов А.Ю. — д. мед. наук, руководитель отдела сердечно-сосудистой патологии Института клинической кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, e-mail: a.postnov@cardio.ru

Сазонова М.А.^{1,2}

Ассоциация мутаций митохондриального генома с липофиброзными бляшками интимы аорты человека

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Российская федерация, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15 а

Атеросклероз лежит в основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний, которые лидируют среди причин смерти людей в XXI веке. Одной из возможных причин атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека. С целью выявления мутаций, ассоциированных с атеросклерозом, нами был проведен анализ 42 митохондриальных мутаций, выявленных при различных патологиях. Объектом исследования были лица, погибшие в результате несчастного случая или внезапной смерти. Материалом исследования служили участки нормальной интимы и липофиброзные бляшки 7 аорт, ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. ПЦР-фрагменты ДНК, содержащие область исследуемых мутаций, были проанализированы оригинальным методом количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. Этот метод был разработан в нашей лаборатории на основе технологии пиросеквенирования. Статистическая обработка данных была проведена с помощью программы IBM SPSS Statistics 21.0 и методом бутстрэп-анализа. Из 42 исследованных мутаций сорок оказались гетероплазмичными, а две — гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе. Разработанный метод прямой количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома позволил обнаружить три новые мутации — 652delG, 961delC и 5132insAA. Выявлено, что 11 митохондриальных мутаций (652insG, T3336C, C3256T, G14459A, G14846A, G15059A, 652delG, A1555G, C5178A, G13513A и G12315A), принадлежащих восьми митохондриальным генам: рРНК 12S, тРНК — Leu (кодон узнавания UUR) и тРНК — Leu (кодон узнавания CUN), субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы; и цитохрома В, потенциально ассоциированы с атеросклерозом, т.к. от 29% (2 из 7 аорт) до 86% (6/7) исследованных аорт имеют значительную разницу в уровне гетероплазмы данных мутаций в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной интимой аорт.

Ключевые слова: митохондриальный геном, мутация, уровень гетероплазмы, интимы, ген, аорта, липофиброзная бляшка, атеросклероз

Sazonova M.A.^{1,2}

Association of mitochondrial genome mutations with lipofibrous plaques in human aortic intima

¹ — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology»,

8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, The Russian Federation, tel. +7 (499) 151-17-56, niiopp@mail.ru

² — FSBI « Russian Cardiology Research-and-Production Complex» Ministry Of Health products therefore,

15a, 3rd Cherepkovskaya street, Moscow, 121552, The Russian Federation, tel. +7 (499) 140-93-36, info@cardioweb.ru

Atherosclerosis is a basis of development for many cardiovascular diseases, which are leading causes of death among people in the 21-st century. One of possible causes of atherosclerosis may be somatic mutations of human mitochondrial genome. In order to identify mutations associated with atherosclerosis, we analyzed 42 mitochondrial mutations found in various pathologies. The subject of the study were individuals who died as a result of an accident or a sudden death. The material for the investigation were segments of intima from 7 aortas both normal and with lipofibrous plaques. DNA was isolated by a method of phenol-chloroform extraction. PCR-fragments of DNA containing the region of investigated mutations were analyzed by an original method of quantitative assessment of mitochondrial genome mutant alleles. This method was developed in our laboratory on the basis of pyrosequencing technology. Statistical data processing was performed using IBM SPSS Statistics 21.0 and by bootstrap analysis. 40 of 42 studied mutations were heteroplasmic and two were homoplasmic according to the absence of a mutant allele in atherosclerosis. The developed method of direct quantitative assessment of mitochondrial genome mutant alleles helped us to find three new mutations: 652delG, 961delC and 5132insAA. It was found that 11 of mitochondrial mutations (652insG, T3336S, C3256T, G14459A, G14846A, G15059A, 652delG, A1555G, C5178A, G13513A and G12315A), belonging to eight mitochondrial genes: rRNA 12S, tRNA — Leu (codon recognition UUR) and tRNA — Leu (codon recognition CUN), subunit 1, 2, 5 and 6 of NADH dehydrogenase and cytochrome B are potentially

associated with atherosclerosis, because from 29% (2 of 7 aortas) to 86% (6/7) investigated aortas have a significant difference in the heteroplasmy level of these mutations in lipofibrous plaques compared to normal aortic intima.

Key words: mitochondrial genome, mutation, heteroplasmy level, intima, gene, aorta, lipofibrous plaque, atherosclerosis

Атеросклероз лежит в основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний, которые лидируют среди причин смерти людей в XXI веке [1—10].

Одной из возможных причин атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека [11—17].

Митохондриальная ДНК человека представляет собой кольцевую двуцепочечную молекулу и содержит 37 генов: 22 гена транспортных РНК, 2 гена рибосомальных РНК и 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи: цитохрома В, АТФазы, цитохром-С-оксидазы, NADH-дегидрогеназы. В каждой митохондрии содержится несколько копий ее генома. Митохондриальный геном наследуется по материнскому типу. Он отличается выраженной нестабильностью, поэтому в нем нередки соматические мутации. Пенетрантность и экспрессивность таких мутаций варьируют в широких пределах между родственниками (по материнской линии) и зависят от многих факторов, но главным образом, от генотипа и уровня гетероплазмы (смесь мутантных и нормальных молекул ДНК). Поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями людей необходима не только качественная (есть мутация или нет), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома (уровень гетероплазмы).

В настоящей работе был проведен пилотный анализ уровня гетероплазмы 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и участках нормальной интимы аорты человека.

Методика

Исследуемые мутации

Мутации митохондриального генома, исследованные в настоящей работе, приведены в табл. 1. Алгоритм исследования включал выделение ДНК из липофиброзных бляшек и участков нормальной интимы аорты, получение и пиросеквенирование ПЦР-фрагментов, содержащих область исследованных мутаций.

Материалы

Объектом исследования были лица, погибшие в результате несчастного случая или внезапной смерти.

Материалом исследования служили образцы нормальной интимы и липофиброзные бляшки 7 аорт.

Методы

Выделение тотальной ДНК из образцов ткани аорты (10 мкг) проводилось методом фенол-хлороформной экстракции. Для получения фрагментов митохондриальной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры, приведенные в табл. 2.

В табл. 3 представлены условия для проведения полимеразной цепной реакции.

Для анализа мутаций использовалась технология пиросеквенирования митохондриального генома [38—41]. Праймеры для пиросеквенирования представлены в табл. 4. Последовательность праймеров была подобрана с помощью программы Primer3 [42].

На основе технологии пиросеквенирования в нашей лаборатории был разработан оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома [43—45]. Количественная оценка дефектного аллеля проводилась на основании анализа высоты пиков пирограммы в исследуемой области одноцепочечного ПЦР-фрагмента митохондриального генома.

Статистическая обработка данных

Для статистической оценки полученных результатов использовали программу IBM SPSS Statistics 21.0 и бутстрэп-анализ [46, 47].

Результаты и обсуждение

Цель исследования интимы аорт индивидов

Полагают, что одним из объяснений локальности, а скорее фокальности, атеросклеротических поражений интимы сосудов может быть повреждающее действие гемодинамического стресса. Однако гемодинамический стресс не может объяснить сосуществования в артерии нормальных и пораженных атеросклерозом участков в области, которая подвержена примерно одинаковому воздействию гемодинамического стресса. В связи с системным действием традиционных факторов риска ССЗ, данные факторы тоже не являются объяснением фокальности атеросклеротических поражений. В последнее время все чаще высказывается предположение, что локальность атеросклероза может быть объяснена генетическими факторами.

Для корреспонденции: Сазонова М.А. — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

Локализация исследуемых мутаций в митохондриальном геноме

№ п/п	Мутация	Ген
1	652delG	Ген рРНК 12S
2	652insG	
3	T716G	
4	A750G	
5	961insC	
6	961delC	
7	A1555G	
8	C3256T	Ген тРНК-Leu (кодон узнавания UUR)
9	T3258C	
10	T3271C	
11	A3280G	
12	C3285T	
13	G3316A	Ген субъединицы 1 NADH-дегидрогеназы
14	T3336C	Ген субъединицы 2 NADH-дегидрогеназы
15	5132insAA	
16	C5178A	Ген тРНК-Trp
17	G5540A	
18	T5692C	Ген тРНК-Asn
19	T5814C	Ген тРНК-Cys
20	C6489A	Ген субъединицы 1 цитохром-С-оксидазы
21	T8362G	Ген тРНК- Lys
22	G8363A	
23	T8993G	
24	T8993C	
25	G9379A	Ген субъединицы 3 цитохром-С-оксидазы
26	9480del15	
27	9537insC	
28	G12315A	Ген тРНК-Leu (кодон узнавания CUN)
29	G13513A	Ген субъединицы 5 NADH-дегидрогеназы
30	G14459A	Ген субъединицы 6 NADH-дегидрогеназы
31	C14482G	
32	C14482A	
33	T14484C	
34	T14487C	
35	T14709C	Ген тРНК-Glu
36	G14846A	Ген цитохрома В
37	G15059A	
38	G15084A	
39	C15452A	
40	del 15498 to 15521	
41	G15723A	
42	G15762A	

Праймеры для ПЦР [18—31]

Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР
652delG	TAGACGGGCTCACATCAC (621 — 638)	bio-GGGGTATCTAATCCCAGTTTGGT (1087 — 1064)
652insG		
T716G		
A750G		
961insC		
961delC		
A1555G	TAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGGCAA (1326 — 1355)	bio-GTAAGGTGGAGTGGGTTTGGG (1704 — 1684)
C3256T	bio-AGGACAAGAGAAAATA AGGCC (3129 — 3149)	ACGTTGGGGCCTTTGCGTAG (3422 — 3403)
T3258C		
T3271C		
A3280G		
C3285T		
G3316A		
T3336C		
5132insAA		
C5178A	ACACTCATCACCTTACCA (5451 — 5469)	bio-CGAATAAGGAGGCTTAGAG (6016 — 5998)
G5540A		
T5692C		
T5814C		
C6489A	GGGCCATCAATTCATCACAACAA (6382 — 6405)	bio-CAGCAGCTAGGACTGGGAGA GATAGGA (6516 — 6490)
T8362G	bio-AGATTAAGAGAACC AACACCTCTTTACA (8333 — 8360)	GGGGTAATTATGGTGGGCC (8410 — 8391)
G8363A		
G9379A	bio-CACTAACCATATACCA ATGA (9358 — 9377)	CTCCTGATGCGAGTAATACGGATGT(9630 — 9605)
9480del115		
9537insC		
G12315A	bio-CTCATGCCCCATGT CТАА (12230 — 12249)	TTACTTTTATTTGGAGTTGCAC (12337 — 12317)
G13513A	CCTCACAGGTTTCTACTCCAAA (13491 — 13512)	bio-AAGTCCTAGGAAAGTGACAG CGAGG (13825 — 13806)
G14459A	CAGCTTCCTACACTATTAAGT (14303 — 14334)	bio-GTTTTTTTAAATTTATTTAGGG GG (14511 — 14489)
C14482G		
C14482A		
T14484C		
T14487C		
T14709C	bio-CATTATTCTCGCACG GACT (14671 — 14689)	GCTATAGTTGCAAGCAGGAG (15120 — 15100)
G14846A		
G15059A		
G15084A		
C15452A	bio-ACCTTCCACCCTTAC TACA (15401 — 15419)	TGTAGGCGAATAGGAAATATC (15581 — 15561)
del 15498 to 15521		
G15723A	GCCCCGAATGATATTCCTAT (15553 — 15572)	bio-GCTTTGGGTGCTAATGGTGG (15996 — 15977)
G15762A		

Условия для ПЦР фрагментов митохондриального генома [18—37]

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl ₂ в буфере для ПЦР	Денатурация, °С	Отжиг, °С	Синтез, °С
G5540A, T5692C, T5814C	566 п.н.	2,5 мМ	94°	62°	72°
652delG, 652insG T716G, A750G, 961insC, 961delC	467 п.н.	2,5 мМ	94°	60°	72°
5132insAA, C5178A	383 п.н.				
C3256T, T3258C, T3271C, A3280G, C3285T, G3316A, T3336C	294 п.н.	2,5 мМ			
T8993G, T8993C	180 п.н.	1,5 мМ			
G9379A, 9480del115, 9537insC, 9537delC	273 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
G13513A	335 п.н.	1,5 мМ			
T14709C, G14846A, G15059A, G15084A	450 п.н.				
C15452A, del 15498 to 15521	181 п.н.	2,5 мМ			
G15723A, G15762A	444 п.н.	1,5 мМ			
A1555G	379 п.н.	2,5 мМ			
C6489A	135 п.н.	1,5 мМ			
G12315A	108 п.н.	2,5 мМ			
G14459A, C14482G, C14482A, T14484C, T14487C	209 п.н.	1,5 мМ	94°	50°	72°
T8362G, G8363A	78 п.н.	1,5 мМ	94°	45°	72°

Праймеры для пиросиквенса

№ п/п	Мутация	Праймер для сиквенса
1	652delG	CCCATAAACAAATA (639 — 651)
2	652insG	CCCATAAACAAATA (639 — 651)
3	T716G	GCATCCCCGTTCC (702 — 714)
4	A750G	TCACCACGATCAAAA (734 — 748)
5	961insC	AAAGAGTGTTTTAGATCA (939 — 956)
6	961delC	AAAGAGTGTTTTAGATCA (939 — 956)
7	A1555G	ACGCATTTATATAGAGGA (1537 — 1554)
8	C3256T	AAGAAGAGGAATTGA (3300 — 3286)
9	T3258C	
10	T3271C	
11	A3280G	
12	C3285T	
13	G3316A	GGAGTAGGAGGTTGG (3331 — 3317)
14	T3336C	TGCGATTAGAATGGGTAC (3354 — 3337)
15	5132insAA	TCGTGGTGCTGGAG (5148 — 5135)
16	C5178A	ATTAAGGGTGTTAGTCATGT (5200 — 5181)
17	G5540A	TAAATACAGACCAAGA (5524 — 5539)
18	T5692C	ACCCACAAACACTTA (5676 -5690)
19	T5814C	TTGCAATTCAATATGAAAA (5795 — 5813)
20	C6489A	AATCACAGCAGTCCTACT (6470 — 6487)
21	T8362G	TTTAGTTGGGGCATT (8379 — 8364)
22	G8363A	
23	T8993G	CATTCAACCAATAGCC (8976 — 8991)
24	T8993C	
25	G9379A	TCTCGTGTTACATCGC (9397 — 9382)
26	9480del15	TGGTAAAAGGCTCAGAA (9514 — 9498)
27	9537insC	CCAGTGCCCTCCTAAT (9554 — 9539)
28	G12315A	TTTGAGTTGCAC (12328 — 12316)
29	G13513A	AGGTTTCTACTCCAA (13497 — 13511)
30	G14459A	GATACTCCTCAATAGCCA (14439 — 14456)
31	C14482G	ATATCCAAGACAAC (14467 — 14481)
32	C14482A	
33	T14484C	
34	T14487C	
35	T14709C	ATACAACGATGGTTTTTC (14727 — 14710)
36	G14846A	GCGCCAAGGAGTGA (14861 — 14848)
37	G15059A	TTTCTGAGTAGAGAAATGAT (15080 — 15061)
38	G15084A	GGATAATGCCGATGTT (15101 — 15086)
39	C15452A	ATGTCATTAAGGAGAGAA (15470 — 15453)
40	del 15498 to 15521	GTGTTTAAGGGGTTGG (15537 — 15522)
41	G15723A	CACTAAGCCAATCACTTT (15701 — 15719)
42	G15762A	TCATTCTAACCTGAATCG (15744 — 15761)

Согласно моноклональной гипотезе возникновения и развития атеросклероза, в единственной гладкомышечной клетке возникает соматическая мутация, что приводит к ее неограниченной пролиферации, возникновению моноклона, экспансии в сосудистую стенку, утолщению интимы-медии, возникновению и росту атеросклеротической бляшки. Следует подчеркнуть, что интенсивность возникновения соматических мутаций ядерного генома является невысокой, поэтому не может служить объяснением возникновения и развития атеросклероза. В то же время митохондриальный геном менее стабилен, соматические мутации в нем возникают во много раз чаще. Соответственно, гораздо чаще могут появиться клетки интимы артерий, имеющие мутации митохондриального генома, обладающие, вследствие этого, неограниченной пролиферацией. Спонтанное появление подобных мутантных гладкомышечных клеток в различных участках интимы сосудов может служить объяснением фокальности атеросклеротических поражений. Кроме того, есть вероятность избирательного накопления мутантных митохондриальных хромосом, переданных от матери потомкам, при попадании клетки в неблагоприятные условия. Это может произойти во время митоза, когда, при случайном неравномерном распределении копий митохондриального генома, мутантные копии попадают, в основном, только в одну дочернюю клетку.

В результате накопления мутантных геномов в клетках возможны отличия уровня гетероплазмы между пораженными атеросклерозом и непораженными участками интимы аорты. С целью проверки данного предположения был проведен пилотный анализ уровня гетероплазмы 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и нормальных участках сосудистой стенки аорт.

Детекция уровня гетероплазмы 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорт

Анализ научной литературы позволил составить список из 42 мутаций митохондриального генома, для которых теоретически могла бы наблюдаться ассоциация уровня гетероплазмы с атеросклерозом. С помощью разработанного в нашей лаборатории метода прямой количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома проведен пилотный анализ данных мутаций в образцах ДНК из липофиброзных бляшек и участков нормальной интимы 7 аорт. Следует отметить, что при анализе данных пирогамм по известным мутациям с помощью нашего метода в образцах интимы аорты удалось выявить три новые, ранее не описанные мутации — 652delG, 961delC и 5132insAA.

Сорок из сорока двух исследованных мутаций оказались гетероплазмичными (652delG, T716G, A750G, 961delC, A1555G, C3256T, T3258C, T3271C, A3280G, C3285T, G3316A, T3336C, 5132insAA, C5178A, G5540A, T5692C, T5814C, C6489A, T8993G, T8993C, G9379A, 9480del15, 9537delC, G12315A, G13513A, G14459A, C14482A, C14482G, T14484C, T14487C, T14709C, G14846A, G15059A, 652insG, 961insC, G15084A, 5132delAA, del15498 to 15521, C15452A и G15762A), а две (T8362G и G8363A) — гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе.

Сравнение величины гетероплазмы в нормальных и атеросклеротических участках проводили методами непараметрической статистики с использованием рангового теста Уилкоксона (табл. 5).

Согласно ранговому тесту Уилкоксона было выявлено 18 мутаций, у которых арифметическая разница между количеством положительных и отрицательных рангов была не менее 2, направление связи совпадало как по среднему значению ранга, так и по суммарным рангам. Разница между значениями одного из видов рангов (среднего или суммарного) была не менее двухкратной. Такими мутациями оказались 652delG, T716G, A1555G, C3256T, G3316A, C3336T, 5132delAA, C5178A, C6489A, G9379A, 9480del15, G12315A, G13513A, G14459A, C14482G, T14487C, G14846A, G15059A.

В то же время, корреляционный анализ, проведенный методом бутстрэп, показал, что мутации 652delG, C3256T, G12315A, G14459A и G15059A высокодостоверно ассоциированы с липофиброзной бляшкой аорты ($p \leq 0,05$), а G13513A и G14846A — значимо на уровне $p \leq 0,1$. Мутации A1555G и C5178A являются антиатерогенными по отношению к липофиброзной бляшке на уровне значимости $p \leq 0,05$ (табл. 6).

Примеры достоверности отличий уровня гетероплазмы мутации G14846A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт представлены на блочных диаграммах (рис. 1—3).

Помимо формального статистического подхода, был использован такой подход, при котором в качестве критерия использовалась частота выявления различий между показателями гетероплазмы в нормальных и атеросклеротических поражениях в образцах, полученных от одного и того же донора аутопсийного материала.

Обнаружено 11 митохондриальных мутаций, принадлежащих митохондриальным генам: рРНК 12S; тРНК-Leu (кодон узн.UUR); тРНК-Leu (кодон узнавания CUN); субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы; и цитохрома В, которые ассоциированы с липофиброзными бляшками.

Сравнение уровня гетероплазии 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзной бляшке и нормальной интиме по ранговому тесту Уилкоксона

Мутации	Вид ранга	Количество рангов	Средний ранг	Суммарный ранг
1	2	3	4	5
652delG	Отрицательный	0	0,00*	0,00*
	Положительный	5	3,00*	15,00*
	Нейтральный	2		
652insG	Отрицательный	2	2,50	5,00
	Положительный	2	2,50	5,00
	Нейтральный	3		
T716G	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	0	0,00*	0,00*
	Нейтральный	5		
A750G	Отрицательный	2	4,50	9,00
	Положительный	4	3,00	12,00
	Нейтральный	1		
961insC	Отрицательный	3	2,67	8,00
	Положительный	3	4,33	13,00
	Нейтральный	1		
961delC	Отрицательный	1	1,00	1,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	6		
A1555G	Отрицательный	4	2,50*	10,00*
	Положительный	0	0,00*	0,00*
	Нейтральный	3		
C3256T	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	5	6,00*	42,00*
	Нейтральный	0		
T3258C	Отрицательный	1	6,00	6,00
	Положительный	5	3,00	15,00
	Нейтральный	1		
T3271C	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	1	1,00	1,00
	Нейтральный	6		
A3280G	Отрицательный	1	1,50	1,50
	Положительный	2	2,25	4,50
	Нейтральный	4		
C3285T	Отрицательный	2	3,25	6,50
	Положительный	4	3,63	14,50
	Нейтральный	1		
G3316A	Отрицательный	1	1,50*	1,50*
	Положительный	4	3,38*	13,50*
	Нейтральный	2		
T3336C	Отрицательный	1	2,00*	4,00*
	Положительный	3	4,00*	6,00*
	Нейтральный	3		

Таблица 5 (продолжение)

1	2	3	4	5
5132insAA	Отрицательный	3	3,00	9,00
	Положительный	2	3,00	6,00
	Нейтральный	2		
5132delAA	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	2	3,50*	7,00*
	Нейтральный	3		
C5178A	Отрицательный	4	4,00*	11,00*
	Положительный	1	2,75*	4,00*
	Нейтральный	2		
G5540A	Отрицательный	4	4,00	16,00
	Положительный	3	4,00	12,00
	Нейтральный	0		
T5692C	Отрицательный	4	3,00	12,00
	Положительный	2	4,50	9,00
	Нейтральный	1		
T5814C	Отрицательный	2	1,50	3,00
	Положительный	1	3,00	3,00
	Нейтральный	4		
C6489A	Отрицательный	4	3,38*	13,50*
	Положительный	1	1,50*	1,50*
	Нейтральный	2		
T8362G	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
G8363A	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
T8993G	Отрицательный	5	3,40	17,00
	Положительный	2	5,50	11,00
	Нейтральный	0		
T8993C	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
G9379A	Отрицательный	2	2,25*	4,50*
	Положительный	5	4,70*	23,50*
	Нейтральный	0		
9480del15	Отрицательный	3	2,33*	7,00*
	Положительный	3	4,67*	14,00*
	Нейтральный	1		
9537delC	Отрицательный	2	4,00	8,00
	Положительный	4	3,25	13,00
	Нейтральный	1		
G12315A	Отрицательный	1	1,00*	1,00*
	Положительный	5	4,00*	20,00*
	Нейтральный	1		
G13513A	Отрицательный	1	3,58*	6,50*
	Положительный	6	6,50*	21,50*
	Нейтральный	0		

Таблица 5 (окончание)

1	2	3	4	5
5132insAA	Отрицательный	3	3,00	9,00
G14459A	Отрицательный	2	2,00*	4,00*
	Положительный	3	3,67*	11,00*
	Нейтральный	2		
C14482C	Отрицательный	4	4,00	16,00
	Положительный	2	2,50	5,00
	Нейтральный	1		
C14482G	Отрицательный	1	1,00*	1,00*
	Положительный	3	3,00*	9,00*
	Нейтральный	3		
T14484C	Отрицательный	1	2,00	2,00
	Положительный	2	2,00	4,00
	Нейтральный	4		
T14487C	Отрицательный	2	2,00*	4,00*
	Положительный	4	4,25*	17,00*
	Нейтральный	1		
T14709C	Отрицательный	2	3,25	6,50
	Положительный	4	3,63	14,50
	Нейтральный	1		
G14846A	Отрицательный	2	2,25*	4,50*
	Положительный	4	4,13*	16,50*
	Нейтральный	1		
G15059A	Отрицательный	0	0,00*	0,00*
	Положительный	5	3,00*	15,00*
	Нейтральный	2		
G15084A	Отрицательный	1	2,00	2,00
	Положительный	1	1,00	1,00
	Нейтральный	5		
del14598to15521	Отрицательный	2	2,25	4,50
	Положительный	2	2,75	5,50
	Нейтральный	3		
C15452C	Отрицательный	2	4,75	9,50
	Положительный	4	2,88	11,50
	Нейтральный	1		
G15762A	Отрицательный	3	2,33	7,00
	Положительный	2	4,00	8,00
	Нейтральный	2		

Примечание. * — более чем двукратное различие между положительными и отрицательными значениями рангов.

Таблица 6

Бутстрэп-анализ коэффициента корреляции между уровнем гетероплазии и наличием липофиброзной бляшки

Мутация	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость (двусторонняя)
652delG	0,485**	0,012**
652insG	0,075	0,186
A1555G	-0,401**	0,001**
C3256T	0,608**	0,001**
T3336C	0,086	0,175
C5178A	-0,302**	0,024**
G12315A	0,401**	0,042**
G13513A	0,335*	0,097*
G14459A	0,470**	0,015**
G14846A	0,315*	0,101*
G15059A	0,436**	0,026**

Примечание. * — высокодостоверная корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками ($p \leq 0,05$); ** — корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками значима на уровне $p \leq 0,1$.

Данные по образцам аорт, имеющих значительные отличия в проценте гетероплазии по данным мутациям в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной сосудистой тканью, представлены в табл. 7.

Как видно из табл. 7, по мутациям 652insG и T3336C такие отличия имеются в 29% аорт; по мутациям C3256T, G14459A, G14846A и G15059A — в 43%. Более половины образцов имеют значительные отличия в проценте гетероплазии по мутациям 652delG, A1555G и C5178A — в 57%. И, наконец, в наибольшем количестве липофиброзных бляшек преобладают, по сравнению с нормальной интимой, мутации G12315A и G13513A — в 71% и 86% (соответственно).

Таким образом, при количественной оценке мутантного аллеля митохондриального генома обнаружены значительные отличия процента гетероплазии по 11 мутациям между образцами из липофиброзной бляшки и нормальной интимы аорты.

Заключение

В настоящем пилотном исследовании впервые были получены данные о том, что различные участки интимы аорты, как нормальной, так и имеющей атеросклеротические поражения различной степени тяжести, могут различаться между собой по уровню гетероплазии мутантного аллеля митохондриального

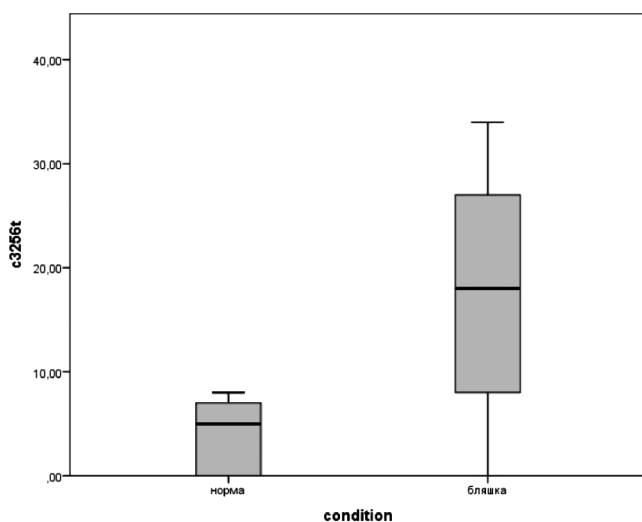


Рис. 1. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации C3256T в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме.

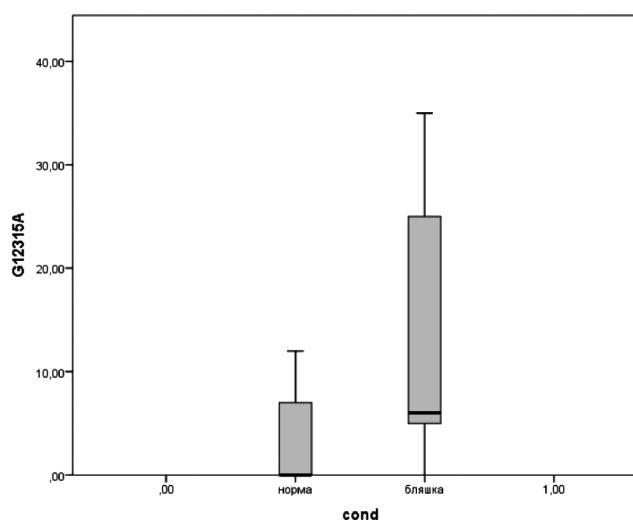


Рис. 2. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации G12315A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме.

Сравнение процента 11 митохондриальных мутаций в атеросклеротических бляшках и нормальной интиме аорта

Ген	Мутация	№ аорты	Норма	Бляшка
12S рРНК	652delG	A1	0	2
		A2	0	17
		A3	4	22
		A5	2	28
	652insG	A6	0	9
		A7	0	8
	A1555G	A1	14	11
		A2	15	7
		A3	54	8
		A5	19	7
тРНК — Leu (кодон uzn.UUR)	C3256T	A1	8	18
		A3	11	22
		A5	12	27
		A6	13	34
Субъединицы 1 NADH дегидрогеназы	T3336C	A1	3	6
		A3	0	17
Субъединицы 2 NADH дегидрогеназы	C5178A	A2	14	7
		A3	14	8
		A5	10	5
		A6	31	18
тРНК — Leu (кодон узнавания CUN)	G12315A	A1	8	35
		A2	0	5
		A3	0	6
		A4	0	15
		A5	12	35
Субъединицы 5 NADH дегидрогеназы	G13513A	A1	45	60
		A2	20	30
		A3	20	40
		A4	15	25
		A6	45	60
		A7	30	45
Субъединицы 6 NADH дегидрогеназы	G14459A	A3	2	4
		A5	2	10
		A6	0	53
Цитохрома В	G14846A	A1	8	14
		A2	2	7
		A6	3	8
	G15059A	A1	31	41
		A3	28	52
		A5	43	66

генома. Из 42 исследованных мутаций сорок оказались гетероплазмичными, а две — гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе.

Разработанный метод прямой количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома позволил обнаружить три новые мутации — 652delG, 961delC и 5132insAA.

Выявлено, что преобладающими мутациями в липофиброзных бляшках являются 652delG, A1555G, C3256T, T3336C, C5178A, G12315A, G13513A, G14459A, 652insG, G14846A, G15059A. Данные мутации локализованы в восьми митохондриальных генах, два из которых кодируют транспортные РНК-Leu, один — субъединицу 12S рибосомальной РНК, четыре — белковые субъединицы NADH дегидрогеназы и один — цитохрома В. Это позволяет предположить, что повреждения генов субъединиц ферментов дыхательной цепи митохондрий, а также генов тРНК и рРНК митохондриального генома ведут к окислительному стрессу эндотелиальных клеток сосудов, конечным итогом которого является возникновение и развитие атеросклеротических поражений.

Данная статья может быть полезна как медицинским генетикам, так и практикующим врачам, проводящим диагностику сердечно-сосудистых патологий и атеросклероза.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 14-14-01038.

Список литературы

1. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Baha M.J. et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 21; 129(3):e28-e292. doi: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80. Epub 2013 Dec 18.
2. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. European Heart Network and European Society of Cardiology. 2012.
3. Орехов А.Н. *Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия*. Palmarium Academic Publishing, 2013. 536 с. ISBN: 978-3-659-98213-2.
4. Давыдов Д.М. Асимметрия в деятельности сердечно-сосудистой системы: её природа и роль в поддержании устойчивости и адаптации организма к стрессовым воздействиям. *Патогенез*. 2013; №2.
5. Захарова Е.И., Дудченко А.М. Холинацетилтрансфераза и её роль в регуляции обмена и секреции ацетилхолина. *Патогенез*. 2012. №4.
6. Кжышковска Ю.Г., Грачев А.Н. Маркеры моноцитов и макрофагов для диагностики иммунопатологий. *Патогенез*. 2012; №1.
7. Лыско А.И., Дудченко А.М. Каталитические антиоксиданты: потенциальные терапевтические средства

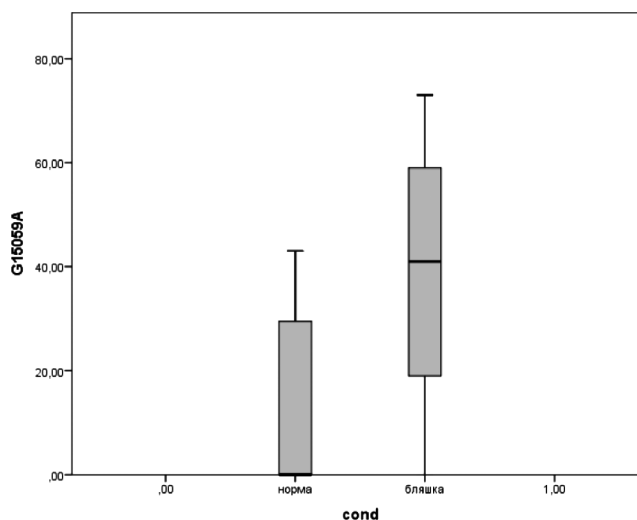


Рис. 3. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмичной мутации G15059A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме.

для коррекции патологий, вызываемых окислительным стрессом. *Патогенез*. 2013. — №3.

8. Медведев И.Н., Скорятин И.А. Цитоархитектоника эритроцитов и тромбоцитов у больных артериальной гипертензией с дислипидемией. *Патогенез*. 2013; №2.

9. Мельникова С.В., Запорожец Т.Н. Сравнительный анализ показателей сердечно-сосудистой системы у врачей-стоматологов и курсантов-стоматологов. *Патогенез*. 2012; №4.

10. Санюк Н.В., Мацеевский Д.Д., Лебедева М.А. Влияние острой гипоксии на легочное и системное кровообращение. *Патогенез*. 2012; №4.

11. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома человека с хроническими заболеваниями невоспалительного генеза: сахарным диабетом 2 типа, артериальной гипертензией и различными видами кардиомиопатии. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2012; 3:124-9.

12. Иванова М.М., Бородачев Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома с развитием инфаркта миокарда. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2012; 3: 115-22.

13. Иванова М.М., Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Некоторые мутации митохондриального генома человека, ассоциированные с цитопатиями. *Биомед. журн. Medline.ru*. 2012; Т. 13, Ст. 26. — С. 309-30.

14. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Ассоциация мутаций митохондриального генома с развитием инфаркта миокарда. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2013; 2: 56-61.

15. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Ассоциация точковых мутаций ядерного и митохондриального генома человека с ишемической болезнью сердца. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2012; 2: 51-6.

16. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека. *Кардиол. вестн.* 2012. -Т.7 (19), №1. С.57-61.

17. Сазонова М., Орехов А., Собенин И. *Дефекты митохондриального генома и атеросклероз. Роль патологии митохондриального генома в формировании атеросклеротических поражений артериальной стенки*. Palmarium Academic Publishing. 2014. 354 с. ISBN: 978-3-639-88097-7.
18. Andreu A.L., Hanna M.G., Reichmann H., Bruno C., Penn A.S., Tanji K., Pallotti F., Iwata S., Bonilla E., Lach B., Morgan-Hughes J., DiMauro S. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 1999; 30341(14): 1037-44.
19. Andreu A.L., Bruno C., Dunne T.C., Tanji K., Shanske S., Sue C.M., Krishna S., Hadjigeorgiou G.M., Shtilbans A., Bonilla E., DiMauro S. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol*. 1999; 45(1): 127-30.
20. Andreu A.L., Bruno C., Shanske S., Shtilbans A., Hirano M., Krishna S., Hayward L., Systrom D.S., Brown R.H. Jr., DiMauro S. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology*. 1998; 51(5): 1444-7.
21. Chol M., Lebon S., Benit P., Chretien D., de Lonlay P., Goldenberg A., Odent S., Hertz-Pannier L., Vincent-Delorme C., Cormier-Daire V., Rustin P., Rotig A., Munnich A. The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency. *J Med Genet*. 2003; 40(3): 188-91.
22. Han C.B., Ma J.M., Xin Y., Mao X.Y., Zhao Y.J., Wu D.Y., Zhang S.M., Zhang Y.K. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol*. 2005; 7;11(1): 31-5.
23. Tanimoto H, Nishio H., Matsuo M., Nibu K. A novel mitochondrial mutation, 1556C → T, in a Japanese patient with streptomycin-induced tinnitus. *Acta Otolaryngol*. 2004; 124(3): 258-61.
24. Yamagata K., Muro K., Usui J., Hagiwara M., Kai H., Arakawa Y., Shimizu Y., Tomida C., Hirayama K., Kobayashi M., Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13(7): 1816-23.
25. Matsunaga H., Tanaka Y., Tanaka M., Gong J.S., Zhang J., Nomiyama T., Ogawa O., Ogihara T., Yamada Y., Yagi K., Kawamori R. Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24(3): 500-3.
26. Wong L.J., Chen T.J., Tan D.J. Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004; 25(15): 2602-10.
27. Fu K., Hartlen R., Johns T., Genge A., Karpati G., Shoubridge E.A. A novel heteroplasmic tRNA^{Leu}(CUN) mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum Mol Genet*. 1996; 5(11): 1835-40.
28. Solano A., Roig M., Vives-Bauza C., Hernandez-Pena J., Garcia-Arumi E., Playan A., Lopez-Perez M.J., Andreu A.L., Montoya J. Bilateral Lateral Necrosis Associated with a Novel Mutation in the Mitochondrial ND6 Gene. *Ann Neurol*. 2003; 54(4): 527-30.
29. Horvath R., Scharfe C., Hoeltzenbein M., Do B.H., Schroder C., Warzok R., Vogelgesang S., Lochmuller H., Muller-Hocker J., Gerbitz K.D., Oefner P.J., Jaksch M. Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene. *J Med Genet*. 2002; 39(11): 812-6.
30. Kim D.-S., Jung D.-S., Park K.-H., Kim I.J., Kim C.M., Lee W.H., Rho S.K. Histochemical and molecular genetic study of MELAS and MERF in Korean patients. *J Korean Med Sci*. 2002; 17(1): 103-12.
31. Varlamov D.A., Kudin A.P., Vielhaber S., Schröder R., Sassen R., Becker A., Kunz D., Haug K., Rebstock J., Heils A., Elger C.E., Kunz W.S. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. *Hum Mol Genet*. 2002; 1; 11(16): 1797-805.
32. Gropman A., Chen T.J., Peng C.L., Krasnewich D., Chernoff E., Tiffit C., Wong L.J. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. *Am J Med Genet A*. 2004; 1; 124(4): 377-82.
33. Man P.Y., Griffiths P.G., Brown D.T., Howell N., Turnbull D.M., Chinnery P.F. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*. 2003; 72(2):333-9. Epub 2002; Jan 7.
34. Nishigaki Y., Marten R., Copeland W.C., Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest*. 2003; 111(12): 1913-21.
35. Baracca A., Barogi S., Carelli V., Lenaz G., Solaini G. Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. *J Biol Chem*. 2000; 11; 275(6): 4177-82.
36. Jeppesen T.D., Schwartz M., Hansen K., Danielsen E.R., Wibrand F., Vissing J. Late onset of stroke-like episode associated with a 3256C → T point mutation of mitochondrial DNA. *J Neurol Sci*. 2003; 15; 214(1-2): 17-20.
37. Wallace D.C. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 13; 91(19):8739-46. *Review. Neurological Sciences*. 2003; V. 214:17- 20.
38. Alderborn A., Kristofferson A., Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res*. 2000; 10(8): 1249-58.
39. Chen D.C., Saarela J., Nuotio I., Jokiahio A., Peltonen L., Palotie A. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping. *J Mol Diagn*. 2003; 5(4): 243-9.
40. Sinclair A., Arnold C., Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(11): 3620-2.
41. Adelson M.E., Feola M., Trama J., Tilton R.C., Mordechai E. Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR and Pyrosequencing. *J Clin Virol*. 2005; 33(1): 25-34.
42. (дата обращения 27. 03.2014).
43. Sazonova M.A., Postnov A.Iu., Orekhov A.N., Sobenin I.A. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011; 4: 81-4. (in Russian)
44. Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. 77th Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul,

Turkey, April 26-29, 2008. *Atherosclerosis Suppl.* 2008; 9(1):113.

45. Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta. 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10-13, 2007. *Atherosclerosis Suppl.* 2007; 8(1): 45-6.

46. Weir B.S. *Genetic Data Analysis*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 377 p.

47. <http://spss.ru.joydownload.com/> &c=20?gclid=COTnxtbesLwCFaHbcgodiiMAtQ (дата обращения 17. 09.2014).

Поступила 16.12.14

References

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014; Jan 21; 129(3):e28-e292. doi: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80. Epub 2013; Dec 18.

2. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. European Heart Network and European Society of Cardiology. 2012 — 127 p.

3. Orekhov AN. *Atherosclerosis. Molecular-cellular mechanisms of human atherosclerosis; antiatherosclerotic therapy*. Palmarium Academic Publishing, 2013 — 536 p. ISBN: 978-3-659-98213-2. (in Russian)

4. Davydov DM. Asymmetry in the activity of cardiovascular system: its nature and role in sustaining stress tolerance and adaptation of an organism to stress. *Pathogenesis.* 2013 (2). (in Russian)

5. Zakharova YeI, Dudchenko AM. Choline acetyl transferase and its role in regulation of acetylcholine exchange and secretion *Pathogenesis.* 2012 (4).

6. Kzhyshkowska JG, Gratchev AN. Monocyte and macrophage markers for immunopathological diagnostics. *Pathogenesis.* 2012 (1). (in Russian)

7. Lysko AI, Dudchenko AM. Catalytic antioxidants: potential therapeutic agents for correction of pathologies caused by oxidative stress. *Pathogenesis.* 2013 (3). (in Russian)

8. Medvedev IN, Skoryatina IA. Cytoarchitectonics of erythrocytes and thrombocytes in patients with arterial hypertension and dyslipidemia. *Pathogenesis.* 2013; (2). (in Russian)

9. Melnikova SV, Zaporozhets TN. A comparative analysis of cardiovascular system indicant of doctors-stomatologists and students-stomatologists. *Pathogenesis.* 2012; (4). (in Russian)

10. Sanotskaya NV, Matsievskii DD, Lebedeva MA. Influence of acute hypoxia on pulmonary and systematic circulation. *Pathogenesis.* 2012 (4). (in Russian)

11. Zhelankin AV, Sazonova MA. Association of the mutations in the human mitochondrial genome with chronic non-inflammatory diseases: type 2 diabetes, hypertension

and different types of cardiomyopathy. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; Jul-Sep; (3):123-8. Review. (in Russian)

12. Ivanova MM, Borodachev EN, Sazonova MA. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; Jul-Sep;(3):115-22. (in Russian)

13. Ivanova MM, Sazonova MA, Orekhov AN, Sobenin IA. Some human mitochondrial genome mutations associated with cytopathies. *Biomeditsinskiy journal Medline.ru.* 2012; Vol.13, Art.26:309-330. (in Russian)

14. Mitrofanov KLu, Zhelankin AV, Sazonova MA, Sobenin IA, Postnov Alu. Association of mitochondrial genome mutations with myocardial infarction development. *Atherosclerosis and dyslipidemii.* 2013; (2):56-61. (in Russian)

15. Mitrofanov KLu, Sazonova MA. Association of point mutations in human nuclear and mitochondrial genome with coronary artery disease. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; Apr-Jun; (2):51-5. Review. (in Russian)

16. Mitrofanov KLu, Zhelankin AV, Sazonova MA, Sobenin IA, Postnov Alu. Chronic diseases of noninflammatory genesis and human mitochondrial genome mutations. *Cardiologicheskiy vestnik.* 2012; 7 (19), №1:57-61.

17. Sazonova MA, Orekhov AN, Sobenin IA. Mitochondrial genome defects and atherosclerosis. Role of mitochondrial genome pathologies in atherosclerotic lesions formation of an arterial wall. Palmarium Academic Publishing, 2014; 354 p. ISBN: 978-3-639-88097-7. (in Russian)

18. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes J, DiMauro S. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 1999; Sep 30; 341(14): 1037-44.

19. Andreu AL, Bruno C, Dunne TC, Tanji K, Shanske S, Sue CM, Krishna S, Hadjigeorgiou GM, Shtilbans A, Bonilla E, DiMauro S. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol.* 1999; Jan; 45(1): 127-30.

20. Andreu AL, Bruno C, Shanske S, Shtilbans A, Hirano M, Krishna S, Hayward L, Systrom DS, Brown RH Jr, DiMauro S. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology.* 1998; 51(5): 1444-7.

21. Chol M, Lebon S, Benit P, Chretien D, de Lonlay P, Goldenberg A, Odent S, Hertz-Pannier L, Vincent-Delorme C, Cormier-Daire V, Rustin P, Rotig A, Munnich A. The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency. *J Med Genet.* 2003; Mar; 40(3): 188-91.

22. Han CB, Ma JM, Xin Y, Mao XY, Zhao YJ, Wu DY, Zhang SM, Zhang YK. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol.* 2005; Jan 7; 11(1): 31-5.

23. Tanimoto H, Nishio H, Matsuo M, Nibu K. A novel mitochondrial mutation, 1556C → T, in a Japanese patient with streptomycin-induced tinnitus. *Acta Otolaryngol.* 2004; Apr; 124(3): 258-61.

24. Yamagata K, Muro K, Usui J, Hagiwara M, Kai H, Arakawa Y, Shimizu Y, Tomida C, Hirayama K, Kobayashi M, Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol.* 2002; Jul;13(7): 1816-23.

25. Matsunaga H, Tanaka Y, Tanaka M, Gong JS, Zhang J, Nomiyama T, Ogawa O, Ogihara T, Yamada Y, Yagi K, Kawamori R. Antiatherogenic mitochondrial geno-

type in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; Mar; 24(3): 500-3.

26. Wong LJ, Chen TJ, Tan DJ. Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004; Aug; 25(15): 2602-10.

27. Fu K, Hartlen R, Johns T, Genge A, Karpati G, Shoubridge EA. A novel heteroplasmic tRNA^{Leu} (CUN) mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum Mol Genet*. 1996; Nov; 5(11): 1835-40.

28. Solano A, Roig M, Vives-Bauza C, Hernandez-Pena J, Garcia-Arumi E, Playan A, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. Bilateral Striatal Necrosis Associated with a Novel Mutation in the Mitochondrial ND6 Gene. *Ann Neurol*. 2003; Oct; 54(4): 527-30.

29. Horvath R, Scharfe C, Hoeltzenbein M, Do BH, Schroder C, Warzok R, Vogelgesang S, Lochmuller H, Muller-Hocker J, Gerbitz KD, Oefner PJ, Jaksch M. Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene. *J Med Genet*. 2002; Nov; 39(11): 812-6.

30. Kim D-S, Jung D-S, Park K-H, Kim IJ, Kim CM, Lee WH, Rho SK. Histochemical and molecular genetic study of MELAS and MERF in Korean patients. *J Korean Med Sci*. 2002; Feb; 17(1): 103-12.

31. Varlamov DA, Kudin AP, Vielhaber S, Schröder R, Sassen R, Becker A, Kunz D, Haug K, Rebstock J, Heils A, Elger CE, Kunz WS. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. *Hum Mol Genet*. 2002; Aug 1; 11(16): 1797-805.

32. Gropman A, Chen TJ, Perng CL, Krasnewich D, Chernoff E, Tift C, Wong LJ. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. *Am J Med Genet A*. 2004; Feb; 1; 124(4): 377-82.

33. Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*. 2003; Feb; 72(2): 333-9. Epub 2002; Jan 7.

34. Nishigaki Y, Marten R, Copeland WC, Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest*. 2003; Jun; 111(12): 1913-21.

35. Baracca A, Barogi S, Carelli V, Lenaz G, Solaini G. Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. *J Biol Chem*. 2000; Feb 11; 275(6): 4177-82.

36. Jeppesen TD, Schwartz M, Hansen K, Danielsen ER, Wibrand F, Vissing J. Late onset of stroke-like episode associated with a 3256C→T point mutation of mitochondrial DNA. *J Neurol Sci*. 2003; Oct 15; 214(1-2): 17-20.

37. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 13; 91(19): 8739-46. *Review. Neurological Sciences*. 2003; V. 214, P.17- 20.

38. Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res*. 2000; Aug; 10(8): 1249-58.

39. Chen DC, Saarela J, Nuotio I, Jokiaho A, Peltonen L, Palotie A. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping. *J Mol Diagn*. 2003; Nov; 5(4): 243-9.

40. Sinclair A, Arnold C, Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; Nov; 47(11): 3620-2.

41. Adelson ME, Feola M, Trama J, Tilton RC, Mordechai E. Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR and Pyrosequencing. *J Clin Virol*. 2005; May; 33(1): 25-34.

42. (date of addressing 27. 03.2014).

43. Sazonova MA, Postnov Alu, Orekhov AN, Sobenin IA. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011 Oct-Dec; (4): 81-4. (in Russian)

44. Sazonova M, Andrianova I, Khasanova Z, Sobenin I, Postnov A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. 77th Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April 26-29, 2008. *Atherosclerosis Suppl*. 2008, 9(1): 113.

45. Sazonova MA, Budnikov YY, Khazanova ZB, Postnov AY, Sobenin IA, Orekhov AN. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta. 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10-13, 2007. *Atherosclerosis Suppl*. 2007; 8(1): 45-6.

46. Weir BS. *Genetic Data Analysis*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996; 377 p.

47. <http://spss.ru.joydownload.com/&c=20?gclid=COTnxtbesLwCFaHbcgodiiMATQ> (date of addressing 17. 09.2014).

Received 16.12.14

Гриненко Е.А.¹, Кульчиков А.Е.², Мусин Р.С.³, Морозов С.Г.²

Патогенез сосудистых последствий нестабильности шейного отдела позвоночника и алгоритм их фармакотерапии

¹ — ФГБНУ НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., д.16

² — ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

³ — ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр.1

В исследование включено 256 пациентов с рентгенологически подтвержденной нестабильностью шейного отдела позвоночника. Данная патология способна стать причиной гемодинамических расстройств в артериальном и/или в венозном звене вертебро-базиллярной системы. Для патогенетической коррекции сосудистых последствий данной патологии шейного отдела позвоночника нами проведено расширенное клинично-инструментальное исследование церебральной гемодинамики на экстракраниальном уровне. В ходе работы установлено, что у пациентов с нестабильностью шейного отдела позвоночника только в 19,9% наблюдений был диагностирован физиологичный кровотока в каротидном и вертебро-базиллярном бассейнах при морфологической сохранности стенок сосудов. У 80,1% обследованных имели место разные варианты гемодинамических отклонений в вертебро-базиллярной системе. Согласно разработанному алгоритму обследования пациентов с данной патологией удалось установить ведущий патогенетический механизм формирования у них вертебро-базиллярной недостаточности (особенности артериального притока, венозного оттока, формирование внутричерепной гипертензии). Благодаря полученным результатам был разработан алгоритм относительно медикаментозной коррекции сосудистых последствий нестабильности шейного отдела позвоночника.

Ключевые слова: нестабильность шейного отдела позвоночника, вертебро-базиллярная недостаточность, паравертебральная венозная дисциркуляция

Grinenko E.A.¹, Kulchikov A.E.², Musin R.S.³, Morozov S.G.²

Pathogenesis of the vascular consequences caused by cervical instability and their algorithm for pharmacotherapy

¹ — Federal State Budgetary Scientific Institution «Burdenko Neurosurgical Research Institute», 16, Tverskaya-Yamskaya str., 125047 Moscow, Russian Federation

² — Federal State Budgetary Scientific Institution «The Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya str., 125315 Moscow, Russian Federation

³ — Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov of Healthcare Ministry, 20- building 1, Delegatskaya str., 127473 Moscow, Russian Federation

256 patients with radiologic detected cervical instability were examined. This pathology may be the cause of arterial or venous vertebra-basilar disorders. We realized extensive examination the patients with the cervical instability for the pathogenic correction of vascular consequences. We founded normal blood flow only in 19,9% cases without morphology alterations the vessels of both basins. 80,1% patients had different cerebral hemodynamic disorders variations. According to our examination plan we detected the vertebra-basilar insufficiency pathogenesis and proposed medicinal correction of the cerebral instability consequences.

Key words: cerebral instability, vertebra-basilar insufficiency, vertebral venous circulation disorders

Патология шейного отдела позвоночника (ШОП) остается одной из наиболее распространенных причин формирования вертебро-базиллярной недостаточности (ВБН). Ранее наиболее часто ВБН диагностировали у пациентов старшей возрастной группы и связывали

ее возникновение с остеохондрозом. На протяжении последних 30 лет увеличилась частота встречаемости ВБН у лиц трудоспособного возраста, у которых дегенеративно-дистрофические изменения ШОП могут полностью отсутствовать или быть минимальными, а причиной гемодинамических нарушений в вертебро-базиллярной системе (ВБС) становится патологическая подвижность шейных позвонков. Нестабильность ШОП — это патология статокINETической

Для корреспонденции: Кульчиков Андрей Евгеньевич, к.м.н., науч. сотр., лаб. общей и перинатальной нейронауки ФГБНУ НИИ ОПП, e-mail: andrey.kulchikov@gmail.com

функции, при которой появляются дополнительные степени свободы при сгибании и/или разгибании, когда мышечно-связочный аппарат шейно-воротниковой зоны не способен обеспечить движения семи шейных позвонков как единого целого [1]. Учитывая топографо-анатомические особенности позвоночных артерий (ПА) по отношению к ШОП, наряду с его статокINETическими нарушениями возникают гемодинамические отклонения в ПА, расположенных в костном канале поперечных отростков шейных позвонков [2, 3], и паравертебральных венозных сплетениях. Таким образом, формирование ВБН на фоне нестабильности ШОП происходит не только из-за нарушений артериального притока по ПА, но и в связи с затруднением венозного оттока из полости черепа по паравертебральным венозным сплетениям. Первый механизм обусловлен функциональными (отклонение скоростных показателей кровотока) и/или морфологическими изменениями ПА. Вторым механизмом — это результат охранительного напряжения мышц шейно-воротниковой зоны, компенсирующего недостаточность связочного аппарата позвоночного столба и ограничивающего избыточное смещение шейных позвонков. Диагностика обоих механизмов осуществляется с помощью ультразвуковых исследований брахицефальных сосудов (БЦС) [4], оценивая артериальный приток и венозный отток, нарушение которых сопоставимо для формирования ВБН [5]. Зачастую первыми клиническими предвестниками сосудистых расстройств на фоне нестабильности ШОП являются головные боли [1], сопровождающиеся иными симптомами ВБН, в том числе, *drop attacks* [5]. Длительное существование скрытых отклонений гемодинамики в ВБС со временем может привести к астении, гиподинамии, нарушению ритма сна и бодрствования [6, 7, 8]. В равной степени хронические артериальные и венозные нарушения в ВБС требуют медикаментозной терапии для устранения недостаточности кровоснабжения в ВБС. Фармакотерапия у пациентов с сосудистыми расстройствами на фоне нестабильности ШОП не может быть эмпирической и зависит от патогенетического механизма, который запускает и поддерживает ВБН. Лечение таких пациентов неодинаково при артериальных и при венозных нарушениях, поэтому в первую очередь необходимо четкое определение патогенеза ВБН и только затем назначение лекарств. Ранее клинически выявленные признаки ВБН служили поводом к применению сосудистых препаратов с целью улучшения кровообращения. В настоящее время выбор препарата можно осуществлять согласно результатам ультразвукового и электрофизиологического методов исследования. Расширенная инструментальная диагностика на современном этапе позволяет не только определить

порядок применения лекарственных средств с учетом патогенеза ВБН, но и оценить адекватность проводимой терапии. Таким образом, *целью нашего исследования* стало определение ведущего патогенетического механизма ВБН у пациентов с нестабильностью ШОП для выбора медикаментозной терапии сосудистых расстройств и определения порядка их применения.

Методика

Нами обследовано 256 пациентов, обратившихся за медицинской помощью. Из них женщины составили 197 чел. (76,95%), а мужчины — 59 чел. (23,05%). Средний возраст пациентов соответствовал $36,78 \pm 11,6$ годам. Основным критерием отбора пациентов в группу исследования послужила рентгенологически подтвержденная нестабильность ШОП. Ведущей жалобой при обращении этих пациентов за амбулаторной медицинской помощью стала упорная головная боль. Характер головных болей, которые писывали пациенты, был разным, в зависимости от их патогенеза. Так, цефалгии, обусловленные недостаточностью артериального притока, носили острый пульсирующий характер, локализовались с одной стороны, усиливались при ходьбе, при подъеме по лестнице. Головные боли, связанные с венозным застоем, были ноющими, распирающими, нарастали при наклонах. Пациенты описывали и иные симптомы ВБН (головокружение, шум в ушах, снижение слуха, нарушение координации движений, пошатывание, др.) и вегетативной дисфункции (тошнота, позывы на рвоту, сердцебиение, неустойчивость артериального давления, повышенная потливость, др.). Кроме того они предъявляли жалобы на утреннюю слабость и сниженную трудоспособность. В 7,8% клинических наблюдений причиной визита пациентов в амбулаторное медицинское учреждение стала необходимость профилактического осмотра, хотя у этих лиц жалобы отсутствовали. Клиническое обследование включало оценку неврологического статуса (констатация симптомов синдрома комплекса ВБН: наличие и характер нистагма, точность выполнения координаторных проб, удерживание равновесия в простой и/или сенсibilизированной пробе Ромберга, оценка походки пациента) и описание глазного дна (особенности хода артерий и вен, изменения диска зрительного нерва). Обзорная спондилография, дополненная функциональными пробами, была проведена на цифровом рентгенологическом аппарате «Axiom Iconos R 200» фирмы Siemens (Германия). Данный метод не требовал специальной подготовки и дополнительных рекомендаций. Лучевая нагрузка при выполнении рентгенограммы ШОП с функциональными пробами соответствовала 0,384 мЗв и не превышала допустимую лу-

чевую нагрузку при медицинских исследованиях в год (1 мЗв), помимо естественного излучения (2 мЗв/год). Функциональное рентгеновское исследование (ФРИ) стала инструментальным методом, не только позволяющим осуществить скрининг патологии ШОП, но и отобрать пациентов в группу ранней диагностики сосудистых проблем ВБС. Исследования кровотока в ВБС на уровне V2- и V3- сегментов ПА осуществляли с помощью ультразвуковой диагностики: дуплексного сканирования брахиоцефальных сосудов (ДС БЦС) на аппарате «Antares» фирмы Siemens (Германия) и доплеровского режима для оценки систолической линейной скорости (ЛСК сист.) методом ультразвуковой доплерографии (УЗДГ БЦС) на аппарате «Angiodin» фирмы БИОСС (Россия). Кроме выявления особенностей артериального притока в каротидных и позвоночных артериях, мы осуществляли регистрацию венозного оттока в позвоночных венозных сплетениях для диагностики паравертебральной венозной дисциркуляции (ПВД). Бассейн позвоночных вен (сплетений) исследовали в положении больного лежа на спине в проекции V2- и V3-сегментов ПА. Учитывая тот факт, что отток венозной крови из полости черепа в горизонтальном положении осуществляется по яремным венам, усиление венозного кровотока в позвоночных сплетениях указывает на его затруднение. В нашей работе у части пациентов были зарегистрированы «нулевые» значения венозного кровотока, что, по мнению ряда авторов, в популяции встречается довольно часто и является одним из вариантов нормы [9]. По данным литературы, при дуплексном сканировании ПВД проявляет себя, как правило, расширением позвоночных сплетений и ускорением линейной скорости кровотока (ЛСК) в среднем до $50,02 \pm 30,88$ [9] и даже до 75—80 см/с. [10] Тем не менее, на современном этапе исследователям не удалось четко установить нормативные показатели кровотока для венозных сплетений. Поскольку нестабильность ШОП может являться причиной ПВД, которая в свою очередь влечет формирование доброкачественной внутричерепной гипертензией (ВЧГ), для диагностики данного синдрома мы выполняли пациентом эхоэнцефалографию (ЭхоЭГ), оценивая ее выраженность и сопоставляя результаты с показателями кровотока в ПА и особенностями венозного оттока. Скрытые признаки недостаточности мозгового кровотока (НМК) даже при нормативных значениях ЛСК сист. в ПА и адекватном венозном оттоке мы диагностировали с помощью электроэнцефалографии (ЭЭГ), которая помогала подтвердить или опровергнуть нарушение венозно-артериального баланса (ВАБ). В зависимости от полученных результатов клинико-инструментального обследования мы осуще-

ствляли выбор терапии, которая могла быть проведена с профилактической или лечебной целью. Учитывая все возможные механизмы ВБН при нестабильности ШОП, мы определяли последовательность применения те или иные групп лекарственных средств (венотоники, противоотечные препараты, нейропротекторы, вазоактивные препараты). Статистический анализ проводили с использованием программы «Biostat». Все значения даны в виде средних арифметических и стандартных отклонений ($M \pm SD$). Все данные имели нормальный тип распределения. Достоверность различий средних значений устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты неврологического осмотра показали, что у 96,6% пациентов было нарушение равновесия в простой и/или сенсibilизированной пробе Ромберга. У 82,6% обследованных диагностировано нарушение при выполнении координаторных проб. В 79,5% наблюдений имел место нистагм, который был односторонним или двусторонним, а двух клинических случаях имел вертикальный компонент. У 38,7% пациентов при осмотре обращали на себя внимание признаки венозной дисциркуляции (ВД): наличие пастозности или отека лица и век, не связанных с приемом жидкости на ночь и в отсутствии анамнестических данных о патологии почек. Для оценки клинической тяжести ВБН у пациентов с нестабильностью ШОП мы свели все выявленные неврологические симптомы и присвоили им баллы (табл. 1). Соответственно, чем больше баллов, тем тяжелее ВБН. При суммировании баллов было получено, что у обследованных пациентов клиническая тяжесть ВБН чаще соответствовала 3—6 баллам (средняя степень тяжести), реже 1—2 (легкая степень) или 7—9 баллам (тяжелая степень) (рис. 1). Таким образом, к моменту обращения за медицинской помощью только у 3,4% пациентов не сформировалась ВБН на фоне нестабильности ШОП.

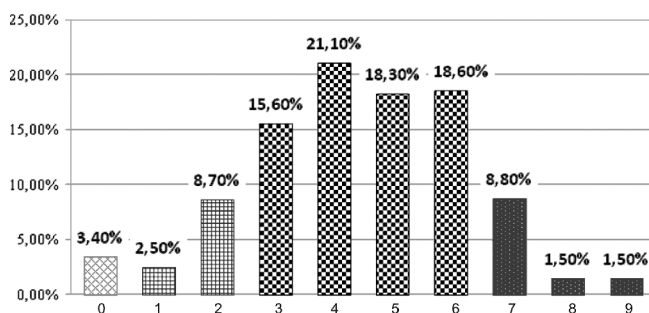


Рис. 1. Степень клинической тяжести вертебро-базиллярной недостаточности, процент наличия суммарного количества баллов у пациентов

Обследование глазного дна показало, что у всех пациентов с нестабильностью ШОП присутствует спазм артериол, а у 38,7% — венпатия в виде расширения, полнокровия или напряжения венул, что согласовалось с клиническими данными о ВД. Ни в одном наблюдении не было отмечено патологии диска зрительного нерва. В ходе функциональной рентгенографии у всех 256 пациентов была подтверждена нестабильность ШОП, которая имела место при флексии и/или при экстензии. Так, смещение позвонков только при сгибании выявлено у 74 чел. (29,3%), только при разгибании — у 95 чел. (37,1%). Признаки нестабильности межпозвонковых сегментов, как в положении флексии, так и в положении экстензии в обеих функциональных позах диагностированы в 87 клинических наблюдениях (33,6%). При анализе направления смещения позвонков было установлено, что в положении сгибания нестабильность ШОП имела место в 74 наблюдениях и примерно в равном соотношении была представлена ретролистезами (34 пациента) и антелистезами (40 пациентов). В положении разгибания смещение позвонков было диагностировано в 95 клинических случаях: ретролистезы выявлены у 94 пациентов, в то время как антелистезы только у одного. Нестабильность, проявляемая с обеих функциональных проб, встречалась у 87 обследованных. При этом она чаще характеризовалась смещением позвонков кзади (52 наблюдения) и комбинированным смещением (44 наблюдения). Антелистез был диагностирован только в одном случае. И в положении максимального сгибания и в положении максимального разгибания в процесс формиро-

вания патологической подвижности межпозвонковых сегментов оказались вовлеченными С2-С6 позвонки, в то время как С1 и С7 позвонки оставались стабильными. Так, в позе сгибания смещение С4 позвонка установлено у 109 пациентов, что составило 42,6% клинических наблюдений. Амплитуда его смещения достигала в среднем $2,5 \pm 0,6$ мм (1—4 мм). Патологическая мобильность С3 и С5 позвонков встречалась в 89 (34,8%) и 55 (21,5%) случаях соответственно, а протяженность патологического скольжения позвонков при выполнении функциональных нагрузок составила $2,5 \pm 0,7$ мм (1—5 мм) и $2,5 \pm 0,6$ мм (1—3 мм). Менее часто по данным ФРИ отмечали смещение С2 и С6 позвонков. Так, патологическая подвижность С2 позвонка встречалась в 41 наблюдении (16%) и достигала $2,3 \pm 0,6$ мм (1—4 мм), а смещение С6 позвонка — в 16 случаях (6,25%), и соответствовала $2,75 \pm 0,45$ мм (2—3 мм). В позе разгибания наиболее часто регистрировали смещение С3 и С4 позвонков. Наличие дополнительной степени свободы С3 позвонка при экстензии ШОП установлено у 120 пациентов (46,9%), при этом смещение достигало $2,4 \pm 0,6$ мм (1—4 мм). Нестабильность С4 позвонка диагностирована у 130 чел. (50,8%), со смещением $2,4 \pm 0,7$ мм (1—4 мм). Несколько реже отмечена нестабильность С2 позвонка — у 54 пациента (21,1%) с амплитудой отклонения $2,2 \pm 0,6$ мм (1—5 мм), а С5 позвонка — у 81 (31,6%) с амплитудой $2,5 \pm 0,6$ мм (1—4 мм). Смещение С6 позвонка в положении максимального разгибания было установлено только у 11 чел. (4,3%) и составило $2,25 \pm 0,9$ мм (1—3 мм) (табл. 2).

Таблица 1

Сводная таблица симптомов вертебро-базилярной недостаточности для оценки ее клинической тяжести

Симптомы	Нистагм			Координаторные пробы		Равновесие в пробах Ромберга		Клинические проявления венозной дисциркуляции	
	Односторонний	Двусторонний	Вертикальный компонент	Мимопадание с одной стороны	Мимопадание с двух сторон	Отклонение корпуса в одну сторону	Отклонение корпуса в обе стороны	Отечность век или патозность лица	Ограничение взгляда вверх
Баллы	1	2	1	1	2	1	2	1	1

Таблица 2

Степень смещения шейных позвонков в позах максимального сгибания и разгибания при выполнении функционального рентгенологического исследования

Позвонки	Поза функционального исследования			
	Сгибание		Разгибание	
	Средние значения, мм	Максимальные значения, мм	Средние значения, мм	Максимальные значения, мм
С2	$2,3 \pm 0,6$	1-4	$2,2 \pm 0,6$	1-5
С3	$2,5 \pm 0,7$	1-5	$2,4 \pm 0,6$	1-4
С4	$2,5 \pm 0,6$	1-4	$2,4 \pm 0,7$	1-4
С5	$2,5 \pm 0,6$	1-3	$2,5 \pm 0,6$	1-4
С6	$2,75 \pm 0,45$	2-3	$2,25 \pm 0,9$	1-3

Как правило, чаще встречали смещения не одного, а нескольких позвонков. Так, в позе максимального сгибания нестабильность 1-го шейного позвонка была выявлена только у 49 пациентов (19,1%). Часто наблюдали избыточную мобильность двух или трех позвонков одновременно. Так, смещение двух позвонков диагностировано у 54 чел. (21,1%), а трех — 39 чел. (15,2%). Смещение четырех позвонков встречали довольно редко — у 12 больных (4,7%). И только у одного пациента (0,4%) отмечено смещение пяти позвонков. В позе максимального разгибания в равных долях установлено смещения одного, двух и даже трех позвонков, что соответствовало 55 (21,5%), 59 (23%) и 54 (21,1%) клиническим наблюдениям. Как и при выполнении сгибания, нестабильность четырех и пяти шейных позвонков при разгибании диагностировано в редком проценте случаев. Одновременное смещение четырех позвонков зафиксировано по данным ФРИ у 14 пациентов (5,5%), а пяти позвонков — только у одного (0,4%) (табл. 3). Признаки НМК в ВБС, полученные в результате неврологического осмотра, и данные о нестабильности ШОП, выявленные при скрининговом ФРИ, послужили основанием для ультразвукового исследования БЦС с целью определения патогенетических механизмов церебральной гемодинамики. Исследова-

ние артериального притока в обоих бассейнах на экстракраниальном уровне показало физиологичность скоростных показателей в системе каротидных сосудов как в среднем, так и в каждом отдельном наблюдении. В то время ЛСК сист. в обеих ПА в среднем была на нижней границе нормы (табл. 4).

Детальное исследование гемодинамики в ПА установило, что ЛСК сист. соответствовала норме только у 32,8% пациентов. При этом физиологичным кровотоком был у 19,9% из них. Выполнение функциональных проб с поворотом головы в этих клинических наблюдениях не привело к изменению скоростных показателей в ПА свыше допустимого. У остальных 12,9% пациентов с исходно нормальными скоростными показателями в ПА было диагностировано вертеброгенное влияние на экстракраниальную часть ПА. Всего у обследованных пациентов вертеброгенное влияние на ПА было установлено в 34,7%. У 22,7% обследованных выявлена асимметрия ЛСК сист. независимо от диаметра ПА. При этом не у всех этих пациентов имела место непрямолинейный ход V2-сегмента ПА. У большинства из них асимметрия кровотока установлена при практически равных диаметрах правой и левой ПА и при их прямолинейном ходе в канале поперечных отростков шейных позвонков. В 4,7% наблюдений за-

Таблица 3

Число смещенных позвонков при выполнении функционального рентгенологического исследования

Число позвонков, N	Поза функционального исследования			
	Сгибание		Разгибание	
	Число пациентов, n	%	Число пациентов, n	%
N1	49	19,1	55	21,5
N2	54	21,1	59	23
N3	39	15,2	54	21,1
N4	12	4,7	14	5,5
N5	1	0,4	1	0,4

Примечание. * Общее число пациентов в таблице, у которых выявлено смещение позвонков, не соответствует общему числу пациентов, участвующих в исследовании, так как у ряда пациентов смещение позвонков диагностировано и в позе сгибания и в позе разгибания.

Таблица 4

Скоростные показатели и индексы кровотока в экстракраниальных сосудах

Сосуды	ЛСК сист. d (см/с)	ПИ d	ЛСК сист. s (см/с)	ПИ s
ОСА	85,1 ± 19,9	0,7 ± 0,06	84,9 ± 19,8	0,7 ± 0,06
НСА	72,9 ± 13,7	0,56 ± 0,06	73,4 ± 14,7	0,55 ± 0,05
ВСА	79,9 ± 17,4	0,76 ± 0,07	80,3 ± 17,8	0,76 ± 0,07
ПА	37,6 ± 7,9	0,54 ± 0,06	38,2 ± 7,1	0,55 ± 0,07

Примечание. ОСА — общая сонная артерия; НСА — наружная сонная артерия; ВСА — внутренняя сонная артерия; ПА — позвоночная артерия; ЛСК сист d — линейная скорость кровотока в группе правых брахиоцефальных сосудах; ЛСК сист. s — линейная скорость кровотока в группе левых брахиоцефальных сосудах; ПИ d — периферический индекс в группе левых брахиоцефальных сосудах; ПИ s — периферический индекс в группе левых брахиоцефальных сосудах.

регистровано увеличение ЛСК сист. свыше 50 см/с по типу спазма ПА, а в 39,8% случаев отмечено снижение скоростных показателей ниже нижней границы нормы, в том числе ниже 30 см/с у 6,6% пациентов. Особенности венозного кровотока у 38,7% пациентов заключались в регистрации ПВД. Полученные результаты коррелировали с клиническими данными осмотра и данными офтальмологического обследования, которое выявило изменения вен глазного дна на фоне ВД. С помощью дуплексного сканирования удалось установить расширение паравертебральных венозных сплетений. Допплеровский режим, в свою очередь, позволил оценить выраженность ПВД по амплитуде спектра венозного потока. Так, в 87,5% наблюдений была диагностирована умеренная ВД, легкая ее степень была зарегистрирована в 10,6% случаев, а выраженная имела место у 1,9% пациентов от общего числа с ПВД.

Учитывая, что ВД сама по себе может стать причиной доброкачественной ВЧГ, для диагностики косвенных ее признаков нами была выполнена ЭхоЭГ. Результаты исследования показали, что гипертензионный синдром был выявлен у 138 пациентов, среди которых только у 72 чел. (52,2%) его причиной стала ВД. В двух наблюдениях было отмечено расширение III желудочка свыше 6 мм, что говорило в пользу гипертензионно-гидроцефального синдрома. У остальных пациентов причину установить не удалось, хотя МРТ головного мозга исключила наличие объемных образований, которые могли послужить фоном для формирования ВЧГ. Несмотря на доброкачественность своего течения у пациентов с нестабильностью ШОП ВЧГ повлияла на гемодинамику в ВБС. Сопоставляя результаты, полученные при ис-

следования артериального и венозного кровотока с данными ЭхоЭГ, было получено воздействие доброкачественной ВЧГ с выраженными косвенными признаками на кровоток в ПА (табл. 5). Несмотря на особенности гемодинамики в ВБС, у пациентов с нестабильностью ШОП не всегда удается диагностировать признаки НМК с помощью клиничко-ультразвуковых методов исследования, как не всегда при физиологичности артериального притока по ПА и венозного оттока по паравертебральным венозным сплетениям может оставаться сохранным венозно-артериальный баланс (ВАБ), что выражается в скрытом течении НМК.

Подобные отклонения церебральной гемодинамики при адекватности результатов ультразвукового исследования можно установить в ходе ЭЭГ-исследования. Нами была выполнена оценка биопотенциалов головного мозга в 163 клинических наблюдениях и у 82 обследованных пациентов с различными патогенетическими вариантами формирования ВБН выявлены косвенные признаки НМК, хотя в 17 наблюдениях и артериальный приток и венозный отток оставались сохранными (табл. 6). У 81 пациента не были диагностированы косвенные признаки НМК, несмотря на сохранность и артериального притока и венозного оттока только у 15 из них. В остальных наблюдениях присутствовали все те же гемодинамические отклонения, что и у пациентов с косвенными признаками НМК (табл. 7).

Установленные патогенетические варианты гемодинамических особенностей в ВБС, способные привести к формированию ВБН у пациентов с нестабильностью ШОП, позволили нам сформулировать алгоритм медикаментозной терапии для коррекции сосудистых расстройств (рис. 2). Таким образом,

Таблица 5

Степень внутричерепной гипертензии состояние кровотока в вертебро-базилярной системе у пациентов с нестабильностью шейного отдела позвоночника на фоне паравертебральной венозной дисциркуляции

Группы	Параметры	Полная группа	Наличие ВД, n = 72	Отсутствие ВД, n = 66
Легкая ВЧГ, n = 39	Возраст	36,1 ± 13,0	38,2 ± 13,1	34,8 ± 13,1
	ЛСК сист. в ПАд	37,6 ± 6,5	38,9 ± 6,5	36,8 ± 6,5
	ЛСК сист. в ПAs	38,5 ± 7,3	37,5 ± 7,1	39,1 ± 7,6
Умеренная ВЧГ, n = 64	Возраст	37,1 ± 9,6	37,8 ± 9,6	36,2 ± 9,6
	ЛСК сист. в ПАд	39,4 ± 7,4	39,8 ± 7,7	38,8 ± 7,1
	ЛСК сист. в ПAs	39,1 ± 7,1	40 ± 8,1	39,7 ± 7,5
Выраженная ВЧГ, n = 35	Возраст	39,1 ± 14,8	39,1 ± 16,1	39,1 ± 13,9
	ЛСК сист. в ПАд	35,5 ± 6,8*	36 ± 7,3*	34,9 ± 6,5*
	ЛСК сист. в ПAs	35,4 ± 7,0*	34,4 ± 6,1*	36,6 ± 7,9*

Примечание. * Показатели ЛСК сист. в ПА с обеих сторон ниже нижней границы физиологичных показателей ($p < 0,05$ по сравнению с нормой). ВЧГ — внутричерепная гипертензия, ЛСК сист. — систолическая линейная скорость кровотока; ПАд — правая позвоночная артерия; ПAs — левая позвоночная артерия; ВД — венозная дисциркуляция.

Таблица 6

Патогенетические варианты притока и оттока в вертебро-базиллярной системе у пациентов с косвенными ЭЭГ-признаками недостаточности мозгового кровообращения

Параметры	Патогенетические варианты, n = 82							
	Вариант 1 (n = 17)	Вариант 2 (n = 11)	Вариант 3 (n = 18)	Вариант 4 (n = 16)	Вариант 5 (n = 6)	Вариант 6 (n = 11)	Вариант 7 (n = 2)	Вариант 8 (n = 1)
ЛСК сист. в ПА	N	N	↓	↓	↓/↑	↓/↑	↑	↑
ВД	—	+	—	+	+	—	+	—
ЭЭГ — признаки НМК	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. ЛСК сист. — систолическая линейная скорость кровотока; ПА — позвоночные артерии; НМК — недостаточность мозгового кровообращения; ВД — венозная дисциркуляция; ЭЭГ — электроэнцефалография, N- показатель нормы, «↓» — показатель снижения кровотока; «↑» — показатель повышения кровотока; «↓/↑» — асимметрия кровотока; «+» — наличие признака; «—» — отсутствие признака.

Таблица 7

Патогенетические варианты притока и оттока у пациентов без косвенных ЭЭГ-признаков недостаточности мозгового кровообращения

Параметры	Патогенетические варианты, n = 81							
	Вариант 1 (n = 15)	Вариант 2 (n = 14)	Вариант 3 (n = 17)	Вариант 4 (n = 18)	Вариант 5 (n = 3)	Вариант 6 (n = 11)	Вариант 7 (n = 2)	Вариант 8 (n = 1)
ЛСК сист. в ПА	N	N	↓	↓	↓/↑	↓/↑	↑	↑
ВД	—	+	—	+	+	—	+	—
ЭЭГ — признаки НМК	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. ЛСК сист. — систолическая линейная скорость кровотока; ПА — позвоночные артерии; НМК — недостаточность мозгового кровообращения; ВД — венозная дисциркуляция; ЭЭГ — электроэнцефалография, N- показатель нормы, «↓» — показатель снижения кровотока; «↑» — показатель повышения кровотока; «↓/↑» — асимметрия кровотока; «+» — наличие признака; «—» — отсутствие признака.

если у пациентов по данным ультразвукового исследования были диагностированы физиологичный кровоток и в артериальном, и в венозном звене ВБС, а по данным ЭЭГ выявлена скрытая НМК, то проводили антигипоксантную терапию. Препаратом выбора стал в данной ситуации Этилметилгидроксипиридина сукцинат (Мексидол, Фармасофт, Россия), который назначали в дозе 0,125 г 3 раза в сутки в течение месяца. По окончании терапии выполняли ЭЭГ-контроль. В случае ВБН, обусловленной гемодинамическими нарушениями в артериальном звене ВБС, выбор оставался за вазоактивными препаратами. Мы применяли Винпоцетин (Кавинтон, Гедеон Рихтер, Венгрия) по 0,005 г таблетке 3 раза в сутки в течение месяца с последующим контролем скоростных показателей в ПА. Препаратами выбора для терапии ВД в нашей практике стал Аминофиллин (Эуфиллин, Органика, Россия). Учитывая возможность формирования доброкачественной ВЧГ на фоне ВД мы осуществляли терапию только венотониками. Разрешение ВД приводило к купированию и синдрома ВЧГ. В этом случае мы применяли Аминофиллин в дозе 0,15 г 3 раза в сутки в течение месяца при выраженной ВД и/или при выраженной ВЧГ с дальнейшим ЭхоЭГ — контролем и оценкой

венозного оттока. При умеренной ВД с формированием умеренной ВЧГ или без гипертензионного синдрома мы рекомендовали прием Аминофиллина в дозе 0,15 г 2 раза в сутки на протяжении месяца с последующим контролем. В случае легкой ВД как в присутствии легкой ВЧГ, так и без ее формирования прием Аминофиллина в дозе 0,15 г 2 раза в сутки мы ограничивали 2 неделями. Если у пациентов с нестабильностью ШОП гипертензионный синдром имел гидроцефальный компонент, то препаратом выбора становился Ацетазоламид (Диакارب, Польша, Польша). Учитывая, что гидроцефальный синдром не был ярко выраженным (по данным ЭхоЭГ ширина III желудочка максимально достигала у пациентов в нашем исследовании 7 мм) мы ограничивались назначением Ацетазоламида в дозе 0,25 г 1 раз в сутки раз в 3 дня в течение месяца. Далее проводили ЭхоЭГ — контроль. Именно такой подход позволил нам повысить качество лечебных мероприятий. Кроме того, нами был рекомендован комплекс мероприятий, направленных на стабилизацию ШОП, т.к. коррекция сосудистых последствий данной патологии носит лишь временный характер без воздействий на первопричину.

Заключение

Нестабильность ШОП может стать причиной нарушения кровотока в ВБС на экстракраниальном уровне. Этапы развития морфологического процесса в стенках ПА проявляются разнообразными изменениями кровотока в V2 — и V3 — сегментах ПА и прогрессированием клинических симптомов. Возможно, это обусловлено увеличением степени смещения шейных позвонков. На начальных этапах формирования дополнительных степеней свобод шейных сегментов возникает спазм экстракраниальной части ПА за счет раздражения костными структурами периваскулярных нервных волокон, который носит временный

характер. При формировании более значимого смещения позвонков во время сгибания и разгибания, поворотов ШОП в каждом отдельно взятом клиническом случае происходит механическое повреждение самих стенок сосудов. Поэтому изменения кровотока приобретают более устойчивый характер, обусловленный более грубыми морфологическими изменениями сосудистой стенки ПА (на примере секционного материала выявлены микрогеморрагии в стенку ПА [11], снижение эластичности стенки ПА, периартериальный рубцовый процесс [12, 13]. Достижение критического смещения может способствовать временно-

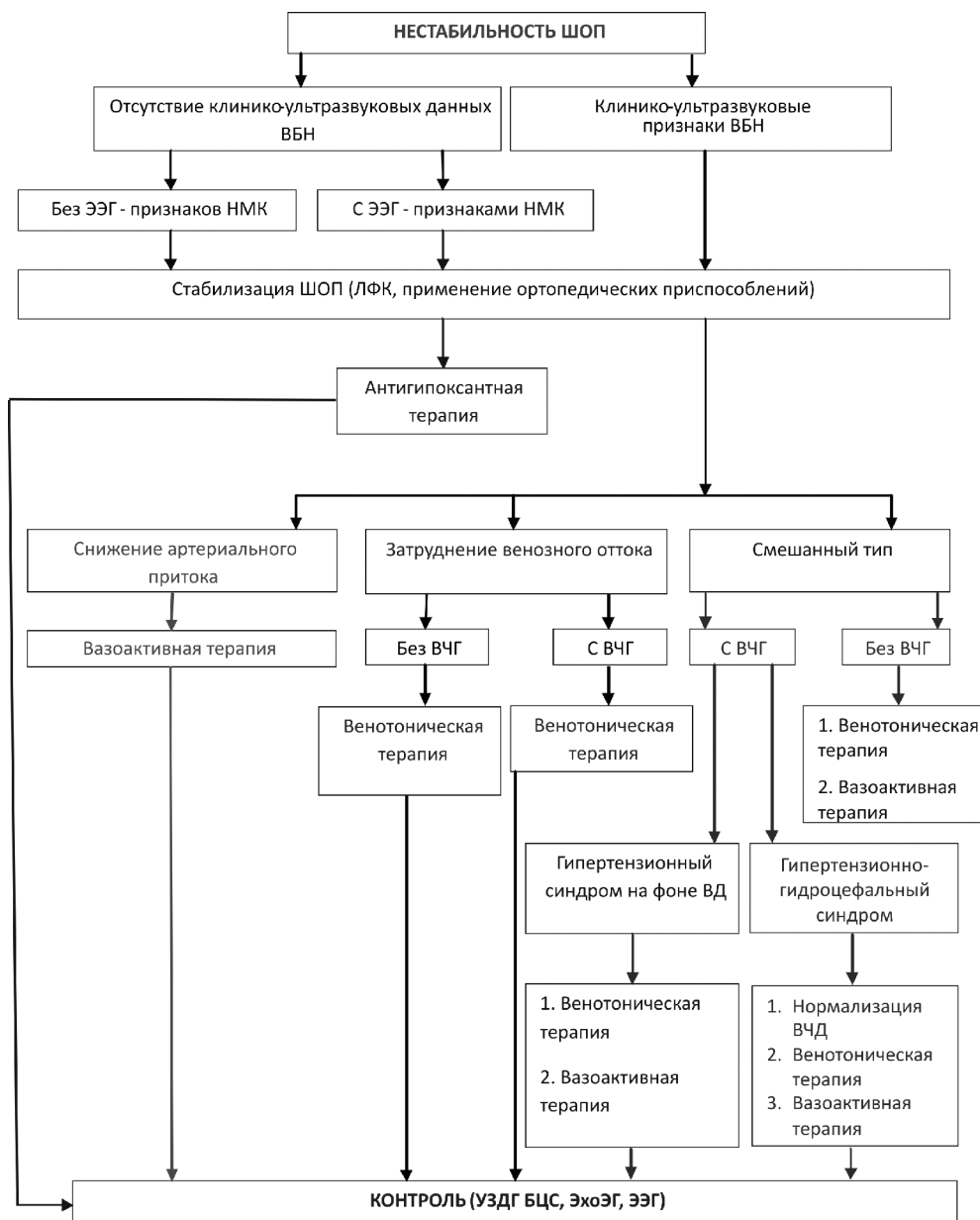


Рис. 2. Алгоритм фармакотерапии сосудистых расстройств у пациентов с нестабильностью ШОП на амбулаторно-поликлиническом этапе.

му прекращению кровотока и появлению соответствующей клинической картины, выражающейся устойчивым неврологическим дефицитом, вплоть до летального исхода. Несмотря на значимое влияние нестабильности ШОП на кровоток ВБС и возникновение неврологической симптоматики, не у всех больных удается диагностировать дисфункцию гемодинамики. Для возникновения устойчивых изменений кровотока в ПА и формирования соответствующего неврологического дефицита, по всей видимости, большее значение имеет диаметр отверстия поперечного отростка шейного позвонка и диаметр соответствующей ПА, проходящей через это отверстие. Оба эти размера важны как для ирритации паравазальных нервных сплетений с формированием спазма ПА, так и для механического воздействия на саму ПА при смещении позвонков, что объясняет непостоянность неврологических симптомов на начальных этапах формирования нестабильности ШОП и приобретения ими устойчивого характера при прогрессирующем максимально допустимом смещении. Учитывая возникновение подобных последствий нестабильности ШОП, важно не только рекомендовать лечебные мероприятия по его стабилизации, но и правильно подобрать терапию сосудистых расстройств согласно патогенезу. Недооценка данной патологии для качества жизни не позволяет охватить специфическим лечением всех пациентов, а отсутствие их диспансеризации со временем приводит к возникновению довольно разнообразных и даже самых тяжелых неврологических синдромов [3]. При нарастании физических и психоэмоциональных нагрузок именно эти пациенты обращаются за медицинской помощью в связи с участившимися или впервые возникшими, но упорно прогрессирующими головными болями, сопровождающимися признаками ВБН вплоть до приходящих нарушений мозгового кровообращения, обусловленных не только дисфункцией артериального, но и венозного кровотока [5, 14, 15]. Поэтому актуальность этого вопроса, несколько отступившего на второй план, в течение последних 30 лет вновь стала очевидной. Не исключено, что затрагивая пациентов трудоспособного возраста, возникновение нестабильности ШОП связано с современными условиями труда и жизнедеятельности, хотя, возможно, подобные условия лишь обостряют хроническую проблему, берущую начало в детстве: немаловажно учесть родовой анамнез (стремительные роды, стимуляция родовой деятельности, акушерское пособие, мануальные воздействия (тракции)). Поэтому важно разработать диагностический алгоритм для своевременного выявления сосудистых нарушений у пациентов с нестабильностью ШОП, возможно, начиная с детского возраста. Что касается лекарственной терапии, то использование вазоактивных

препаратов оправдано только в случае ВБН, обусловленной нарушением артериального притока. Если же есть признаки затруднения венозного оттока из полости черепа, то основным этапом лечения является применение веноотонических препаратов. При смешанном патогенезе ВБН приоритет остается за веноотониками, а затем подключают и вазоактивную терапию. Такая последовательность терапевтического применения препаратов согласуется с патогенезом развития синдрома ВЧГ на фоне ВД. В том случае, если ВД уже привела к формированию «предотечного» мозга и доброкачественному повышению ВЧД (по данным рентгенограммы черепа — усиление пальцевидных вдавлений, ЭхоЭГ — увеличение количества дополнительных эхосигналов, расширение III желудочка свыше 6 мм), следует использовать противоотечные препараты в совокупности с веноотониками, а только на втором этапе назначать вазоактивные. Таким образом, этапность лекарственной терапии должна быть согласована с результатами полученных инструментальных исследований.

Выводы

1. Основными патогенетическими последствиями нестабильности шейного отдела позвоночника, приводящей к формированию нарушения мозгового кровотока, является снижение артериального притока в вертебро-базиллярной системе и затруднение венозного оттока по позвоночным сплетениям, либо совокупность обоих механизмов.
2. Приоритетные направления лекарственной терапии должны соответствовать установленным особенностям патогенеза недостаточности мозгового кровообращения в каждом отдельном клиническом случае.

Список литературы

1. Мицкевич В.А. Патология шейного отдела позвоночника. Нестабильность шейного отдела позвоночника. *Consilium Medicum*. 2004; 6(8): 32-8.
2. Богородинский Д.К., Скоромец А.А. ред. *Краниовертебральная патология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. 286 с.
3. Ратнер А.Ю. *Родовые повреждения нервной системы*. Казань: Издательство Казанского Университета; 1985. 336 с.
4. Карлов В.А., Стулин И.Д., Богин Ю.Н. *Ультразвуковая и тепловизионная диагностика сосудистых поражений нервной системы*. М.: Медицина; 1986. 173с.
5. Шахнович А.Р., Шахнович В.А. Неинвазивная оценка венозного кровообращения мозга, ликвородинамики и краниовертебральных объемных соотношений при гидроцефалии. *Клиническая физиология кровообращения*. 2009; 3: 5-15.
6. Марголин А.Г. Шейные корешково-вегетативные синдромы и патология ретикулярной формации ствола

мозга. Тезисы докладов XXII научной сессии: Харьковский НИИ неврологии и психиатрии. Харьков; 1965: 35-6.

7. Динабург А.Д., Рубашева А.Е., Рабинович О.А. и др. *Заболевания нервной системы при дегенеративных процессах позвоночника*. Киев: Здоров'я; 1967. 388 с.

8. Скоромец А.А., Скоромец А.П., Скоромец Т.А., Тиссен Т.П. *Спинальная ангионеврология*. М.: Медпресс-информ; 2003. 608 с.

9. Попова Е.В., Иванов А.Ю., Панунцев В.С. и др. Возможности ультразвуковой диагностики гемодинамической перегрузки яремного бассейна у пациентов с вертебробазилярной недостаточностью. *Российский нейрохирургический журнал им. проф. А.Л. Поленова*. 2011; 3(1): 37-42.

10. Медведева Л.А., Дутикова Е.Ф., Шербакова Н.Е. и др. Комплексная патогенетическая терапия головных болей, обусловленных дегенеративно-дистрофическими изменениями шейного отдела позвоночника с явлениями венозного застоя. *Журнал Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2007; 11: 36-40.

11. Демидов Е. Ю. Значение патоморфологических исследований позвоночных артерий для оценки смерти плодов и новорожденных. В кн.: Родовые повреждения головного и спинного мозга. Тезисы докладов II Республиканской конференции по детской невропатологии. Казань; 1979; 28-31.

12. Луцик А.А., Раткин И.К., Никитин М.Н. *Краниовертебральные повреждения и заболевания*. Новосибирск; 1998. 345 с.

13. Чертков А.К., Климов М.Е., Нестеров М.В. К вопросу о хирургическом лечении больных с вертебробазилярной недостаточностью при аномалии Киммерле. *Хирургия позвоночника*. 2005; 1: 69-73.

14. Хорева Т.А. *Влияние привычного положения головы во время сна на показатели церебральной гемодинамики у больных с вертебрально-базилярной недостаточностью*. Дисс... канд. мед. наук. М.; 2006. 123 с.

15. Александрин В.В. Ауторегуляция мозгового кровотока в норме и в период ишемической гипоперфузии. *Патогенез*. 2012; 1(10): 27-30.

Поступила 03.03.15

References

1. Mytkevich V.A. Pathology of cervical spine. Cervical instability. *Consilium Medicum*. 2004; 6(8): 32-8. (in Russian)

2. Bogoroditskiy D.K., Skoromets A.A., eds. *Craniovertebral pathology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. 286 p. (in Russian)

3. Ratner A.Yu. *Generic damage of nervous system*. Kazan: Kazan University Publishing House; 1986. 336 p. (in Russian)

4. Karlov V.A., Stulin I.D., Bogin Yu.N. *Ultrasound and thermal diagnostics of nervous system's vascular lesions*. Moscow: Medicine Publishing House; 1986. 173 p. (in Russian)

5. Shahnovich A.R., Shahnovich V.A. Noninvasive assess of venous cerebral blood flow, dynamic of cerebrospinal fluid and craniovertebral proportions in patients with hydrocephalus. *Clinical physiology of circulation*. 2009; 3: 5-15. (in Russian)

6. Margolin A.G. Cervical radicular-vegetative syndromes and pathology of brain-stem's reticular formation. In.: Abstracts of XII scientific session: Kharkov research institute of neurology and psychiatry. Kharkov; 1965: 35-36. (in Russian)

7. Dinaburg A.D., Rubashova A.E., Rabinovich O.A. et al. *Neurological disorders at spine degeneration processes*. Kiev: Health Publ.; 1967. 388 p. (in Russian)

8. Skoromets A.A., Skoromets A.P., Tissen T.P. *Spinal angioneurology*. Moscow: Medpress-inform Publ; 2003. 608 p. (in Russian)

9. Popova E.V., Ivanov A.Yu., Panuntcev V.S. et al. Ultrasound diagnostic capabilities of jugular pools hemodynamic overload in patients with vertebra-basilar insufficiency. *Russian neurosurgery journal named prof. A.L. Poleniv*. 2011; 3(1): 37-42. (in Russian)

10. Medvedeva L.A., Duticova E.F., Sherbakova N.E. et al. Comprehensive pathogenic therapy of headaches caused by cervical degenerative-dystrophic changes with venous congestion. *Journal Neurology and Psychiatry named S.S. Korsakov*. 2007; 11: 36-40. (in Russian)

11. Demidov E.Yu. Pathomorphological studies of vertebral arteries value for assessment fetal and newborn death. In: Generic damages of brain and spinal cord. Abstracts of II Republican conferences on Children's Neurology. Kazan; 1979; 28-31. (in Russian)

12. Lutcik A.A., Ratkin I.K., Nikitin M.N. *Craniovertebral damages and disorders*. Novosibirsk: Novosibirsk Publ.; 1998. 345 p. (in Russian)

13. Chertkov A.K., Klimov M.E., Nesterov M.V. To the question about surgery of patients with vertebra-basilar insufficiency on Kimmerly anomaly. *Spine surgery*. 2005; 1: 69-73. (in Russian)

14. Khoreva T.A. Impact the usual position of the head during sleep on cerebral hemodynamics indexes in patients with vertebra-basilar insufficiency: diss. Moscow. 2006. 123 p. (in Russian)

15. Alexandrin V.V. Autoregulation of cerebral blood flow in normal and during the postischemic hypoperfusion. *Pathogenesis*. 2012; 1(10): 27-30. (in Russian)

Received 03.03.15

Сведения об авторах

Мусин Рашид Сяитович, д.м.н., проф., каф. нервных болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России

Гриненко Елена Анатольевна, к.м.н., науч. сотр., отделение реанимации ФГБНУ НИИ НХ им. акад. Н.Н. Бурденко

Морозов Сергей Георгиевич, д.м.н., проф., член-корреспондент РАН, руководитель лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии, заместитель директора по науке ФГБНУ НИИ ОПП

Кузник Б.И.¹, Богданов И.Г.², Исакова Н.В.¹, Серебрянский И.И.³, Касьяненко Н.В.²

Тромбодинамические свойства артериальной и венозной крови у больных ИБС в дооперационном и раннем послеоперационном периодах при выполнении коронарного шунтирования

¹ — ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, 672000, Чита, ул. Горького, 39 а

² — Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии, Россия, 680009, Хабаровск, ул. Краснодарская, 2 в

³ — ГемаКор, Россия, 125319, Москва, 4-я улица 8 марта, д. 3

В предоперационном периоде у больных ИБС отмечается значительное усиление тромбодинамических свойств фибринового сгустка. Больше чем у половины больных в дооперационном периоде как в артериальной, так и венозной крови выявляется спонтанный рост сгустка, что практически не наблюдается у здоровых людей. В раннем послеоперационном периоде у больных ИБС на фоне общего значительного снижения тромбодинамических свойств сгустка, в артериальной крови, по сравнению с венозной, они резко возрастают. На основании полученных данных авторы приходят к выводу, что у больных ИБС по показателям венозной крови нельзя судить о свойствах сгустка, образующегося в артериальной крови.

Ключевые слова: *больные ИБС, тромбодинамические свойства сгустка, артериальная и венозная кровь, дооперационный, послеоперационный периоды*

Kuznik B.I.¹, Bogdanov I.G.², Isakova N.V.¹, Serebrijskij I.I.³, Kas'janenko N.V.²

Thrombodynamic properties of arterial and venous blood in ischemic patients in preoperative and early postoperative periods after coronary artery bypass grafting

¹ — Chita State Medical Academy, 672000, Chita, 39a Gorky-st.

² — Federal Centre of CardioVascular Surgery, Khabarovsk, Russia

³ — Haemacore, Moscow, Russia

In the preoperative period ischemic patients show a significant increase in thrombodynamic properties of fibrin clots. It is more than at a half of patients in the presurgical period as in an arterial, and venous blood the spontaneous growth of a clot comes to light that is practically not observed at healthy people. In the early postoperative period ischemic patients demonstrate a general sharp decrease in thrombodynamic properties of fibrin clots, but in arterial blood, as opposed to venous blood, such properties sharply grow. Based on the data obtained it may be concluded that in ischemic patients venous blood levels cannot be used as a judgement for arterial blood fibrin clot properties.

Key words: *ischemic patients, fibrin clot thrombodynamic properties, arterial and venous blood, preoperative and postoperative periods*

Известно, что оперативные вмешательства на открытом сердце нередко приводят к развитию кровотечений и тромбозов. Так, при оперативных вмешательствах в условиях искусственного кровообращения (ИК) повышенная кровоточивость встречается в 5—25% случаев [1—5]. Более того, при реторакотомиях, выполняемых для остановки кровотечений, хирургический источник выявляется только в 75% случаев [1]. Указывается [6], что наиболее распространенными причинами геморрагий после кардиохирургических операций в условиях искусственного кровообращения являются различные нарушения тромбодинамического звена системы гемостаза (34%), активация фибринолиза (29%), нарушения коагуляции (21%) и сочетанные нарушения свертывающей системы крови (10%). На долю рикошетного эффекта гепарина и ДВС как причин повышенной кровоточивости приходится 3 и 1% всех случаев кровоточивости соответственно.

Не меньшую опасность представляют тромбозы. Так, распространенность инсульта в послеоперационном периоде при операциях на сердце составляет 2%. При сахарном диабете, атеросклерозе сонных артерий риск инсульта достигает 8% [7].

Для корреспонденции: Кузник Борис Ильич, д.м.н., проф., засл. деятель науки РФ, проф. каф. нормальной физиологии, e-mail: bi_kuznik@mail.ru

Следует обратить внимание на то, что тромбозы при оперативных вмешательствах на сердце могут возникать как в артериальном, так и венозном русле. В частности, у 5—15% пациентов на протяжении года после перенесенной операции коронарного шунтирования выявляются окклюзионно-тромботические поражения аутовенозных кондуитов, что во многом связано с развитием гиперкоагуляции [8, 9]. Согласно данным S. Rafiq et al., после оперативного вмешательства на сердце, гиперкоагуляционные сдвиги за 30-дневный период наблюдения встречаются в 43,5% случаев.

До последнего времени для оценки состояния системы гемостаза при оперативных вмешательствах на сердце кровь для исследования бралась из венозного русла, хотя реконструкции, как правило, подвергались артерии. Вместе с тем, нашими прежними исследованиями [11—15] установлено, что в венозной крови у здоровых людей процессы коагуляции и фибринолиза протекают несколько интенсивнее, чем в артериальной. Однако при сердечно-сосудистых заболеваниях эта закономерность проявляется далеко не всегда [11, 15]. Более того, преобладание интенсивности свертывания крови и способности к растворению фибринового сгустка в артериальной и венозной крови во многом зависит от наличия и распространенности окклюзий в различных кровеносных сосудах [12, 13, 15].

Цель исследования — изучение состояния свертывающей системы крови, взятой из артерии и вены, у больных ИБС, подвергшихся оперативному вмешательству на открытом сердце.

Методика

Наблюдения проведены на 25 больных ИБС (18 мужчинах и 7 женщинах) в возрасте от 42 до 75 лет, находящихся на лечении в Федеральном центре сердечнососудистой хирургии г.Хабаровска. Недостаточность кровообращения по NYHA у 22 пациентов соответствовала II ФК и у 3 чел. — III ФК. У всех больных в качестве фоновой патологии отмечалось наличие гипертонической болезни III стадии. Гемодинамически значимые поражения артерий других бассейнов (каротидного или подвздошно-бедренного) наблюдались у 9 пациентов. 13 пациентов в прошлом перенесли острый инфаркт миокарда, а 7 чел. — острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК). По данным коронарографии, в 8 случаях отмечено стенотическое, а в 17 — окклюзионно-стенотическое поражение коронарных артерий. Двум пациентам ранее осуществлялось стентирование коронарной артерии с неудовлетворительными отдаленными результатами (в одном случае рестеноз в стенте, во втором — окклюзия).

У всех пациентов за 5—11 дней до операции отменялись дезагреганты, применяемые ранее до поступления в стационар.

Все пациенты подверглись коронарному шунтированию. 22 операции осуществлены с использованием искусственного кровообращения и 3 — на работающем сердце с применением стабилизаторов миокарда. В 21 случае выполнено аутоартериальное и аутовенозное шунтирование, в одном случае — изолированное аутоартериальное, в трех случаях — аутовенозное шунтирование. В семи случаях в связи с крайне выраженным атеросклерозом сосудов сердца во время операции выполнялась эндартерэктомия из коронарных артерий с последующим шунтированием. При этом в 5 случаях эндартерэктомия касалась бассейна правой коронарной артерии, в одном — двух коронарных бассейнов (правая коронарная артерия и ветвь тупого края), и в одном — передней нисходящей артерии. В одном из вышеперечисленных случаев атеросклеротическая бляшка в просвете содержала организующийся тромб.

Во время операции при искусственном кровообращении использован нефракционированный гепарин из расчета 3 мг/кг массы тела пациента, а при операциях на работающем сердце — 1—1,5 мг/кг массы тела. Сразу после окончания основного этапа операции гепарин был нейтрализован введением соответствующей расчетной дозы протамин-сульфата. После окончания оперативного вмешательства на протяжении 3—5 сут. применялся клексан из расчета по 40 мг 2 раза в сутки утром и вечером; начиная со следующего дня после операции всем назначали аспирин (кардиомагнил) и статины (аторвастатин или розувастатин). Части больных по показаниям назначали клопидогрель (после эндартерэктомии).

У всех больных для оценки состояния системы гемостаза в артериальной и венозной крови был использован способ измерения пространственного роста фибринового сгустка, регистрируемого с помощью прибора «Регистратор Тромбодинамики Т-2» [16—18]. Тест тромбодинамика — глобальный тест свертывающей системы крови, основанный на видеорегистрации роста фибринового сгустка от имитированной поврежденной стенки сосуда, представленной пластиковой поверхностью с нанесенным на нее монослоем тканевого фактора (ТФ). После соприкосновения ТФ с плазмой пациента запускается рост фибринового сгустка, оценка которого позволяет характеризовать коагуляционный потенциал свертывающей системы крови больного. При этом сгусток формируется и растет от иммобилизованного на поверхности ТФ в неперемешиваемом тонком слое свободной от тромбоцитов плазмы, содержащей ингибитор контактной активации. В реальном времени и масштабе идет видеосъемка процесса роста сгустка, после чего про-

граммное обеспечение путем обработки видеофильма рассчитывает численные показатели характеризующие этот процесс. Одновременно автоматически программой анализируются следующие параметры:

- T_{lag} — задержка роста сгустка;
- V_i — начальная скорость его роста;
- V_s — стационарная скорость роста;
- V — скорость роста;
- D — его плотность;
- T_{sp} — время начала спонтанного зарастания;
- CS_{30} — размер основного сгустка на 30 мин.

Кроме того, программой предусмотрена фоторегистрация образа основного сгустка, а также спонтанно образующихся сгустков на 5-й, 15-й и 30-й мин.

Измерение тестов, характеризующих состояние свертывающей системы крови, проводилось в двух контрольных точках: непосредственно перед началом и через 3—6 ч после окончания операции, когда эффект нефракционированного гепарина инактивировался протамином. Кровь для исследования из артерии и вены забиралась одновременно. Забор осуществлялся через катетеры после предварительного удаления гепариновой пробки и дополнительного промывания физиологическим раствором.

Статистический анализ проведен с использованием пакета программ «Statistica 10.0» (StatSoft Inc., США). При сравнении групп применялся критерий Вилкоксона. Различия считались значимыми при $p < 0,05$ и вероятными при $P < 0,1$.

Результаты и обсуждение

Сведения о состоянии темпов роста, размеров и плотности сгустка в артериальной и венозной крови перед началом оперативного вмешательства представлены в табл. 1.

Как видно из представленных данных, у больных ИБС до операции не выявлено существенных отличий в тромбодинамических параметрах фибринового сгустка, образованного из артериальной и венозной крови.

В следующей серии наблюдений прослежен процесс формирования фибриновых сгустков, полученных из артериальной и венозной крови, у больных ИБС в послеоперационном периоде (табл. 2).

Результаты этой серии наблюдений коренным образом отличаются от предыдущих: в артериальной крови по сравнению с венозной начальная и общая скорость образования фибринового сгустка оказалась увеличенной, а время задержки начала роста сгустка значительно уменьшенным. Кроме того, у таких больных в крови, полученной из артерии, увеличился размер сгустка. Наконец, в артериальной крови чаще, чем в венозной, выявлялся дополнительный спонтанный рост сгустков.

Значительный интерес, на наш взгляд, представляют сравнительные результаты исследования тромбодинамических свойств сгустка, полученного из артериальной и венозной крови, в дооперационном и раннем послеоперационном периодах (табл. 3).

Таблица 1

Тромбодинамические показатели артериальной и венозной крови у больных ИБС до операции [Median 25%;75%]

Исследуемые параметры	Артериальная кровь	Венозная кровь
Скорость роста сгустка, мкм/мин	58,5 (17,6; 75,8)	51,2 (16,7; 74,7)
Начальная скорость роста сгустка, мкм/мин	58,5 (27,5; 75,8)	59,9 (26,9; 75,8)
Стационарная скорость роста сгустка, мкм/мин	17,9 (12,5; 26,5)	17,5 (15,4; 21,9)
Время задержки начала роста сгустка, мин	1,0 (0,9; 1,0)	1,0 (0,9; 1,1)
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	718 (486; 888)	713 (611; 915)
Плотность фибринового сгустка через 30 мин, ус. ед.	25196 (22832; 27619)	24856 (21879; 28358)
Появление спонтанных сгустков, число случаев	11	13

Таблица 2

Тромбодинамические показатели артериальной и венозной крови у больных ИБС после операции [Median 25%;75%]

Исследуемые параметры	Артериальная кровь	Венозная кровь
Скорость роста сгустка мкм/мин	13,9 (10,5; 23,0)	12,45 (9,5; 13,9) $P < 0,064$
Начальная скорость роста сгустка, мкм/мин	34,6 (18,7; 52,2)	29,3 (19,55; 36,0) $P = 0,017$
Стационарная скорость роста сгустка, мкм/мин	12,4 (10,5; 17,2)	12,45 (9,5; 13,9)
Время задержки начала роста сгустка, мин	1 (0,9; 1,1)	1,2 (1,0; 1,2) $P = 0,001$
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	658 (487; 878)	603 (474; 708) $P = 0,048$
Плотность фибринового сгустка через 30 минут	21394 (19095; 233990)	21733 (20616; 23517)
Появление спонтанных сгустков, число случаев	4	1

Как видно из представленных данных, все без исключения показатели, характеризующие тромбодинамические свойства сгустка, в раннем послеоперационном периоде как в артериальной, так и в венозной крови уменьшаются или (в артериальной крови) имеют тенденцию к снижению.

Как же могут быть интерпретированы полученные данные?

Прежде всего, мы хотим обратить внимание на тот факт, что больше чем у половины больных в дооперационном периоде как в артериальной, так и в венозной крови наблюдается спонтанный рост сгустка, что практически не выявляется у здоровых людей [15—18]. Этот факт свидетельствует о чрезвычайной тромбоопасности пациентов, которым предстоит оперативное вмешательство на сердце. Спонтанный рост фибринового сгустка обусловлен значительным числом микровезикул, несущих на своей поверхности ТГ и являющихся плацдармом для спонтанного возникновения тромбов и эмболов в сосудистом русле [19—23].

В предыдущих работах мы неоднократно отмечали, что в норме в кровотоке происходит постоянное фоновое внутрисосудистое свёртывание крови [14, 19, 24—26]. Эта реакция у здоровых людей более интенсивно осуществляется в венозной крови, что обусловлено наличием в последней большего числа микровезикул, несущих и не несущих тканевой фактор [12—14], а также сдвигом рН в кислую сторону [27]. Подобная тенденция отсутствует у обследуемых нами больных ИБС непосредственно перед операцией. Вместе с тем у таких пациентов в венозной крови наблюдается небольшая тенденция к задержке

темпов роста сгустка, что, по нашему мнению, обусловлено более значительным потреблением тромбоцитов и плазменных факторов в процессе усиленного постоянного внутрисосудистого свёртывания крови [19, 20, 25].

В раннем послеоперационном периоде темпы роста сгустка усиливаются в артериальной крови, что связано непосредственно с оперативным вмешательством, направленным на восстановление кровотока в артериальном русле. Подобные действия должны непременно сопровождаться травмированием артерий и появлением продуктов разрушения тканей, несущих тканевой фактор. Не исключено, что обрывки клеточных мембран (микрочастицы или микровезикулы), появляющиеся при оперативном вмешательстве, образуют агрегаты [20], в значительной степени застревающие в капиллярном русле и в меньшем количестве поступающие в венозную кровь, чем и объясняется более медленное формирование фибриновых сгустков в крови, взятой из вены.

Считаем нужным обратить внимание на то, что в раннем послеоперационном периоде тромбодинамические характеристики сгустков в образцах как из артериальной, так и венозной крови резко снижаются. Полученные данные, на наш взгляд, могут быть объяснены следующим образом:

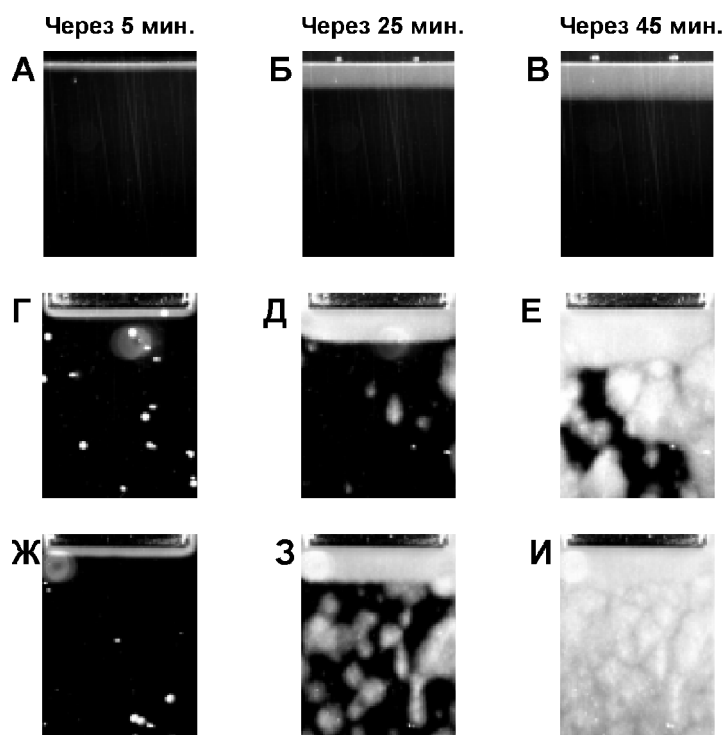
1. При оперативном вмешательстве на сердце происходит существенная кровопотеря, достигающая в отдельных случаях 300—500 мл. При этом в кровеносное русло поступает тканевая жидкость, в которой концентрация факторов свёртывания резко снижена [7, 20].

Таблица 3

Сравнительные характеристики тромбодинамических параметров фибринового сгустка, образованного из артериальной и венозной крови в до- и раннем послеоперационном периодах [Median 25%;75%]

Исследуемые параметры	Артериальная кровь		Венозная кровь	
	1	2	1	2
Скорость роста сгустка, мкм/мин	58,5 (17,6; 75,8)	13,9 (10,5; 23,0) P = 0,01	51,2 (16,7; 74,7)	12,45 (9,5; 13,9) P<0,001
Начальная скорость роста сгустка, мкм/мин	58,5 (27,5; 75,8)	34,6 (18,7; 52,2) P<0,09	59,9 (26,9; 75,8)	29,3 (19,5; 36,0) P = 0,001
Стационарная скорость роста сгустка, мкм/мин	17,95 (12,55; 26,5)	12,4(10,5; 17,2) P<0,07	17,5 (15,4; 21,9)	12,45 (9,5; 13,9) P = 0,016
Время задержки начала роста сгустка, мин	1,0 (0,9; 1,0)	1,0 (0,9; 1,1)	1,0 (0,9; 1,1)	1,2 (1,0; 1,2) P = 0,002
Размер фибринового сгустка через 30 мин, мкм	718 (486; 888)	658 (487; 878)	713 (611; 915)	603 (474; 708) P = 0,028
Плотность фибринового сгустка через 30 мин, ус.ед.	25196 (22832; 27619)	21394 (19095; 23399) P = 0,003	24856 (21879; 28358)	21733 (20616; 23517) P<0,001
Появление спонтанных сгустков, число случаев	11	4	13	1

Примечание. 1 — данные, полученные в предоперационном периоде; 2 — данные, полученные в раннем послеоперационном периоде.



Фотографии роста фибринового сгустка:

А–В — рост сгустка в венозной крови здорового; Г–Е — в артериальной крови больного; Ж–И — в венозной крови больного). Объяснение в тексте.

2. Кровопотеря замещается инфузией объемозамещающих растворов, и при этом большинство операций на сердце с применением аппарата искусственного кровообращения проводится с положительным гидробалансом, что сопровождается существенным разведением крови [15, 16].

3. В процессе оперативного вмешательства из-за травмы и кровопотери в кровоток поступают продукты разрушения тканей, а также проявляется экспрессия тканевого фактора активированным эндотелием, макрофагами и моноцитами, что приводит к усилению внутрисосудистого свёртывания крови и к развивающейся ограниченной коагулопатии потребления [12, 14, 19, 20]. При этом, как правило, развивается вторичная гипокоагуляция, что отмечается и в наших наблюдениях.

4. С большой осторожностью можно допустить, что у больных в послеоперационном периоде регистрируются следовые эффекты гепарина.

К сожалению, на основании полученных нами данных нельзя решить вопрос, какой из указанных факторов, приводящих к ослаблению тромбодинамических свойств сгустка, является ведущим. Этому вопросу будут посвящены последующие исследования.

В заключение мы хотим продемонстрировать, как осуществляется рост сгустка в венозной крови у здорового человека и больного ИБС (диагноз: Мульти-

фокальный атеросклероз. Оклюзия поверхностной бедренной артерии слева. ХИНК III ст. ИБС. Стабильная стенокардия напряжения II ФК) в артериальной и венозной крови (рисунок).

У здорового человека рост сгустка происходит от иммобилизованного на поверхности тканевого фактора (светлая полоса). У больного ИБС и в артериальной, и в венозной крови сгусток растет и от иммобилизованного на поверхности тканевого фактора, и из центра кюветы, заполняя через 45 минут после начала исследования практически всю кювету, что, безусловно, связано с наличием в плазме больного значительного числа микровезикул, несущих тканевой фактор.

Полученные данные еще раз подтверждают, что по показателям венозной крови у больных ИБС независимо от наличия или отсутствия окклюзий периферических артерий нельзя судить о тех изменениях, которые возникают в системе гемостаза в артериальной крови, притекающей к сердцу.

Выводы

1. У больных ИБС в предоперационном периоде наблюдается резкое усиление тромбодинамических свойств фибринового сгустка как в венозной, так и в артериальной крови.

2. В раннем послеоперационном периоде тромбодинамические свойства сгустка, поученного как из артериальной, так и венозной крови, по сравнению с дооперационным периодом резко ослабляются.

3. Через 3—6 ч после окончания операции тромбодинамические свойства сгустка из артериальной крови по сравнению с венозными значительно усилены.

4. По показателям венозной крови у больных ИБС не всегда можно судить о состоянии свёртывающей системы артериальной крови.

Список литературы

1. Локшин Л.С., Лурье Г.О., Дементьева И.И. *Искусственное и вспомогательное кровообращение в сердечнососудистой хирургии*. М.; 1998.

2. Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Сандриков В.А., Чарная М.А., Гончарова А.В., Федулова С. Проблема церебральных микроэмболических осложнений у кардиохирургических больных и реологические методы. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2010; 3: 51-4.

3. Мамаева С.А., Пичугин В.В., Богуш А.В., Пичугина М.В., Волкова Н.А. Применение препарата протромплекс 600 для лечения кровотечений во время и после реконструктивных операций на сердце и сосудах в условиях искусственного кровообращения. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2012; 1: 47-54.

4. Paparella D., Brister S.J., Bushaman M.R. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med*. 2004; 10; 1873-81.

5. Herwaldt L.A., Swartzendruber S.K., Zimmerman M.B., Scholz D.A. et al. Hemorrhage after coronary artery bypass graft procedures. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 1: 44-50.

6. Дементьева И.И., Чарная М.А., Морозов Ю.А., Трекова Н.А. *Использование гемостатика НовоСэвен® у больных с массивной геморрагией при крупных хирургических вмешательствах*. М., МАКС Пресс; 2004.

7. Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Сандриков В.А., Чарная М.А., Гончарова А.В., Федулова С. Проблема церебральных микроэмболических осложнений у кардиохирургических больных и реологические методы. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2010; 3: 51-4.

8. Damgaard S., Wetterslev J., Lund J.T. et al. One-year results of total arterial revascularization vs. conventional coronary surgery. *CARRPO trial. Eur Heart J*. 2009; 30: 1005-11.

9. Desai N.D., Cohen E.A., Naylor C.D., Fremes S.E. A randomized comparison of radial-artery and saphenous-vein coronary bypass grafts. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2302-09. doi: 1056/NEJMoa040982.

10. Rafiq S., Johansson P.I., Ostrowski S.R., Stissing T., Steinbruechel D.A. Hypercoagulability in patients undergoing coronary artery bypass grafting: prevalence, patient characteristics and postoperative outcome. *Eur. J Cardiothorac Surg*. 2012; Mar;41(3): 550-5. doi: 10.1093/ejcts/ezr001. Epub 2011 Oct 18.

11. Кузник Б.И., Савельева Т.В., Куликова С.В. Некоторые вопросы регуляции свёртывания крови. *Физиология человека*. 1976; 5: 857-65.

12. Бышевский А.Ш., Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Савельева Т.В., Рудзевич А.Ю., Лиханов И.Д. и др. Коагуляционная активность надмолекулярных частиц, циркулирующих в кровотоке, свёртываемость артериальной и венозной крови, интенсивность

липопероксидации и толерантность к тромбину. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2007; 4: 33-8.

13. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Порушничак Е.Б., Солпов А.В., Роднина О.С. Состояние сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарных взаимоотношений и свёртываемости крови, взятой из различных бассейнов сосудистого русла у больных ИБС. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2009; 2: 50-60.

14. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита: Экспресс-издательство; 2010.

15. Кузник Б.И., Исакова Н.В., Порушничак Д.Е., Серебрянский И.И., Богданов И.Г. Основные показатели свертывающей и фибринолитической активности крови и пространственной структуры фибринового сгустка у больных с сердечнососудистой патологией в артериальной и венозной крови. *Проблемы клинической медицины*. 2013; 3-4: 10-7.

16. Пантелеев М.А. Пространственная динамика гемостаза и тромбоза: теория и практика. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2010; 4: 48-53.

17. Пантелеев М.А. *Практическая коагулология*. М.: Практическая медицина; 2011.

18. Сошитова Н.П. Использование глобальных методов оценки состояния гемостаза при сепсисе. *Проблемы клинической медицины*. 2012; 1-4: 27-35.

19. Зубаиров Д.М. *Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования*. Казань; 2000.

20. Зубаиров Д.М., Зубаирова Л.Д. *Микровезикулы в крови, функция и их роль в тромбообразовании*. М.: Гэотар-Медиа; 2009.

21. Lopez J.A., Del Conde I., Shrimpton C.N. Receptor, rafts and microvesicles in thrombosis and inflammation. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 8: 1737-64.

22. Werner N., Wassmann S., Ahlers P. et al. Circulation CD31+annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and vasc. Biol*. 2006; 1: 11-6.

23. Байкеев Р.М. *Тромбопластин*. М.: Наука; 1995.

24. Бышевский А.Ш. О непрерывном осуществлении процесса свёртывания крови. *Гематол. и трансфузиол*. 1984; 7: 36-40.

25. Зубаиров Д.М. Современные доказательства концепции непрерывного свёртывания крови в организме. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2010; 1: 17-21.

26. Бокарев И.Н., Попова Л.В., Козлова Т.В. *Тромбозы и противотромботическая терапия в клинической практике*. М.: Мед. информ. агентство; 2009.

27. Альфонсов В.В., Бочарникова Н.В., Альфонсова Е.В., Стасюк О.Н. *Ацидоз, гемостаз и морфология органов пищеварительной системы*. Чита; 2005.

Поступила 03.03.15

References

1. Lokshin L.S., Lur'e G.O., Dement'eva I.I. *Artificial and an artificial circulatory support in cardiovascular surgery. [Iskusstvennoe i vspomogatel'noe krovoobrashhenie v serdchnosudosudistoj hirurgii]* M; 1998.

2. Dement'eva I.I., Morozov Ju.A., Sandrikov V.A., Charnaja M.A., Goncharova A.V., Fedulova S. Problem of cerebral microembolic complications at cardiac patients and rheologic methods. *Patologija krovoobrashhenija i kardiokhirurgija*. 2010; 3: 51-4.

3. Mamaeva S.A., Pichugin V.V., Bogush A.V., Pichugina M.V., Volkova N.A. Application of a preparation protrompleks 600 for treatment of bleedings in time and after reconstructive heart operations and vessels in the conditions of artificial blood circulation. *Tromboz, gemostaz i reologija*. 2012; 1: 47-54.
4. Paparella D., Brister S.J., Bushaman M.R. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med*. 2004;10; 1873-81.
5. Herwaldt L.A., Swartzendruber S.K., Zimmerman M.B., Scholz D.A. et al. Hemorrhage after coronary artery bypass graft procedures. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 1: 44-50.
6. Dement'eva I.I., Charnaja M.A., Morozov Ju.A., Trekova H.A. Use a haemostatics of Novoseven® at patients with a massive gemorragiya at large surgical interventions. [Ispol'zovanie gemostatika NovoSjeven® u bol'nyh s massivnoj gemorragiej pri krupnyh hirurgicheskikh vmeshatel'stvah] M., MAKS Press; 2004.
7. Dement'eva I.I., Morozov Ju.A., Sandrikov V.A. Charnaja M.A., Goncharova A.V., Fedulova S. Problem cerebral the microembolia of complications at cardiac patients and rheological methods. *Patologija krovoobrashhenija i kardiohirurgija*. 2010; 3: 51-4.
8. Damgaard S., Wetterslev J., Lund J.T. et al. One-year results of total arterial revascularization vs. conventional coronary surgery. *CARRPO trial. Eur Heart J*. 2009; 30: 1005-11.
9. Desai N.D., Cohen E.A., Naylor C.D., Fremes S.E. A randomized comparison of radial-artery and saphenous-vein coronary bypass grafts. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2302-09. doi: 1056/NEJMoa040982.
10. Rafiq S., Johansson P.I., Ostrowski S.R., Stissing T., Steinbruchel D.A. Hypercoagulability in patients undergoing coronary artery bypass grafting: prevalence, patient characteristics and postoperative outcome. *Eur. J Cardiothorac Surg*. 2012; Mar;41(3): 550-5. doi: 10.1093/ejcts/ezr001. Epub 2011 Oct 18.
11. Kuznik B.I. Savel'eva T.V. Kulikova S.V. Some questions of regulation of folding of blood. *Fiziologija cheloveka*. 1976; 5: 857-65.
12. Byshevskij A.Sh., Kuznik B.I., Vitkovskij Ju.A., Savel'eva T.V., Rudzevich A.Ju., Lihanov I.D. i dr. Coagulative activity of the supramolecular particles circulating in a blood-groove, coagulability of an arterial and venous blood, intensity of a lipoperoksidation and tolerance to thrombin. *Tromboz, gemostaz i reologija*. 2007; 4: 33-8.
13. Kuznik B.I., Vitkovskij Ju.A., Porushnichak E.B., Solpov A.V., Rodnina O.S. State vascular thrombocytic a hemostasis, leykotsit-eritrotsit-trombotsit relationship and coagulability of the blood taken from various basins of the vascular course from sick IBS. *Tromboz, gemostaz i reologija*. 2009; 2: 50-60.
14. Kuznik B.I. *Cellular and molecular mechanisms of regulation of system of a hemostasis in norm and pathology. [Kletochnye i molekulyarnye mehanizmy reguljacji sistemy gemostaza v norme i patologii]* Chita: Jekspress-izdatel'stvo; 2010.
15. Kuznik B.I., Isakova N.V., Porushnichak D.E., Serebrijskij I.I., Bogdanov I.G. The main indicators of the curtailing and fibrinolytic activity of blood and spatial structure of a fibrinous clot at patients with cardiovascular pathology in an arterial and venous blood. *Problemy klinicheskoy mediciny*. 2013; 3-4: 10-7.
16. Pantelev M.A. Spatial dynamics of a hemostasis and thrombosis: theory and practice. *Tromboz, gemostaz i reologija*. 2010; 4: 48-53.
17. Pantelev M.A. *Practical koagulologiya [Prakticheskaja koagulologija]* M.: Prakticheskaja medicina; 2011.
18. Soshitova N.P. Use of global methods of an assessment of a condition of a hemostasis at sepsis. *Problemy klinicheskoy mediciny*. 2012; 1-4: 27-35.
19. Zubairov D.M. *Molecular bases of folding of blood and thrombosis. [Molekuljarnye osnovy svjortyvanija krovi i tromboobrazovanija]* Kazan'; 2000.
20. Zubairov D.M., Zubairova L.D. *Microparticles in blood, function and their role in a thrombosis. [Mikrovezikuly v krovi, funkcija i ih rol' v tromboobrazovanii]* M.: Gjeotar-Media; 2009.
21. Lopez J.A., Del Conde I., Shrimpton C.N. Receptor, rafts and microvesicles in thrombosis and inflammation. *J. Thromb. Haemost*. 2005; 8: 1737-64.
22. Werner N., Wassmann S., Ahlers P. et al. Circulation CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and vasc. Biol*. 2006; 1: 11-6.
23. Bajkeev R.M. *Thromboplastin. [Tromboplastin]* M.: Nauka; 1995.
24. Byshevskij A.Sh. About continuous implementation of process of folding of blood. *Gematol. i transfuziol*. 1984; 7: 36-40.
25. Zubairov D.M. Modern proofs of the concept of continuous folding of blood in an organism. *Tromboz, gemostaz i reologija*. 2010; 1: 17-21.
26. Bokarev I.N., Popova L.V., Kozlova T.V. *Thromboses and antithrombotic therapy in clinical practice. [Trombozy i protivotromboticheskaja terapija v klinicheskoy praktike]* M.: Med. inform. agentstvo; 2009.
27. Al'fonsov V.V., Bochkarnikova N.V., Al'fonsova E.V., Stasjuk O.N. *Acidosis, hemostasis and morphology of bodies of a gastrointestinal tract. [Acidoz, gemostaz i morfologija organov pishhevaritel'noj sistemy]* Chita; 2005.

Received 03.03.15

Сведения об авторах

Исакова Наталья Викторовна, к.м.н., доцент каф. патологической физиологии Читинской гос. мед. академии.672000, Чита, Горького 39а, медакадемия, кафедра патологической физиологии. E-mail: inv76-01@mail.ru

Серебрянский Илья Исаакович, врач-гематолог, руководитель отдела клинических исследований. 125319. Москва, 4-я улица 8 марта, дом 3, ГЕМАКОР, e-mail: serebriysky@mail.ru

Богданов Илья Геннадьевич, к.м.н., врач сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения № 4, Хабаровск, e-mail: bogdanovig@mail.ru

Касьяненко Наталья Владимировна, врач-лаборант клиничко-диагностической лаборатории, e-mail: denisko_n@mail.ru

Бондаренко Л.А., Мищенко Т.В.

Динамика изменений суточного ритма артериального давления при гипопинеализме

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского НАМН Украины», 61002, Харьков, ул. Артема, 10

В статье приводятся оригинальные данные относительно характера изменений артериального давления (АД) у кроликов с гипопинеализмом, индуцированным длительным круглосуточным освещением. У подопытных животных регистрируется нивелирование суточного ритма АД прежде всего за счет повышения этого показателя в темное время суток (ночь, вечер), а также формирование артериальной гипертензии по типу «non-dipper».

Ключевые слова: артериальное давление; артериальная гипертензия; суточные ритмы

Bondarenko L.A., Mishchenko T.V.

Dynamics of daily rhythm changes of arterial blood pressure in hypopinealism

SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», 61002, Ukraine, Kharkov

The article presents the original data on the character of the changes in arterial blood pressure (ABP) in rabbit with hypopinealism induced by long 24-hour lighting. In experimental animals registered leveling the daily rhythm of ABP primarily because of increase this value in dark time (night, evening) and formation of arterial hypertension by «non-dipper».

Key words: arterial blood pressure; arterial hypertension; daily rhythms

Гипопинеализм представляет собой нейроэндокринное заболевание, характеризующееся снижением биосинтеза всех биологически активных веществ. Он бывает возрастной, который регистрируется у лиц пожилого возраста либо у животных на нисходящем этапе онтогенеза, а также приобретенный, возникающий, как правило, в результате сильно и/или длительно действующего стресса [1]. Истинным гормоном пинеальной железы считается мелатонин, обладающий множеством физиологических и фармакологических эффектов [2], среди которых важное место занимает его антигипертензивное действие [3, 4].

В наших предыдущих исследованиях, проведенных на молодых половозрелых кроликах — самцах с гипопинеализмом, индуцированным круглосуточным освещением [5, 6], при однократном измерении артериального давления (АД) в дневное время было установлено развитие артериальной гипертензии (АГ) в отдаленные (4—5 мес.) сроки после начала световой экспозиции [7]. Определение суточных изменений АД имеет важное значение, поскольку от-

крывает дополнительные диагностические возможности, позволяет точнее верифицировать начальные отклонения в течение суток, особенно в процессе развития гипертонической болезни.

На основе проведенного суточного мониторинга АД у практически здоровых и больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) была разработана классификация, согласно которой всех пациентов в зависимости от характера изменений АД разделили на 4 группы: «dippers» (норма), «non-dippers» (нивелирование ритма), «inverted-dippers» (инверсия ритма) и «extreme-dippers» (чрезмерное снижение АД ночью).

Показано, что тип «non-dippers» развивается преимущественно у лиц, которые ведут ночной способ жизни. У особ этой группы со временем развивается гипертоническая болезнь, а также выявляется высокий риск появления и дальнейшего прогрессирования хронической почечной недостаточности [8]. Вместе с тем, мы не встречали экспериментальных моделей АГ согласно данной классификации, что важно при проведении доклинических испытаний лекарственных средств с антигипертензивным действием.

Цель исследования — установление динамики суточных изменений АД в процессе длительного круглосуточного освещения, а также выявление типа АГ при гипопинеализме.

Для корреспонденции: Мищенко Татьяна Владимировна, аспирант лаб. хроноэндокринологии ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского НАМН Украины», e-mail: Mishchenko2707@ukr.net

Методика

Исследование выполнено на 12 молодых половозрелых кроликах, которых содержали в стандартных условиях вивария. После установления показателей АД в исходном состоянии (в условиях естественной смены дня и ночи) животных поместили в условия круглосуточного освещения с целью моделирования экспериментального гипопинеализма: днем использовали естественный солнечный свет, а ночью — электрический. Интенсивность освещения в клетках была небольшой и составляла 30—40 люкс. Продолжительность эксперимента — 10 мес. Измерение артериального давления производили на центральной артерии уха по методу [9] в нашей модификации [10] ежемесячно, 4 раза в сутки: утром, днем, вечером и ночью. Использование модифицированного нами аппарата позволяет производить измерение АД не только в светлое время суток при естественном солнечном свете, но и в темное — при красном свете, который (в отличие от электрического белого) практически не оказывает угнетающего влияния на мелатонинообразующую функцию пинеальной железы, сохраняя таким образом формирование ночного пика мелатонина и поступление его в систему кровообращения. Статистическую обработку данных осуществляли при помощи пакета программ Biostat 4.03 с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Особенности суточных изменений кровяного давления у подопытных животных в ходе эксперимента представлены в таблице, из которой следует, что для интактных кроликов характерно наличие суточного ритма АД с максимумом в светлое время суток и минимумом в темное аналогично тому, как это установлено для здоровых людей репродуктивного возраста [11—13].

Как следует из таблицы, в течение 1-го месяца после начала эксперимента АД статистически не отличалось от нормы; в этот срок наблюдения сохранялся и суточный его ритм. Через 2 мес. после начала световой экспозиции абсолютные значения АД утром, днем и вечером хотя немного и превышали исходные показатели, но укладывались в коридор индивидуальных колебаний, характерных для контрольных животных. Вместе с тем, при измерении АД ночью уже через 2 мес. после начала эксперимента зафиксировано увеличение этого показателя ($P_{I-III} < 0,05$), который составлял 109% по отношению к АД в исходном состоянии, условно принятому за 100%. Через 3 мес. после начала круглосуточного освещения у подопытных кроликов показатели АД в светлое время суток (утро, день) еще статистически не отличались от исходных значений, но в темное (вечер, ночь) — уже

значительно их превышали ($P_{I-IV} < 0,05$ вечером и $P_{I-IV} < 0,001$ ночью), составляя 110,7% и 122,6% соответственно. Содержание подопытных кроликов в условиях круглосуточного освещения в течение 4 мес. приводило к еще более выраженному увеличению АД вечером ($P_{I-V} < 0,05$), которое составляло 118,2% по отношению к контролю при сохранении повышенного АД ночью ($P_{I-V} < 0,001$; 122,8%). В этот срок наблюдения обращает на себя внимание увеличение АД уже и в утренние часы ($P_{I-V} < 0,05$), которое составило 107,5% относительно исходного состояния. Увеличение срока наблюдения до 6 мес. кардинально не изменило картину суточного ритма АД по сравнению с предыдущим сроком, поскольку показатели АД утром, вечером и ночью были повышены ($P_{I-VI} < 0,05$; $P_{I-VI} < 0,001$ и $P_{I-VI} < 0,001$), составляя соответственно 107,7%; 114,0% и 127,8%. Даже спустя полгода после начала светового воздействия показатели АД днем у подопытных животных еще статистически не отличались от нормы, хотя по абсолютным значениям и были на 5,9% выше, чем в исходном состоянии. Лишь через 8 мес. после начала эксперимента показатель АД днем статистически стал выявлять тенденцию к увеличению ($0,05 < P_{I-VII} < 0,1$) на фоне слишком высокого АД вечером и ночью ($P_{I-VII} < 0,001$ в обоих случаях). В этот срок наблюдения АД составляло 108,4% днем, 123,6% вечером и 129,9% ночью относительно показателей в исходном состоянии. Через 9 мес. у кроликов с гипопинеализмом АД было повышено в любое время суток, составляя 109,5% утром, 112% днем, 130,3% вечером и 129,3% ночью. И, наконец, через 10 мес. после начала моделирования гипопинеализма у подопытных животных артериальную гипертензию верифицировали уже независимо от времени суток. В этот срок наблюдения мы регистрировали наивысшие показатели АД (117,2% утром, 116,4% днем, 129,9% вечером и 140,3% ночью). Такое стабильно высокое АД в течение суток не всегда было совместимо с жизнью, поскольку через 10 мес. после начала эксперимента начался массовый падеж подопытных животных, причиной которого были множественные кровоизлияния во внутренние органы. Поэтому одной из причин летального исхода при длительном нелеченном гипопинеализме можно считать артериальную гипертензию и связанные с ней сосудистые кризы.

Анализируя данные, приведенные в таблице, следует отметить, что в течение 2 мес. после начала световой экспозиции у подопытных кроликов еще сохраняется суточный ритм АД с максимумом днем и минимумом ночью. Однако уже через 3 мес. мы отмечаем нивелирование суточного ритма АД, которое происходило за счет более выраженного повышения это-

Динамика изменений суточного ритма АД у кроликов с гипопинеализмом, индуцированным круглосуточным освещением

Группа, количество животных	Условия эксперимента	Статистический показатель	Время суток			
			Утро	День	Вечер	Ночь
I (n = 12)	Исходное состояние (естественная смена дня и ночи)	$\bar{x} \pm S_x^-$	51,8 ± 0,8	52,5 ± 2,1	47,8 ± 1,0**	43,4 ± 0,7***
II (n = 12)	Круглосуточное освещение 1 мес.	$\bar{x} \pm S_x^-$ P _{I-II}	50,7 ± 0,9 —	52,2 ± 0,8 —	47,5 ± 0,6** —	44,2 ± 0,6*** —
III (n = 12)	2 мес.	$\bar{x} \pm S_x^-$ P _{I-III}	52,2 ± 0,9 —	54,5 ± 1,1 —	49,7 ± 1,2 —	47,3 ± 1,1** < 0,05
IV (n = 10)	3 мес.	$\bar{x} \pm S_x^-$ P _{I-IV}	51,1 ± 1, —	52,4 ± 0,5 —	52,9 ± 1,3 < 0,05	53,2 ± 1,2 < 0,001
V (n = 12)	4 мес.	$\bar{x} \pm S_x^-$ P _{I-V}	55,7 ± 0,3 < 0,05	54,8 ± 0,7 —	56,5 ± 0,6 < 0,001	53,3 ± 1,6 < 0,001
VI (n = 12)	6 мес.	$\bar{x} \pm S_x^-$ P _{I-VI}	55,8 ± 1,7 < 0,05	55,6 ± 1,1 —	54,5 ± 1,4 < 0,001	55,5 ± 1,7 < 0,001
VII (n = 11)	8 мес.	$\bar{x} \pm S_x^-$ P _{I-VII}	53,1 ± 2,0 —	56,9 ± 1,3 0, 05 < P < 0,1	59,1 ± 1,1** < 0,001	56,4 ± 1,7 < 0,001
VIII (n = 10)	9 мес.	$\bar{x} \pm S_x^-$ P _{I-VIII}	56,7 ± 1,0 < 0,05	58,8 ± 0,3* < 0,001	62,3 ± 1,5** < 0,001	56,0 ± 1,8 < 0,001
IX (n = 10)	10 мес.	$\bar{x} \pm S_x^-$ P _{I-IX}	60,7 ± 1,6 < 0,001	61,1 ± 0,5 < 0,05	62,1 ± 0,6 < 0,001	60,9 ± 0,2 < 0,001

Примечание. * — 0,05 < P < 0,1 относительно показателя утром; ** — P < 0,05 относительно показателя утром; *** — P < 0,001 относительно показателя утром.

го показателя в темное время суток (вечер, ночь) по сравнению со светлым (утро, день). Эти данные указывают на то, что при гипопинеализме, индуцированном длительным круглосуточным освещением, на фоне дефицита мелатонина в организме развивается артериальная гипертензия по типу «non-dippers». Спонтанно такой тип АГ развивается у пожилых и старых людей на фоне возрастного снижения мелатонинобразующей функции пинеальной железы [5, 8].

В настоящее время инвалидизация и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний продолжает занимать печальное 1-е место, причем не только в Украине, но и далеко за ее пределами, несмотря на несомненные успехи по созданию новых лекарственных средств для лечения АГ. Если еще несколько десятилетий тому назад АГ считалась болезнью пожилых, то за последнее время эта патология слишком «помолодела». Опираясь на результаты исследования, приведенные в данной работе, можно констатировать, что немаловажная роль в патогенезе АГ принадлежит систематическому нарушению светового режима. Это не только работа в ночные смены, но и так называемый «ночной отдых» (ночные клубы, казино, дискотеки, ТВ и др.), уже не говоря о местах заключения, где свет в ночное время не выключается никогда. В процессе формирования АГ при гипопинеализме последовательность событий нам представляется сле-

дующим образом. Свет в ночное время препятствует формированию ночного пика мелатонина в пинеальной железе и соответственно поступлению этого гормона в систему кровообращения, в результате чего все органы не получают информацию о наступившей темноте и продолжают работать в интенсивном «дневном» режиме. Учитывая, что мелатонин путем воздействия на эндотелий сосудов обеспечивает снижение АД и формирует таким образом суточный ритм этого показателя, мы полагаем, что именно дефицит этого гормона лежит в основе патогенеза АГ при гипопинеализме.

Список литературы

1. Анисимов В.Н. Эпифиз, биоритмы организма и старение. В кн.: Анисимов В.Н. *Молекулярные и физиологические механизмы старения*. Т. 1. С-Пб.: Наука; 2008: 313-63.
2. Dawson D., van den Heuvel C. Integrating the actions of melatonin on human physiology. *Ann. Med.* 1998; 30(1): 95-102.
3. Cavallo A., Daniels S.R., Dolan X.M., Bean J.A., Khoury J.C. Blood pressure-lowering effect of melatonin in type 1 diabetes. *J. Pineal Res.* 2004; 36 (4): 262-6.
4. Коркушко О.В., Бондаренко О.В., Антонюк-Щеглова І.А. Хронотерапія мелатоніном хворих похилого віку з гіпертонічною хворобою як засіб підвищення ефективності антигіпертензивних препаратів. *Український кардіологічний журнал*. 2008; 2: 85-91.

5. Бондаренко Л.А., Губина-Вакулик Г.И., Сотник Н.Н., Геворкян А.Р. Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру пинеальной железы у кроликов. *Проблеми ендокринної патології*. 2005; 4: 38-45.
 6. Губина-Вакулик Г.И., Бондаренко Л.А., Сотник Н.Н. Длительное круглосуточное освещение как фактор ускоренного старения пинеальной железы. *Успехи геронтологии*. 2007; 1: 92-5.
 7. Бондаренко Л.О., Гальчінська В.Ю., Бондар Т.М., Сотник Н.М., Владимірова Г.М. Нові підходи до вивчення патогенезу артеріальної гіпертензії: роль пинеальної залози. *Проблеми ендокринної патології*. 2004; 3: 75-82.
 8. Бакунц Г. О. *Эндогенные факторы церебрального инсульта*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
 9. Grant R.T., Rothschild P. A device for estimating blood-pressure in the rabbit. *J. Physiology*. 1934; 81: 265-9.
 10. Пат. 83426 UA, МПК А61В 5/022 (2006.01), G01L 7/02 (2006.01). Пристрій для вимірювання артеріального тиску у кролів / Т. В. Міщенко, Л. О. Бондаренко (UA); заявник і патентовласник Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН України (UA). - №u201303285; заявл. 18.03.13; опубл. 10.09.13, Бюл. №17. С. 3.
 11. Мищенко Л.А., Свищенко Е.П. Циркадные ритмы нейрогуморальных регуляторных систем, определяющих суточный профиль артериального давления. *Український кардіологічний журнал*. 2002; 1: 79-84.
 12. Millar-Craig M.W., Bishop C.N., Raftery E.B. Circadian variation of blood-pressure. *Lancet*. 1978; 1(8068): 795-7.
 13. Shurygin D.Ia, Alekseeva N.M., Karlov V.A., Chireikin LV, Iakovlev VA. Changes in the indicators of hormonal activity of the adrenal glands, sympathetic-adrenal system and hemodynamics in healthy persons at different times during the 24-hour period. *Endokrinology*. 1977; 23(3): 50-7.
 14. Коркушко О.В., Бондаренко Л.А., Шатило В.Б., Антонюк-Шеглова И.А., Бондаренко Е.В., Сотник Н.М. и др. Функциональная недостаточность эпифиза и артериальная гипертензия (экспериментально-клиническое исследование). *Журнал АМН України*. 2008; 14(2): 373-81.
 15. Бондаренко О.В., Антонюк-Шеглова И.А. Функциональная недостаточность эпифиза и артериальная гипертензия. *Практична медицина*. 2008; 14(2): 254-5.
- Поступила 27.03.14

References

1. Anisimov V.N. *Epiphysis, biorhythms of the organism and aging*. In: Anisimov V.N. *Molecular and physiological mechanisms of aging*. Vol. 1. Sankt-Peterburg: Nauka; 2008: 313-63. (in Russian)
2. Dawson D., van den Heuvel C. Integrating the actions of melatonin on human physiology. *Ann. Med.* 1998; 30(1): 95-102.
3. Cavallo A., Daniels S.R., Dolan X.M, Bean J.A., Khoury J.C. Blood pressure-lowering effect of melatonin in type 1 diabetes. *J. Pineal Res.* 2004; 36 (4): 262-6.
4. Korkushko O.V., Bondarenko O.V., Antonjuk-Shheglova I.A. Melatonin chronotherapy in elderly patients with hypertension as a means of increasing the effectiveness of antihypertensive drugs. *Ukrain's'kyj kardiologichnyj zhurnal*. 2008; 2: 85-91. (in Ukrainian)
5. Bondarenko L.A., Gubina-Vakulik G.I., Sotnik N.N., Gevorkyan A.R. Effect of constant light on the circadian rhythm of melatonin and structure of pineal gland in rabbits. *Problemy endokrynnoi' patologii'*. 2005; 4: 38-45. (in Russian)
6. Gubina-Vakulik G.I., Bondarenko L.A., Sotnik N.N. Prolonged day-and-night lighting as a factor in premature aging of the pineal gland. *Uspekhi gerontologii*. 2007; 1: 92-5. (in Russian)
7. Bondarenko L.O., Gal'chins'ka V.Ju., Bondar T.M., Sotnyk N.M., Vladymyrova G.M. New approaches to the study of the pathogenesis of hypertension: role of pineal gland. *Problemy endokrynnoi' patologii'*. 2004; 3: 75-82. (in Ukrainian)
8. Bakunts G.O. *Endogenous factors of cerebral stroke*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
9. Grant R.T., Rothschild P. A device for estimating blood-pressure in the rabbit. *J. Physiology*. 1934; 81: 265-9.
10. Mishchenko T. V., Bondarenko L. O. A device for measuring arterial pressure in rabbits. Patent UA, N 83426; 2013. (in Ukrainian)
11. Mishchenko L.A., Svishchenko E.P. Circadian rhythms neurohumoral regulatory systems that determine the circadian profile of blood pressure. *Ukrain's'kyj kardiologichnyj zhurnal*. 2002; 1: 79-84. (in Russian)
12. Millar-Craig M.W., Bishop C.N., Raftery E.B. Circadian variation of blood-pressure. *Lancet*. 1978; 1(8068): 795-7.
13. Shurygin D.Ia, Alekseeva N.M., Karlov V.A., Chireikin LV, Iakovlev VA. Changes in the indicators of hormonal activity of the adrenal glands, sympathetic-adrenal system and hemodynamics in healthy persons at different times during the 24-hour period. *Endokrinology*. 1977; 23(3): 50-7.
14. Korkushko O.V., Bondarenko L.A., Shatilo V.B., Antonjuk-Shheglova I.A., Bondarenko E.V., Sotnik N.M. Functional failure of the epiphysis and arterial hypertension (experimental-clinical research). *Zhurnal AMN Ukrainy*. 2008; 14(2): 373-81. (in Russian)
15. Bondarenko O.V., Antonjuk-Shheglova I.A. Functional failure of the epiphysis and arterial hypertension. *Praktychna medycyna*. 2008; 14(2): 254-5. (in Ukrainian)

Received 27.03.14

Сведения об авторах:

Бондаренко Людмила Александровна, д.биол.н., ст. науч. сотр., зав. лаб. хроноэндокринологии ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского НАМН Украины», e-mail: chrono@bk.ru

Кульчиков А.Е.², Гриненко Е.А.¹, Емельянов В.К.¹, Морозов С.Г.²

Патофизиология мозгового кровообращения при краниоцеребральной диспропорции, обусловленной пневмоцефалией

¹ — ФГБНУ НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., д. 16

² — ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

В исследование включено 19 пациентов с послеоперационной пневмоцефалией различной степени выраженности, которые имели неадекватный выход из наркозного сна. С помощью КТ головного мозга были исключены возможные послеоперационные осложнения (отек, гидроцефалия, гематома) и выявлено скопление воздуха в интракраниальной полости (над лобными и/или височными долями, в желудочковой системе головного мозга). Оценка кровотока в каротидных и вертебро-базиллярных сосудах на экстракраниальном уровне через 2 часа после операции показала достоверное ($p < 0,001$) снижение систолической линейной скорости кровотока (ЛСК сист.) во внутренней сонной артерии (ВСА) по сравнению с дооперационными показателями на фоне пневмоцефалии и угнетенного сознания. Регистрация кровотока через 24–48 часов после операции показала достоверное восстановление ЛСК сист. в ВСА на экстракраниальном уровне в условиях регресса пневмоцефалии и восстановления сознания.

Ключевые слова: послеоперационная пневмоцефалия, краниоцеребральная диспропорция, мозговой кровоток

Kulchikov A.E.², Grinenko E.A.¹, Emelyanov V.K.¹, Morozov S.G.²

Cerebral circulation pathophysiology into pneumocephalus craniocerebral disproportion

¹ — Federal State Budgetary Scientific Institution «Burdenko Neurosurgical Research Institute», 16, Tverskaya-Yamskaya str., 125047 Moscow, Russian Federation

² — Federal State Budgetary Scientific Institution «The Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya str., 125315 Moscow, Russian Federation

We included 19 patients with a different intensity postoperative pneumocephalus and an inadequate postoperative awakening. Intracranial CT excluded postoperative complications (oedema, haematoma, hydrocephalus) and diagnosed a pneumocephalus (above the frontal and temporal lobes and in the cerebral ventricular system). In two hours after operation we found systolic linear blood flow velocity (BFV syst.) decrease in the extracranial part of internal carotid artery (ICA) ($p < 0,001$) in patients with pneumocephalus and inadequate postoperative awakening. But in 24–48 hours after operation we diagnosed BFV syst. elevation in the ICA extracranial part ($p < 0,001$) and pneumocephalus diminution in patients with a recovered consciousness.

Key words: postsurgical pneumocephalus, craniocerebral disproportion, cerebral blood flow

Сохранение баланса объемных внутричерепных взаимоотношений является одним из важнейших условий адекватного кровоснабжения головного мозга (ГМ) [1, 2]. Возникновение краниоцеребральной диспропорции (КЦД) может быть обусловлено конфликтом между объемом интракраниальной полости и объемом ее содержимого: мозгового вещества, ликвора и/или крови [1, 3–5]. Увеличение объема одного из них приводит к компенсаторному уменьшению объема другого. Так, в ответ на отек мозга происходит выдав-

ливание ликвора в спинномозговой канал, а нарастающая гидроцефалия может сопровождаться усилением венозного оттока крови из полости черепа [2–4]. В случае истощения компенсаторных механизмов происходит повышение внутричерепного давления (ВЧД), возникает внутричерепная гипертензия (ВЧГ) и формируется КЦД [1–3, 5]. Опасность подобной ситуации связана с установленным фактом влияния ВЧГ на мозговое кровообращение (МК) [2]. Чем выше ВЧД, тем более значим дефицит кровоснабжения ГМ и тем грубее неврологическая симптоматика.

Один из редких механизмов КЦД — появление инородного вещества в интракраниальной полости.

Для корреспонденции: Кульчиков Андрей Евгеньевич, к.м.н., науч. сотр., лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИ ОПП, e-mail: andrey.kulchikov@gmail.com

Так, при выполнении оперативного вмешательства на структурах задней черепной ямки (ЗЧЯ) в положении сидя разгерметизация черепа ведет к проникновению в его полость воздуха из окружающей среды. Подобное явление отмечено только при операциях с вертикализацией, в то время как нейрохирургические вмешательства, выполненные в традиционном положении пациента на хирургическом столе, не сопровождаются формированием пневмоцефалии. Ее возникновение при операциях на структурах ЗЧЯ, степень выраженности и распространенности непредсказуема, как непредсказуемы и ее последствия. В ряде случаев проникновение воздуха в рога боковых желудочков, его распределение над лобными и височными долями не приводит к формированию неврологического дефицита и не влияет на длительность пробуждения пациентов после операции. В иных наблюдениях у больных с менее распространенной пневмоцефалией отмечают угнетение сознания и неврологический дефицит после выхода из наркозного сна. Учитывая особенности зоны хирургического вмешательства, в подобных случаях нередко требуется дополнительная медикаментозная седация и продолжение искусственной вентиляции легких (ИВЛ).

Формирование пневмоцефалии не исключает возникновение ВЧГ с воздействием на МК, чем и обусловлены трудности пробуждения пациентов после наркозного сна. Поэтому *целью нашей работы* было исследование особенностей кровотока в каротидном и вертебро-базиллярном бассейнах (ВББ) у пациентов в зависимости от распространенности пневмоцефалии как одной из возможных причин формирования КЦД.

Методика

В исследование включено 19 пациентов с послеоперационной пневмоцефалией, средний возраст которых составил $46,3 \pm 14,3$ года. Из них 11 женщин (57,9%) и 8 мужчин (42,1%). Причиной оперативного вмешательства послужило выявленное объемное образование ЗЧЯ. Наиболее часто гистологически оно представляло собой невриному слухового нерва (11 наблюдений), реже встречались менигеома (3), медуллобластома (1), анапластическая эпендимома (2), астроцитомы (1) и гемангиобластома (1).

Алгоритм обследования пациентов включал неврологический осмотр до и после операции, компьютерную томографию головного мозга (КТ ГМ) в динамике и оценку кровотока в обоих сосудистых бассейнах на экстракраниальном уровне (общей сонной артерии (ОСА), справа (ОСАд) и слева (ОСАс); наружной сонной артерии (НСА), справа (НСАд) и слева (НСАс); внутренней сонной артерии (ВСА), справа (ВСАд) и слева (ВСАс); в V3-сегменте позвоночной артерии (ПА), справа (ПАд) и слева

(ПАс)). Причиной выбора подобной методики были технические трудности регистрации транскраниального кровотока у пациентов с пневмоцефалией в связи с нередким распространением воздуха над лобными и височными долями и «гашением» ультразвукового луча при локации кровотока из темпорального или орбитального доступа. Учитывая непрогнозируемое формирование пневмоцефалии в ходе операции, мы регистрировали (используя метод ультразвуковой доплерографии брахиоцефальных сосудов) систолическую линейную скорость кровотока (ЛСК сист.) до начала операции, через 2 ч после нее (т.е., после выхода больного из наркозного сна) и через 24—48 ч после хирургического вмешательства. Все исследования проводили в условиях гемодинамической стабильности обследуемых пациентов. Количественные данные экстракраниального кровотока мы сравнивали с изменениями динамической КТ ГМ и сознания.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ «BIOSSTAT» и «STATISTICA 10.0». Данные представлены в виде средних арифметических и стандартных отклонений ($M \pm SD$). Достоверность различий устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Все данные имели нормальное распределение.

Результаты и обсуждение

Причиной диагностического поиска послужило медленное и неадекватное пробуждение у всех 19 пациентов, что сопровождалось угнетением уровня сознания и/или психомоторным возбуждением. Основной потребностью выполнения КТ ГМ в раннем послеоперационном периоде стала необходимость исключения иных хирургических осложнений (гематома, отек мозга, окклюзионная гидроцефалия и др.). По данным исследования иные субстраты, кроме различной степени распространенности воздуха в краниальной полости, выявлены не были. В ходе диагностики мы отметили не только различную локализацию воздуха в полости черепа, но и неодинаковую визуальную выраженную пневмоцефалию (рис. 1, 2). Во всех клинических наблюдениях в условиях обнаруженной пневмоцефалии исследование кровотока на экстракраниальном уровне отмечены достоверные изменения ЛСК сист. в сосудах обоих бассейнов по сравнению с дооперационными показателями ($p < 0,001$). При этом наиболее выраженная депрессия кровотока была зафиксирована в ВСА справа (ВСАд) и слева (ВСАс). И если скоростные показатели кровотока в среднем в группе в обеих ВСА до операции соответствовали ВСАд: $50,0 \pm 9,4$ см/с и ВСАс: $50,9 \pm 11,7$ см/с, то в раннем послеоперационном периоде они снизились до $37,3 \pm 6,7$ см/с в правой ВСА ($p < 0,001$) и $38,3 \pm 8,6$ см/с в левой ВСА ($p < 0,001$), соответственно.

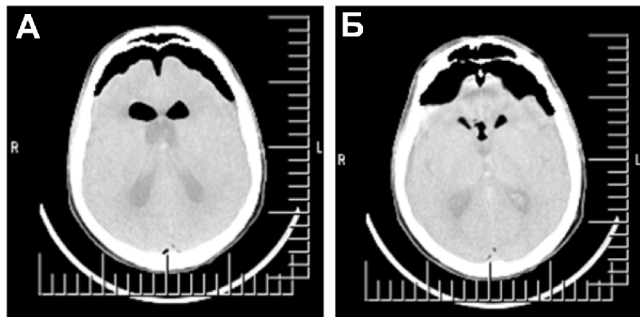


Рис. 1. (А, Б). Больной X, 62 лет, после операции по поводу удаления невриномы слухового нерва слева с неадекватным пробуждением в раннем послеоперационном периоде. По данным КТ ГМ: пневмоцефалия с локализацией воздуха в передних рогах боковых желудочков и над лобными долями.

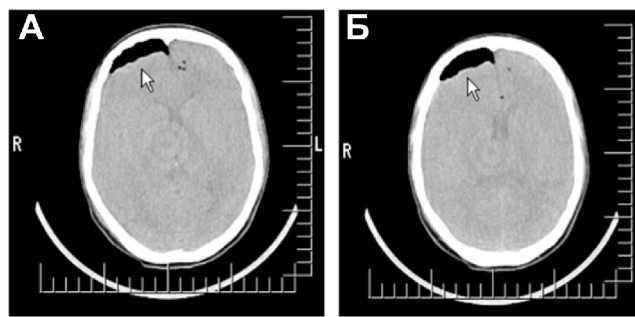


Рис. 2. (А, Б). Больная Y, 29 лет, оперированная по поводу невриномы слухового нерва справа. В раннем послеоперационном периоде отмечено длительное пробуждение, по данным КТ ГМ — небольшое скопление воздуха над лобной долей справа.

С целью церебропротекции больные были дополнительно седатированы, на фоне чего была продолжена ИВЛ. Спустя 24—48 ч после операции повторная регистрация МК на экстракраниальном уровне показала достоверное восстановление дооперационных значений ЛСК сист. во всех клинических наблюдениях. Так, в правой ВСА ЛСК сист. достигла $52,3 \pm 7,6$ см/с ($p < 0,001$, по сравнению с ЛСК сист. через 2 ч после операции) и $51,6 \pm 12,5$ см/с ($p < 0,001$ по сравнению с ЛСК сист. через 2 ч после операции) (таблица).

По данным контрольной КТ ГМ было установлено явное уменьшение объем воздуха в полости черепа. Подобная динамика пневмоцефалии и скоростных показателей кровотока на ее фоне ЛСК сист. в обоих сосудистых бассейнах сопровождалась изменениями со стороны сознания больных. После прекращения седации во всех наблюдениях было отмечено восстановление сознания с адекватным выполнением инструкций, что позволило перевести пациентов на самостоятельное дыхание.

Так, после хирургического вмешательства на фоне различной степени распространенности пневмоцефалии и достоверно сниженных значений кровотока

в ВСА мы диагностировали пролонгированный и неадекватный выход пациентов из наркозного сна с угнетением сознания и психомоторным возбуждением. Через 24—48 ч по мере восстановления кровотока и уменьшения пневмоцефалии пациентам удавалось перевести на самостоятельное дыхание в связи с восстановлением уровня сознания.

Характерной реакцией МК на присутствие воздуха в краниальной полости стало достоверное снижение ЛСК сист. в обеих ВСА на экстракраниальном уровне. В иных каротидных сосудах и ВББ ЛСК сист. в каждом отдельном случае менялась только в абсолютных значениях (рис. 3).

Проникновение воздуха в полость черепа при операциях в положении сидя обусловлена двумя причинами: разгерметизацией краниальной полости и разницей между внутричерепным и атмосферным давлениями. Вертикализация пациента в ходе операции приводит к перераспределению объемов в краниальной полости и некоторому снижению ВЧД (вплоть до отрицательных значений) по сравнению с горизонтальным положением [5, 6]. Если атмосферное давление превышает внутричерепное на момент разгерме-

Таблица

Динамика систолической линейной скорости кровотока в каротидном и вертебробазиллярном бассейне у пациентов с пневмоцефалией ($M \pm SD$)

Название сосуда	OCA _d	OCA _s	HCA _d	HCA _s	BCA _d	BCA _s	ПА _d	ПА _s
ЛСК сист. до операции, см/с	$59,8 \pm 17,5$	$59,7 \pm 20,5$	$58,9 \pm 12,3$	$60,4 \pm 14,9$	$50 \pm 9,4$	$50,9 \pm 11,7$	$35,5 \pm 10,4$	$34,4 \pm 8,5$
ЛСК сист. через 2 часа после операции, см/с	$55,1 \pm 14,6$	$56,3 \pm 18,7$	$58,8 \pm 16,8$	$57,8 \pm 15,5$	$37,3 \pm 6,7^*$	$38,3 \pm 8,6^*$	$36,05 \pm 7,6$	$36,5 \pm 6,7$
ЛСК сист. через 24—48 часов после операции, см/с	$53 \pm 14,2$	$55,4 \pm 19,1$	$54,7 \pm 15,4$	$61,7 \pm 9,5$	$52,3 \pm 7,6^{**}$	$51,6 \pm 12,5^{**}$	$35,8 \pm 7,4$	$36,7 \pm 13,7$

Примечание. * — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛКС сист. до операции; ** $p < 0,001$ — по сравнению с ЛСК сист. через 2 часа после операции. ЛСК сист. — систолическая линейная скорость кровотока; OCA — общая сонная артерия; HCA — наружная сонная артерия; BCA — внутренняя сонная артерия; ПА — позвоночная артерия; d — правые артерии; s — левые артерии.

тизации краниальной полости, происходит формирование пневмоцефалии.

Реакция кровотока на дополнительный объем в полости черепа, скорее всего, обусловлена быстрым формированием ВЧГ, повышающей периферическое сопротивление и затрудняющей артериальный кровоток в момент ушивания раны. Именно в условиях дефицита МК появляется и неврологическая симптоматика, которую удается выявить сразу после пробуждения пациента. Но остается открытым вопрос, почему подобная однотипная реакция ЛСК сист. на протяжении всего исследования имеет место у всех наблюдаемых больных и не зависит от распространенности пневмоцефалии. Возможно, это обусловлено индивидуальным объемом резервного пространства краниальной полости в каждом отдельном случае [1, 7]. Согласно этому у одних пациентов незначительное увеличение объема содержимого полости черепа способно привести к расстройствам кровообращения ГМ и неврологическим проявлениям, а другим для возникновения подобной сосудистой реакции требуется значительно больший дополнительный объем, чтобы исчерпать резервные возможности краниальной полости и тем самым повысить периферическое сопротивление и снизить ЛСК сист. Таким образом, можно объяснить факт отсутствия характерной депрессии ЛСК сист. в ВСА у пациентов с распространенной пневмоцефалией, что встречается в клинической практике. При прочих равных условиях клинически выход из наркозного сна у этих больных может не отличаться от тех, кто был прооперирован в традиционном положении и не имел скопления воздуха в полости черепа. Достоверность реакции МК на пневмоцефалию в ВСА обусловлена тем, что данный сосуд является истоком интракраниальной части каротидного бассейна, а локализация воздуха в передних отделах полости черепа создает ВЧГ именно в этой зоне согласно «мозаике» ВЧД.

Следовательно, регистрация скоростных показателей кровотока в раннем послеоперационном периоде у пациентов с неадекватным выходом из наркозного сна на фоне пневмоцефалии позволит оценить влияние КЦД на МК и применить эти знания для решения практических вопросов нейроанестезиологии.

Список литературы

1. Ларькин В. И. Краниocereбральная диспропорция у детей (совершенствование методов диагностики и хирургического лечения): Дис... д-ра мед. наук. Омск; 2007. 212 с.
2. Шахнович А. Р., Шахнович В. А.. Диагностика нарушений мозгового кровообращения. Транскраниальная доплерография. М.; 1996. 446 с.
3. Мчедлишвили Г.И., ред. Отек головного мозга. Тбилиси: Метцниереба; 1986. 174 с.

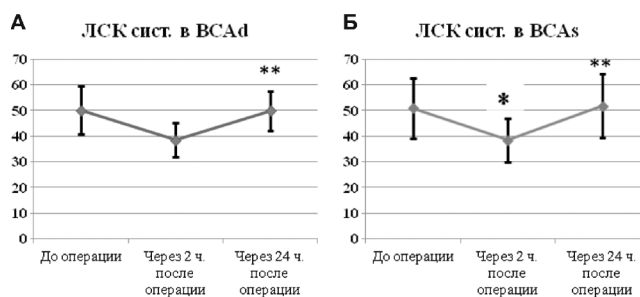


Рис. 3. Динамика систолической линейной скорости кровотока в экстракраниальной части правой (д) и левой (с) внутренней сонной артерии:

* — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛСК сист. до операции; ** — $p < 0,001$ — по сравнению с ЛСК сист. через 2 часа после операции. ЛСК сист — систолическая линейная скорость кровотока; ВСAd — правая внутренняя сонная артерия; ВСAs — левая внутренняя сонная артерия.

4. Сировский Э.Б. Внутричерепная дистензия у нейрохирургических больных в раннем послеоперационном периоде: Дис. ... д-ра мед.наук. М.; 1984. 427 с.

5. Poca MA, Sahuquillo J, Topczewski T, Lastra R, Font ML, Corral E. Posture-induced changes in intracranial pressure: a comparative study in patients with and without a cerebrospinal fluid block at the craniovertebral junction. *Neurosurgery*. 2006; 58: 899-906.

6. Chapman P., Cosman E., Arnold M. The relationship between ventricular fluid pressure and body position in normal subjects and subjects with shunts: a telemetric study. *Neurosurgery*. 1990; 26: 181-9.

7. Александрин В.В. Ауторегуляция мозгового кровотока в норме и в период ишемической гипоперфузии. *Патогенез*. 2012; 1(10): 27-30.

Поступила 04.03.15

References

1. Larkin V.I. *Cranio cerebral disproportion in children (The methods of diagnostic and the surgical treatment enhancement)*. Doct. diss. Omsk, 2007. 212 c. (In Russian)
2. Shahnovich A.R., Shahnovich V.A. *Diagnostics of cerebral circulation disorders. Transcranial Doppler*. Moscow; 1996. 446 c. (In Russian)
3. Mchendishvili G.I. *Brain edema*. Tbilissi: Metcniereba Publ.; 1986. 174 c. (In Russian).
4. Sirovskiy E.B. *Intracranial distension in neurosurgical patients at early postoperative period*. Doct. diss. Moscow; 1984. 427 c. (In Russian).
5. Poca MA, Sahuquillo J, Topczewski T, Lastra R, Font ML, Corral E. Posture-induced changes in intracranial pressure: a comparative study in patients with and without a cerebrospinal fluid block at the craniovertebral junction. *Neurosurgery*. 2006; 58: 899-906.
6. Chapman P., Cosman E., Arnold M. The relationship between ventricular fluid pressure and body position in normal subjects and subjects with shunts: a telemetric study. *Neurosurgery*. 1990; 26: 181-9.
7. Alexandrin V.V. Autoregulation of cerebral blood flow in normal and during the postischemic hypoperfusion. *Pathogenesis*. 2012; 1(10): 27-30. (In Russian)

Received 04.03.15

Сведения об авторах:

Гриненко Елена Анатольевна (Grinenko E.A.), канд. мед. наук, науч. сотр., отделение реанимации ФГБНУ НИИ НХ им. акад. Н.Н. Бурденко

Емельянов Владимир Константинович (Emelyanov V.K.), канд. мед. наук, врач-реаниматолог, отделение реанимации ФГБНУ НИИ НХ им. акад. Н.Н. Бурденко

Морозов Сергей Георгиевич (Morozov S.G.), доктор мед. наук, проф., член-корреспондент РАН, руководитель лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии, заместитель директора по науке ФГБНУ НИИ ОПП.

Милош Т.С., Масимович Н.Е.

Состояние эндотелия сосудов и прооксидантно-антиоксидантный баланс у беременных крыс в условиях эндотоксинемии

УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80

Актуальной проблемой современного акушерства является инфекция в период беременности, которая приводит к мертворождаемости, ранней детской смертности и заболеваемости. В Беларуси заболеваемость новорожденных при специфических инфекциях для перинатального периода составила 14,1%, а смертность — 0,38%. Цель исследований — изучить состояние эндотелия и активность перекисного окисления липидов у беременных крыс с эндотоксинемией. В экспериментах на 49 беременных крысах с внутримышечным введением эндотоксина (*Lipopolysaccharide E. coli Serotype O127:B8 «Sigma»*) в период плацентации установлено развитие дисфункции эндотелия, что проявлялось более выраженной в 2,3 раза ($p < 0,05$) констрикторной реакцией на норадреналин, увеличением в 18,3 раза ($p < 0,001$) количества циркулирующих эндотелиальных клеток и снижением в 14 раз ($p < 0,001$) эндотелийзависимой вазодилатации под влиянием ацетилхолина, наряду повышением уровня продуктов перекисного окисления липидов: концентрации диеновых конъюгатов на 91% ($p < 0,001$), малонового диальдегида — на 56% ($p < 0,001$), оснований Шиффа — на 7,9% ($p < 0,05$); и снижением показателей антиоксидантной защиты: содержания ретинола на 29% ($p < 0,05$), α -токоферола — на 6% ($p < 0,001$).

Ключевые слова: беременность; эндотоксин; дисфункция эндотелия; окислительный стресс

Milosh T.S., Maksimovich N.Ye.

The endothelium of the vessels and prooxidative-antioxidative balans in pregnancy rats with endothoxinaemia

Grodno State Medical University, Ministry of Health of Belarus, Grodno, str. Gorkogo 80, 230009

Actual problem of modern obstetrics is the infection in pregnancy which leads the deadborn, early children's death rate and disease. In Belarus disease of newborns at specific infections for postnatal the period has made 14,1%, and death rate of 0,38%. The purpose of researches — to study a condition endothelium and activity of lipid peroxidation products at pregnant rats with endothoxinaemia. In experiments on 49 pregnancy rats with intramuscular introduction of endotoxine (*Lipopolysaccharide E. coli Serotype O127:B8 «Sigma»*) during the period placentation dysfunction development endothelium is established, that was shown more expressed in 2,3 times ($p < 0,05$) constriction by reaction on noradrenalin, increase in 18,3 times ($p < 0,001$) quantities circulating endothelium cages and decrease in 14 times ($p < 0,001$) the dependent endothelium vasodilatation under influence acetylcholine, to the dress increase of level of lipid peroxidation products: concentration of diene conjugates on 91% ($p < 0,001$), malone dialdehyde — on 56% ($p < 0,001$), Schiff bases — on 7,9% ($p < 0,05$); and decrease in indicators of antioxidant protection: maintenances retinol on 29% ($p < 0,05$), α -tocopherol — on 6% ($p < 0,001$).

Key words: pregnancy endotoxine; endothelium dysfunction; oxidative processes

Инфекция в период беременности — актуальная проблема современного акушерства, занимающая ведущую роль среди причин мертворождаемости, ранней детской смертности и постнатальной заболеваемости. Несмотря на целый ряд лечебно-профилактических мероприятий рождение детей с проявлениями внутриутробной инфекции у беременных с инфекци-

онно-воспалительными заболеваниями составляет в России от 10 до 58% [1, 2]. В Республике Беларусь в структуре причин смерти детей на первой неделе жизни основными являются: врожденные аномалии развития, синдром дыхательных расстройств, внутриутробные инфекции и др. Заболеваемость новорожденных при специфических инфекциях для перинатального периода составила 14,1%, а смертность — 0,38% [3].

Возникновению акушерской патологии в настоящее время способствуют грамотрицательные бактерии

Для корреспонденции: Милош Татьяна Сергеевна, к.м.н., ассистент кафедры акушерства и гинекологии УО «Гродненский государственный медицинский университет»; e-mail: milashts@mail.ru

(*E. coli* и др.). Липополисахарид (ЛПС) или эндотоксин (ЭТ) грамотрицательных бактерий обладает токсическими и иммуногенными свойствами. Его неблагоприятные эффекты вызваны способностью стимулировать образование в макрофагах биологически активных веществ: интерлейкинов, простагландинов, веществ с окислительными свойствами [4]. Образование последних является причиной септического шока [5].

Для детализации патогенеза нарушений в системе «мать—плод» важно изучение состояния сосудистого эндотелия. По данным литературы ЛПС обладает повреждающим действием на эндотелий [6]. Эндотелий — это важный паракринный орган непрерывно синтезирующий большое количество биологически активных веществ, важных для контроля регуляции тонуса сосудов и их проницаемости, гемостаза, ангиогенеза и др. [7]. Установлена важная роль дисфункции эндотелия (ДЭ) в возникновении различной соматической патологии, однако в акушерской практике этот вопрос разработан недостаточно [8]. Согласно единичным данным, нарушение кровообращения в системе «мать — плацента — плод» и развитие токсемии при гестозе зависит от степени эндотелиальной дисфункции [9]. Повреждению эндотелия сосудов при эндотоксинемии может способствовать чрезмерная активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая происходит под воздействием «цитокриновой атаки» [8, 10].

Однако состояние эндотелия в организме матери при беременности в условиях действия бактериальных ЭТ не изучалось, в частности, не выяснено состояние эндотелийзависимых механизмов вазодилатации (ЭЗВД), степень десквамационных процессов в эндотелии кровеносных сосудов, не исследованы изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса в условиях эндотоксинемии [7, 11, 12].

Цель исследования — изучение состояния эндотелия и активности перекисного окисления липидов у беременных крыс с эндотоксинемией.

Методика

Исследования выполнены на 49 белых беспородных беременных крысах массой 200—230 г, разделенных на 2 серии (контрольная и опытная). Животные содержались в стандартных условиях, получали полноценный пищевой рацион в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Контролировались температурный, световой и шумовой режимы. При выполнении экспериментов руководствовались принципами гуманного отношения к животным. Исследования на животных проводили согласно положению комитета по биомедицинской этике УО «Гродненский государственный медицинский универ-

ситет» по гуманному обращению с экспериментальными животными (приказ ректора от 27.12.2006 г. №125).

Крысы 1-й серии ($n = 25$) — контроль, внутримышечно получали стерильный изотонический раствор NaCl в объеме 0,5 мл в период плацентации (11-е сутки беременности), животные 2-й серии ($n = 24$) в аналогичный период беременности внутримышечно получали ЛПС (*Lipopolysaccharide E. coli Serotype O127:B8 «Sigma»*) в дозе 0,4 мг/кг. Выявление беременных крыс осуществляли по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке (1-й день беременности).

Взятие материала крови, грудной аорты для исследований осуществляли под наркозом (внутримышечно тиопентал натрия, 60 мг/кг). Кровь забирали из общей сонной артерии с добавлением гепарина (20 ЕД/мл).

Состояние эндотелия кровеносных сосудов оценивали по ЭЗВД колец аорты диаметром 2—3 мм в ответ на воздействие возрастающих концентраций ацетилхолина (АцХ) изометрическим методом [13] в водяной бане типа «organ bath» (рис. 1) путем регистрации степени их изометрического напряжения и подвергнутых сокращению с помощью норадреналина, и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНВД) колец аорты исследовали с помощью глицеролтринитрата (ГТН, 10^{-6} М) для контроля состояния гуанилатциклазного компонента миоцитов сосудов [14].

Кольцевидные сегменты аорты предварительно спазмировали норадреналином (10^{-7} — 10^{-6} М) до уровня 70% от максимальной вазоконстрикции.

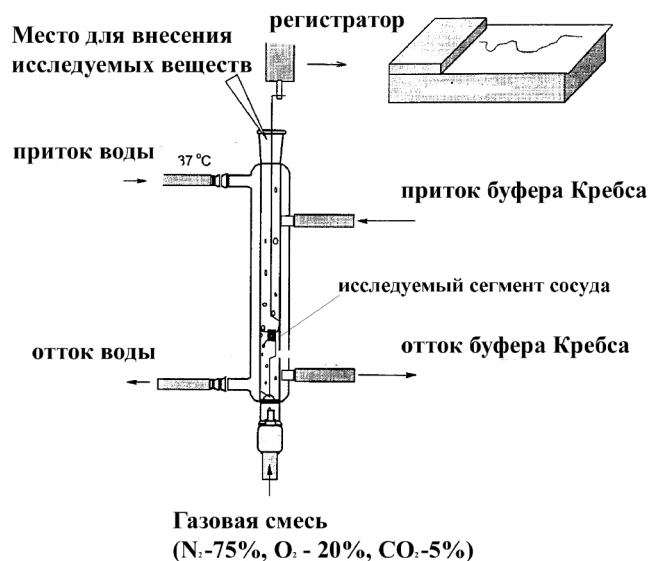


Рис. 1. Схема устройства для исследования вазоактивных реакций эндотелия сосудов *in vitro* методом изометрии

Степень морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов изучали по количеству десквамированных циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в 1 л плазмы крови методом микроскопии по Sinzinger H. [15] в модификации [16].

Прооксидантно-антиоксидантное состояние оценивали по концентрации в плазме крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновые конъюгаты (ДК) [17], малоновый диальдегид (МДА) определяли на основании концентрации его комплексов с тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре «СФ-46», Россия [18], основания Шиффа (ОШ) измеряли на спектрофлюориметре F-4010 «Hitachi», Япония [19]. Осуществляли оценку показателей антиоксидантной защиты (АОЗ): ретинола и α -токоферола (α -Т), используя способность их соединений флюоресцировать в гексановой среде на спектрофлюориметре «F-4010» фирмы «Hitachi» (Япония) [20].

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы «Statistica 6,0» [21]. После проверки данных на нормальность распределения по критерию Шапиро—Уилка рассчитывали медиану, межквартильный интервал (25-й и 75-й процентиля). Различия между группами устанавливали с помощью критериев Краскела—Уоллиса и Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение морфофункциональных изменений эндотелия кровеносных сосудов в организме самок крыс, получавших ЛПС, выявило статистически значимую констрикторную реакцию на норадралин в 2,3 раза ($n = 11$) (рис. 2). В то же время ЭЗВД в ответ на АцХ (10^{-5} М) у крыс опытной группы была значительно меньше ($5 \pm 2,3\%$, $n = 22$, $p < 0,001$), чем в контроле ($70 \pm 10,8\%$, $n = 8$).

ЭНВД, определяемая после воздействия на предварительно спазмированные норадралином кольца аорты ГТН (10^{-6} М) — непрямым донором оксида азота, не отличалась у крыс опытной группы по сравнению с контрольной, составив $85 \pm 7,4\%$ ($n = 9$) и $88 \pm 3,6\%$ ($n = 6$) соответственно, что свидетельствовало об отсутствии нарушений гуанилатциклазного механизма вазодилатации.

Изучение выраженности десквамации эндотелия кровеносных сосудов, на основании количества ЦЭК выявило наличие морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов у крыс, получавших в период беременности ЛПС. Количество ЦЭК в плазме крови крыс опытной группы составило $82,5 (46,0; 115,0) \times 10^4/\text{л}$ ($n = 22$, $p < 0,001$), в то время как в контроле значение этого показателя составило $4,5 (2,5; 5,0) \times 10^4/\text{л}$ ($n = 8$).

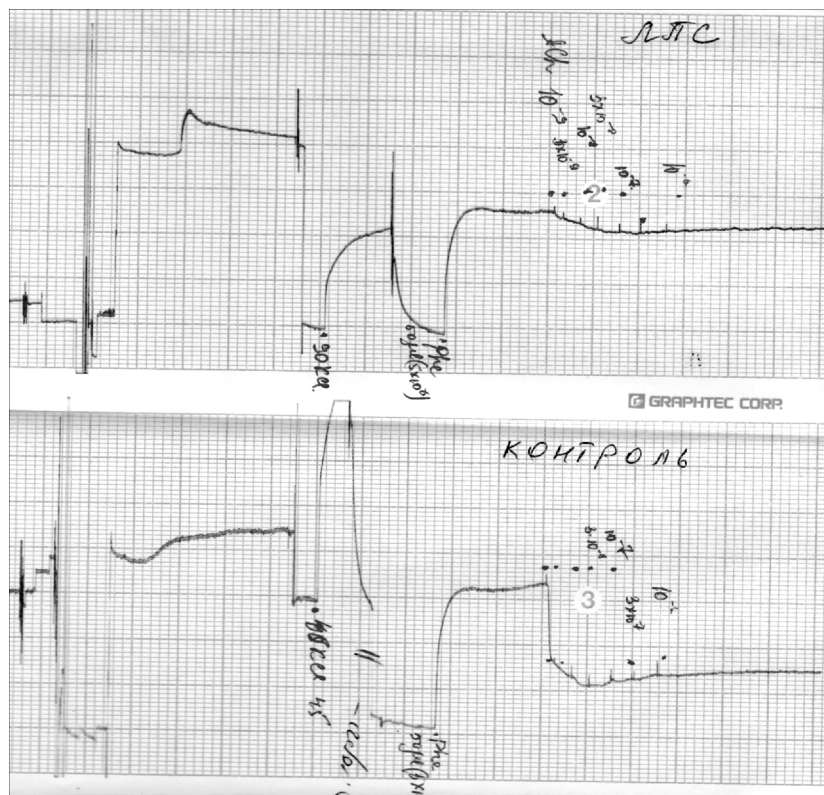


Рис. 2. Вазодилатация колец аорты крысы в период плацентации — контроль — и с введением липополисахарида (ЛПС) — опыт.

Содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, оснований Шиффа, ретинола, α -токоферола в плазме крови беременных крыс после введения липополисахарида в период плацентации

Показатели	Единицы	Группы животных	
		Контроль	Липополисахарид
Диеновые конъюгаты	ΔD_{233} /мл	1,1 (0,9; 1,5)	2,1 (1,5; 2,3)**
Малоновый диальдегид	мкмоль/л	1,8 (1,1; 2,0)	2,8 (2,2; 3,6)**
Основания Шиффа	ЕД/мл	137,3 (129,6;140,9)	148,1 (142,1;156,7)*
Ретинол	мкмоль/л	5,2 (3,6; 6,3)	3,7 (3,1; 3,9)*
α -токоферол	мкмоль/л	24,8 (24,3; 25,4)	23,2 (22,1; 23,8)**

Примечание. Данные представлены в виде медианы Ме (25-й; 75-й процентиля); * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ — различия статистически значимы между показателями опытной и контрольной групп.

У беременных крыс отмечено существенное увеличение активности ПОЛ: в плазме крови: увеличение концентрации ДК на 91%, МДА — на 56%, ОШ — на 7,9% (таблица).

Наряду с этим, установлено снижение в плазме крови концентрации показателей АОЗ: содержания ретинола на 29%, α -Т — на 6%.

Выводы

Введение эндотоксина в период плацентации беременным крысам способствует развитию дисфункции эндотелия, что проявляется повышением количества циркулирующих эндотелиальных клеток и снижением эндотелийзависимой вазодилатации под влиянием ацетилхолина.

Механизм развития дисфункции эндотелия может быть обусловлен развитием окислительного стресса, о чем свидетельствовало повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов и снижение показателей антиоксидантной защиты.

Список литературы

1. Казюкова Т.В. Показатели феррокинетики при инфекционно-воспалительных заболеваниях у детей раннего возраста. *Педиатрия*. 2004; (3): 42-48.
2. Ткачева И.И., Тареева Т.Г., Федорова А.В. Рациональные методы профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний матери, плода и новорожденного при акушерской и экстрагенитальной патологии. . 1999; (3): 80-84.
3. Вильчук К.У. Достижения и перспективы развития неонатальной службы в Республике Беларусь. *Вопросы организации и информатизации здравоохранения*. 2010; (3):33.
4. Макаров О.В., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Бахарева И.В., Таранец А.Н. Диагностическое значение исследования амниотической жидкости при внутриутробном инфицировании. *Акушерство и гинекология*. 2003; (4): 3-4.
5. Салахов И.М., Ипатов А.И., Конев Ю.В., Яковлев М.Ю. Современные аспекты патогенеза эндотоксического шока. *Успехи современной биологии*. 1998;(1): 33-49.

6. Чижиков Н.В., Юревич Е.В., Опарина О.Н., Агеев И.С. Интегральные показатели кишечного липополисахарида и антиэндотоксинового иммунитета у больных атеросклерозом нижних конечностей в сочетании с дисциркуляторной атеросклеротической энцефалопатией. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2009; 2 (10):60-70.

7. Conrad K.P., Davis A.K. Nitric oxide synthase activity in placenta from women with preeclampsia. *Placenta*.1995; 16 (8): 691-699.

8. Киселева Н.И. Дисфункция эндотелия при гестозе: патогенез, диагностика и лечение. *Охрана материнства и детства*. 2006; 1(7):49-56.

9. Ветров В.В. Синдром эндогенной интоксикации в акушерско-гинекологической практике. *Эфферентная терапия*. 2001; 7 (1):4-9.

10. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. Роль оксида азота в развитии и предупреждении дисфункции эндотелия. *Вестник Витебского госуд. мед. ун-та*. 2003; 2 (2):5-17.

11. Lual F.,Young A., Greer L.A. NO concentration are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am. J. Obstet Gynec*.1995; 173 (1): 714-718.

12. Vane J.R., Anggard E.E., Batting R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *New England J. of Medicine*. 1990; 323 (1): 27-36.

13. Hladovec J., Rossman P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb. Res*. 1973; 3: 665-674.

14. Максимович Н.Е., Козловский В.И., Максимович Н.А. Современные экспериментальные методы оценки состояния морфо-функциональных свойств эндотелия сосудов. *Журнал ГрГМУ*. 2004; (2): 26-30.

15. Sinzinger H., Virgolini J., Fitscha P. Stabilization of endothelial lining and decrease in circulation endothelial cells. *Br. J. Pharm*. 1988; 25: 775-776.

16. Власов Т.Д. Системные нарушения микроциркуляции как следствие органной постишемической реперфузии. *Сб. науч. трудов «Патофизиология микроциркуляции и гемостаза»*. Санкт-Петербург; 1998:90-106.

17. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лабораторное дело*. 1983; (3): 33-35.

18. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. *Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo. Elsevier*. 1991: 291.

19. Fletcher B.L., Dillard, C.J., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* 1973; 52 (1): 1-9.

20. Черняускене Р.Ч. Варшкявичене З.З., Грибаускас П.С. Одновременное флюориметрическое определение концентраций витаминов Е и А в сыворотке крови. *Лабораторное дело.* 1984; (6): 362-365.

21. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера; 2003. 312 с.

Поступила 03.05.13

References

1. Kazyukova T.V. Indicators ferrocenic at infectious-inflammatory diseases at children of early age. *Pediatrics.* 2004; (3): 42-8. (in Russian)

2. Tkacheva I.I., Tareeva T.G., Fedorova A.B. Rational methods of preventive maintenance and treatment of infectious-inflammatory diseases of mother, fetus and the newborn at obstetrics and extragenital pathologies. *Vestnik Rossiyskoy assotsiatsii akusherov-ginekologov.* 1999; (3): 80-4. (in Russian)

3. Vil'chuk K.U. Achievements and development prospects neonatal services of Belarus. *Voprosy organizatsii i informatsii zdavookhraneniya.* 2010; (3): 33. (in Belarus)

4. Makarov O.V., Koval'chuk L.V., Gankovskaya L.V., Bakhareva I.V., Taranets A.N. Diagnostic value of research amniotic fluid at prenatal infection. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2003; (4): 3-4. (in Russian)

5. Salakhov I.M., Ipatov A.I., Konev Yu.V., Yakovlev M.Yu. Modern aspects pathogenesis endotoxin a shock. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 1998;(1): 33-49. (in Russian)

6. Chizhikov N.V., Yurevich E.V., Oparina O.N., Ageev I.S. Integrated indicators intestinal lipopolysaccharide and antiendotoxin immunity at bottom finitenesses sick of an atherosclerosis in a combination with discirculation an atherosclerotic encephalopathy. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki.* 2009; 2 (10):60-70. (in Russian)

7. Conrad K.P., Davis A.K. Nitric oxide synthase activity in placenta from women with preeclampsia. *Placenta.* 1995; 16 (8): 691-9.

8. Kiseleva N.I. Endothelium dysfunction at preeclampsia: pathogenesis, diagnostics and treatment. *Okhrana materinstva i detstva.* 2006; 1(7):49-56. (in Belarus)

9. Vetrov V.V. Syndrome endogenic intoxications in obstetrics-gynecologic practice. *Efferentnaya terapiya.* . 2001; 7 (1):4-9. (in Russian)

10. Manukhina E.B., Malyshev I.Yu. Role of nitric oxide in development and the dysfunction prevention endothelium. *Vestnik Vitebskogo gosud. med. unistituta.* 2003; 2 (2): 5-17. (in Belarus)

11. Lual F., Young A., Greer L.A. NO concentration are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am. J. Obstet Gynec.* 1995; 173 (1): 714-8.

12. Vane J.R., Anggard E.E., Batting R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *New England J. of Medicine.* 1990; 323 (1): 27-36.

13. Hladovec J., Rossman P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb. Res.* 1973; 3: 665-74.

14. Maksimovich N.E., Kozlovskiy V.I., Maksimovich N.A. Modern experimental methods of an estimation of a condition of morfo-functional properties endothelium vessels. *Zhurnal GrGMU.* 2004; (2): 26-30. (in Belarus)

15. Sinzinger H., Virgolini J., Fitscha P. Stabilization of endothelial lining and decrease in circulation endothelial cells. *Br. J. Pharm.* 1988; 25: 775-6.

16. Vlasov T.D. System infringements of microcirculation as consequence body postischemic reperfusion. *Cb. nauch. trudov «Patofiziologiya mikrotsirkulyatsii i gemostaza».* Sankt-Peterburg;1998: 90-106. (in Russian)

17. Gavrilov V.B., Mishkorudnaya M.I. Spektrofotometrichesky definition of the maintenance of hydroperoxides lipid in blood plasma. *Laboratornoe delo.* 1983; (3): 33-5. (in Russian)

18. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. *Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo. Elsevier.* 1991: 291.

19. Fletcher B.L., Dillard, C.J., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* 1973; 52 (1): 1-9.

20. Chernyauskene R.Ch. Varshkyavichene Z.Z., Gribauskas P.S. Simultaneous fluorimetric definition of concentration of vitamins E and A in blood whey. *Laboratornoe delo.* 1984; (6): 362-5. (in Russian)

21. Rebrova O.Yu. The statistical analysis of medical data. Application of a package of applied programs STATISTICA. М.: Медиа Сфера; 2003. 312 с. (in Russian)

Received 03.05.13

Сведения об авторах:

Максимович Наталья Евгеньевна — д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Митциев А.К.

Роль активации процессов липопероксидации в механизмах развития патологии сердечно-сосудистой системы при действии тяжелых металлов в эксперименте

ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России,
362019, Республика Северная Осетия Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40

Основными антропогенными загрязнителями атмосферного воздуха являются тяжелые металлы, отнесенные Всемирной организацией здравоохранения к токсическим веществам 1 класса опасности. Проникая в организм различными путями, металлы оказывают мощное токсическое влияние на все системы организма, однако одной из наиболее уязвимых, ввиду ряда причин, является сердечно-сосудистая система. Известно множество механизмов патогенного влияния ксенобиотиков, приводящих к развитию нарушений деятельности сердечно-сосудистой системы, однако наше внимание привлекла способность металлов реализовывать свое негативное действие посредством активации процессов свободно радикального окисления. Для подтверждения данного предположения необходимо было провести экспериментальное изучение влияния антиоксидантов в условиях длительного действия тяжелых металлов. В качестве антиоксидантного средства применялся мелатонин. Исследование состояния системной гемодинамики заключалось в определении среднего артериального давления, удельного периферического сосудистого сопротивления, ударного индекса и сердечного индекса. Интенсивность процессов свободно радикального окисления оценивалась по концентрации гидроперекисей и малонового диальдегида в крови животных. Результаты экспериментальных исследований позволили установить, что длительное поступление в организм тяжелых металлов (кобальта, кадмия и ртути) приводит к развитию выраженных гемодинамических нарушений, сочетающихся с резким ростом уровня продуктов перекисного окисления липидов в крови. Мелатонин в условиях интоксикации тяжелыми металлами достоверно снижает гипертензивный эффект тяжелых металлов на системную гемодинамику, что в совокупности со снижением интенсивности процессов перекисного окисления липидов позволяет считать активацию процессов липопероксидации одним из основных патогенетических факторов развития гемодинамических расстройств в условиях отравления тяжелыми металлами.

Ключевые слова: тяжелые металлы; сердечно-сосудистая система; перекисное окисление липидов; мелатонин

Mitsiev A.K.

State educational institution of higher professional education «North Ossetian State medical academy» of the Ministry of health of the Russian Federation,
362019, Republic of North Ossetia — Alania, Vladikavkaz, Pushkinskaja street, 40

The main anthropogenic air pollutants are heavy metals, World Health Organization related to toxic substances hazard class 1. Penetrating into the body in different ways, metals have a strong toxic effect on all body systems, but one of the most vulnerable, due to a number of reasons, is the cardiovascular system. There are many mechanisms of pathogenic influence of xenobiotics, leading to the development of disorders of the cardiovascular system, but our attention was attracted by the ability of metals to realize their negative effects through the activation of free radical. To confirm this assumption, it was necessary to conduct a pilot study of the effect of antioxidants in long-term effect of heavy metals. As an antioxidant agent used melatonin. Investigation of the state of systemic hemodynamics is to determine the mean arterial pressure, specific peripheral vascular resistance, stroke index and cardiac index. The intensity of free radical concentration was estimated by malondialdehyde and hydroperoxides in the blood of animals. The results of experimental studies revealed that prolonged intake of heavy metals (cobalt, cadmium and mercury) leads to the development of marked hemodynamic disturbances, combined with a sharp increase in the level of lipid peroxidation products in the blood. Melatonin under intoxication by heavy metals significantly reduced hypertensive effect of heavy metals on systemic hemodynamics, which together with a reduction of lipid peroxidation processes allows us to consider the activation of lipid peroxidation one of the major pathogenic factor in the development of hemodynamic disorders in conditions of heavy metal poisoning.

Key words: heavy metals; cardiovascular system; lipid peroxidation; melatonin

Для корреспонденции: Митциев Астан Керменович, к.м.н., ст. преподаватель кафедры нормальной физиологии,
e-mail: digur1985@mail.ru

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами носит нарастающий характер и обусловлено активной деятельностью человека. Тяжелые металлы являются высокотоксичными веществами, обладающими политропным действием [1]. Патофизиологический механизм деструктивного действия ксенобиотиков как политоксических ядов, лежит в их способности снижать активность ферментов, путем ингибирования в их структурах карбоксильных и сульфгидрильных групп [2]. Патогенное влияние тяжелых металлов на сердечно-сосудистую систему реализуется различными путями, однако все они направлены на повышение артериального давления, формирование структурных изменений в миокарде и эндотелии сосудистого русла [3]. Активация процессов перекисного окисления липидов, приводящая к накоплению продуктов липопероксидации в цитоплазме клеток, является одним из наиболее частых способов реализации деструктивного влияния ксенобиотиков на организм [4]. Вследствие этого, необходимым является изучение роли процессов свободно радикального окисления в формировании функциональных нарушений сердечно-сосудистой системы.

В качестве антиоксидантного средства в условиях экспериментального отравления тяжелыми металлами, применялся синтетический аналог гормона эпифиза — «Мелаксен» фирмы Unipharm-USA. Общеизвестно, что мелатонин является одним из самых мощных естественных антиоксидантов [5], и его возможная способность профилактировать функциональные нарушения сердечно-сосудистой системы в условиях интоксикации тяжелыми металлами позволит считать формирование окислительного стресса ведущим патогенетическим фактором развития гемодинамических нарушений в системе кровообращения.

Таким образом, *целью настоящей работы* было исследование возможной взаимосвязи между развитием функциональных нарушений системной гемодинамики и активацией процессов липопероксидации.

Методика

Работа выполнена на 105 крысах-самцах линии Вистар, массой 200—300 г. При проведении экспериментальных исследований руководствовались Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г.), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и статьей 11-й Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964).

Исследования проводились в 7 группах животных: 1-я группа — интактные животные, с подкожным введением фиксированного объема физиологического

раствора; 2-я группа — животные с подкожным введением хлорида кобальта в дозе 2 мг/кг, в течение 30 дней; 3-я группа — животные с подкожным введением хлорида кобальта в дозе 2 мг/кг, и интрагастральным введением мелаксена в дозе 10 мг/кг; 4-я группа — животные с подкожным введением сульфата кадмия в дозе 0,1 мг/кг, в течение 30 дней; 5-я группа — животные с подкожным введением сульфата кадмия в дозе 0,1 мг/кг и интрагастральным введением мелаксена в дозе 10 мг/кг; 6-я группа — животные с подкожным введением хлорида ртути в дозе 0,5 мг/кг, в течение 30 дней; 7-я группа — животные с подкожным введением хлорида ртути в дозе 0,5 мг/кг и интрагастральным введением мелаксена в дозе 10 мг/кг;

По завершении сроков введения тяжелых металлов в условиях острого эксперимента определяли гемодинамические показатели, животные находились под тиопенталовым наркозом. Определялись следующие показатели: артериальное давление — инвазивно, путем введения в бедренную артерию пластикового катетера, заполненного 10% раствором гепарина и подключенного к электроманометру «ДДА» (Россия). Показания регистрировались с помощью монитора МХ-04 (Россия), распечатка данных велась на принтере Epson — 1050 (США). Рассчитывалось среднее артериальное давление (САД) по формуле $САД = ДД + 1/3ПД$, где ДД — диастолическое давление, ПД — пульсовое давление. Для измерения минутного объема крови через левую общую сонную артерию в дугу аорты вводился термистор МТ-54М (Россия). Физиологический раствор фиксируемой температуры объемом 0,2 мл вводился в правое предсердие через катетеризируемую правую яремную вену. Кривые термодилуции регистрировались на самописце ЭПП-5 (Россия). По специальным формулам [6] рассчитывались сердечный индекс (СИ), ударный индекс (УИ) и удельное периферическое сосудистое сопротивление (УПСС).

Для оценки уровня интенсивности процессов свободно радикального окисления определяли: концентрацию малонового диальдегида в эритроцитах животных спектрофотометрическим способом (РV1251С) (ЗАО Solar, Минск, Беларусь), основанном на способности малонового диальдегида взаимодействовать с тиобарбитуровой кислотой, и концентрацию гидроперекисей в плазме крови способом, основанном на ультрафиолетовом поглощении липидов экстрактов крови с помощью спектрофотометрического набора «ТБК-АГАТ (Биоконт)» «Агат-Мед» (Москва). Полученные результаты экспериментальных исследований статистически обработаны с применением критерия «t» Стьюдента методом вариационного анализа, с помощью программы Prizma 4.0.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных результатов биохимических исследований, позволил установить, что длительное введение кобальта в организм экспериментальных животных приводило к развитию окислительного напряжения, характеризовавшегося увеличением содержания малонового диальдегида в эритроцитах и уровня гидроперекисей в плазме крови крыс, относительно фоновых значений (табл. 1). Активация свободно радикальных процессов в условиях кобальтовой интоксикации сочеталась с падением насосной функции сердца и с увеличением среднего артериального давления у животных, основной причиной повышения которого явился рост удельного периферического сосудистого сопротивления, относительно значений интактного контроля (табл. 2). В условиях патогенного действия кобальта мелатонин в полной мере реализовывал свое антиоксидантное действие, снижая интенсивность образования продуктов перекисного окисления липидов — малонового диальдегида и гидроперекисей в крови животных, по сравнению с показателями группы животных получавших только ксенобиотик (табл. 1). С одновременным снижением интенсивности процессов липопероксидации мелатонин в условиях кобальтовой интоксикации также способствовал уменьшению повышенного среднего артериального давления, благодаря снижению общего периферического сосудистого сопротивления, вызывал тенден-

цию к повышению ударного, и как следствие, сердечного индексов, относительно значений группы животных с изолированным введением металла (табл. 2).

Подкожное введение кадмия экспериментальным животным приводило к увеличению интенсивности процессов перекисного окисления липидов, о чем свидетельствовало увеличение концентраций гидроперекисей в плазме крови и малонового диальдегида в эритроцитах животных, относительно значений интактного контроля (табл. 1). На фоне активации свободно радикальных процессов также выявлялись гемодинамические эффекты длительного введения кадмия, характеризовавшиеся увеличением среднего артериального давления, несмотря на одновременное снижение насосной функции сердца, по сравнению с показателями фоновой группы. Развившаяся артериальная гипертензия в условиях кадмиевого отравления была следствием увеличения удельного периферического сосудистого сопротивления (табл. 2). Введение мелатонина на фоне длительного поступления в организм кадмия способствовало снижению окислительного напряжения в организме животных, что подтверждалось уменьшением концентраций малонового диальдегида в эритроцитах и гидроперекисей в плазме крови крыс, относительно значений животных получавших только кадмий (табл. 1). Антиоксидантное влияние мелатонина в условиях кадмиевого отравления сочеталось с профилактикой гемодинамических

Таблица 1

Влияние тяжелых металлов на концентрацию малонового диальдегида и гидроперекисей в плазме крови у крыс (M ± m)

Условия опыта	Статистический показатель	Малоновый диальдегид (мкмоль/л)	Гидроперекиси (мкмоль/л)
I	II	III	IV
Фон	M ± m	70,97 ± 1,769	2,16 ± 0,15
CoCl ₂ п/к	M ± m	93,82 ± 1,324	4,83 ± 0,127
	p	*	*
CoCl ₂ п/к + Мелатонин в/ж	M ± m	84,64 ± 1,164	3,39 ± 0,118
	p	* ^ ^	* ^
CdSO ₄ п/к	M ± m	87,16 ± 1,307	3,82 ± 0,147
	p	*	*
CdSO ₄ п/к + Мелатонин в/ж	M ± m	79,31 ± 1,482	2,89 ± 0,152
	p	** #	** #
HgCl ₂ п/к	M ± m	89,63 ± 1,805	3,65 ± 0,156
	p	*	*
HgCl ₂ п/к + Мелаксен в/ж	M ± m	81,33 ± 1,615	2,84 ± 0,169
	p	* ++	* ++

Примечание. * — достоверное (p ≤ 0,001) изменение по сравнению с фоном; ** — достоверное (p ≤ 0,05) изменение по сравнению с фоном; ^ — достоверное (p ≤ 0,001) изменение относительно подкожного введения CoCl₂; ^^ — достоверное (p ≤ 0,05) изменение относительно подкожного введения CoCl₂; # — достоверное (p ≤ 0,001) изменение относительно подкожного введения CdSO₄; ++ — достоверное (p ≤ 0,05) изменение относительно подкожного введения HgCl₂.

эффектов ксенобиотика: происходило снижение повышенного среднего артериального давления из-за уменьшения общего периферического сосудистого сопротивления, отмечалось и заметное восстановление сердечного индекса, по сравнению с показателями животных получавших только кадмий (табл. 2).

Ртуть в условиях длительного поступления в организм экспериментальных животных, оказывала выраженный прооксидантный эффект, подтверждавшийся увеличением содержания основных продуктов перекисного окисления липидов в крови крыс, относительно фоновых значений (табл. 1). Активация процессов липопероксидации в условиях сулемовой интоксикации, сочеталась с развитием гемодинамических нарушений, проявлявшихся приростом среднего артериального давления, несмотря на синхронное снижение насосной функции сердца (табл. 2).

Гипертензивная реакция сердечно-сосудистой системы в условиях сулемовой интоксикации развивалась вследствие роста удельного периферического сосудистого сопротивления (табл. 2). Мелатонин, как и в случае с другими ксенобиотиками, оказывал выраженное антиоксидантное действие в условиях ртутного отравления, что подтверждалось снижением в крови концентраций гидроперекисей и малонового диальдегида, относительно значений группы животных получавших только ртуть (табл. 1). Наряду с антиоксидантным действием в условиях сулемовой интоксикации, мелатонин оказывал гипотензивное влияние в условиях артериальной гипертензии, вызванной

длительным введением ртути в организм крыс, что подтверждалось достоверно значимым снижением среднего артериального давления, по сравнению с показателями группы животных получавших только ксенобиотик (табл. 2).

Таким образом, полученные результаты исследования, подтверждают прооксидантную активность тяжелых металлов и доказывают, что ксенобиотики в условиях длительного поступления в организм являются патогенетическими факторами развития оксидативного стресса. В свою очередь, накопление продуктов перекисного окисления липидов в клеточном аппарате организма, оказывает патогенное влияние на функциональное состояние внутренних органов, в частности вызывает развитие гемодинамических нарушений. Обладая выраженным антиоксидантным действием, мелатонин в условиях отравления тяжелыми металлами приводит к снижению интенсивности процессов свободно радикального окисления, а способность мелатонина профилактировать гемодинамические изменения сердечно-сосудистой системы в условиях отравления ксенобиотиками, позволяет считать активацию процессов липопероксидации одним из механизмов развития патологии системного кровообращения при действии тяжелых металлов.

Выводы

Длительное введение в организм животных кобальта, кадмия и ртути приводит к развитию оксидативного напряжения, характеризующегося увеличе-

Таблица 2

Влияние тяжелых металлов на основные гемодинамические показатели у крыс (M ± m)

Условия опыта	Статистический показатель	Среднее артериальное давление	Удельное периферическое сосудистое сопротивление	Сердечный индекс	Ударный индекс
Фон	M ± m	111,4 ± 2,6	1,710 ± 0,079	53,25 ± 2,4	0,137 ± 0,005
CoCl ₂ п/к	M ± m	129,6 ± 2,9	2,187 ± 0,086	45,65 ± 1,93	0,117 ± 0,009
	p	*	*	**	—
CoCl ₂ п/к + Мелатонин в/ж	M ± m	121,3 ± 2,4	1,984 ± 0,087	49,32 ± 2,15	0,123 ± 0,008
	p	** ^	** ^	—	—
CdSO ₄ в/ж	M ± m	124,6 ± 2,7	2,619 ± 0,108	39,52 ± 2,2	0,092 ± 0,008
	p	**	*	*	*
CdSO ₄ в/ж + Мелатонин в/ж	M ± m	117,8 ± 2,4	2,143 ± 0,099	46,71 ± 2,1	0,118 ± 0,007
	p	** #	** #	** #	** #
HgCl ₂ в/ж	M ± m	125,4 ± 2,3	2,694 ± 0,117	36,53 ± 2,1	0,090 ± ,008
	p	*	*	*	*
HgCl ₂ в/ж + Мелаксен в/ж	M ± m	118,7 ± 2,5	2,195 ± 0,096	44,72 ± 2,8	0,114 ± ,007
	p	** +	* +	** +	** +

Примечание. * — достоверное ($p \leq 0,001$) изменение по сравнению с фоном; ** — достоверное ($p \leq 0,05$) изменение по сравнению с фоном; ^ — достоверное ($p \leq 0,05$) изменение относительно подкожного введения CoCl₂; # — достоверное ($p \leq 0,05$) изменение относительно подкожного введения CdSO₄; + — достоверное ($p \leq 0,05$) изменение относительно подкожного введения HgCl₂.

нием содержания в крови продуктов перекисного окисления липидов. Прооксидантное действие ксенобиотиков сочетается с развитием выраженных гемодинамических сдвигов системного кровообращения. Мелатонин посредством оказываемого антиоксидантного действия способствует снижению не только прооксидантного действия ксенобиотиков, но и уменьшает выраженность сердечно-сосудистых эффектов тяжелых металлов в эксперименте.

Список литературы

1. Navaneethan D. Rasool M.K. An experimental study to investigate the impact of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol, on cadmium chloride-induced renal toxicity. *Food and Function*. 2014; 5 (10): 2438-45.
2. Гутникова, А.Р., Махмудов К.О., Саидханов Б.А. О Мембранотропном действии солей тяжелых металлов и основных путях его коррекции. *Токсикол. вестник*. 2009; 3: 21-7
3. Angeli J.K. Cruz Pereira C.A. et al. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 65: 838-48.
4. Jia Q. Ha X., et al. Oxidative stress: a possible mechanism for lead-induced apoptosis and nephrotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2012; 22 (9): 705-10.
5. Лилица Г.А., Заславская Р.М., Калинина Е.В. Эффективность метаболических препаратов в комплексном лечении пожилых больных постинфарктным кар-

диосклерозом и недостаточностью кровообращения. *Клин. медицина*. 2005; 3: 54-7.

6. Брин В.Б., Зонис Б.Я. *Физиология системного кровообращения*: Ростов-на-Дону: Издательство Ростовского университета; 1984.

Поступила

References

1. Navaneethan D. Rasool M.K. An experimental study to investigate the impact of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol, on cadmium chloride-induced renal toxicity. *Food and Function*. 2014; 5 (10): 2438-45.
2. Gutnikova, A.R., Mahmudov K.O., Saidhanov B.A. O Membranotropnom dejstvii solej tzhazhelyh metallov i osnovnyh putjah ego korrekcii. *Toksikol. vestnik*. 2009; 3: 21-7.
3. Angeli J.K., Cruz Pereira C.A. et al. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 65: 838-48.
4. Jia Q. Ha X., et al. Oxidative stress: a possible mechanism for lead-induced apoptosis and nephrotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2012; 22 (9): 705-10.
5. Lilica G.A., Zaslavskaja R.M., Kalinina E.V. Jeffektivnost' metabolicheskikh preparatov v kompleksnom lechenii pozhilyh bol'nyh postinfarktym kardiosklerozom i nedostatochnost'ju krovoobrashhenija. *Klin. meditsina*. 2005; 3: 54-7.
6. Brin V.B., Zonis B.Ja. *Fizjologija sistemnogo krovoobrashhenija*: Rostov-na-Donu: Izdatel'stvo Rostovskogo universiteta; 1984.

Received

Калиш С.В.¹, Буданова О.П.², Лямина С.В.¹, Малышев И.Ю.^{1,2}

Генетические особенности систем генерации оксида азота определяют устойчивость организма к развитию карциномы

¹ — Московский Государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Министерство образования и науки России, 127473, Москва

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Федеральное агентство научных организаций, 125315, Москва

Предрасположенность к опухоли часто определяется тем, насколько эффективно генотип индивида формирует иммунную защиту. Важным фактором такой защиты является макрофагальный NO. Мы предположили, что уязвимость организма к развитию опухоли может определяться генетическими особенностями систем генерации NO. Содержание NO в опухоли изменяли с помощью ИТУ, ингибитора iNOS, с-PTIO, ловушки NO и SNP, донора NO. Продукцию NO макрофагами оценивали по нитритам в культуральной среде. iNOS оценивали с помощью Western blot анализ. Фенотип макрофагов оценивали с помощью цитофлуориметрии по CD маркерам. Данные опытов показали, что продолжительность жизни мышей C57BL/6N с опухолью Эрлиха была на 25% больше, чем у C57BL/6J. Снижение содержания NO в опухоли снижало продолжительность жизни высокоустойчивой к опухоли сублинии C57BL/6N на 23%. Повышение содержания NO повышало продолжительность жизни низкоустойчивой сублинии C57BL/6J на 26%. Макрофаги C57BL/6N, имели в 1,5 раза более высокую продукцию NO и содержание iNOS, по сравнению с макрофагами C57BL/6J. CD маркеры фенотипа определили фенотип макрофагов C57BL/6N как M1, а фенотип макрофагов C57BL/6J как M2. Таким образом, уязвимость организма к развитию опухоли может определяться генетическими особенностями систем генерации макрофагального NO. C57BL/6J, в отличие от C57BL/6N не синтезируют NNT (nicotinamide nucleotide transhydrogenase) и имеют различия в однонуклеотидном полиморфизме. Важная роль NO в устойчивости к карциноме, NNT и однонуклеотидный полиморфизм заслуживают внимания при разработке новых методов противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: C57BL/6N; C57BL/6J; фенотип M1 и M2; макрофаги; NO; ловушки NO; доноры NO, блокаторы NO-синтазы, карцинома Эрлиха; опухоль

Kalish S.V.¹, Budanova O.P.², Lyamina S.V.¹, Malyshev I.Yu.^{1,2}

Genetic features of nitric oxide generating systems predetermine the body's resistance to the development of carcinoma

¹ — Moscow State medical stomatological University. A.I. Evdokimova. The Ministry of education and science of Russia. 127473, Moscow, Russia

² — Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of general pathology and pathophysiology», 125315, Moscow, Russia

Predisposition to tumors is often determined by how effectively the genotype of an individual forms an immune defense. An important factor of such protection is macrophage NO. We assumed that the body's vulnerability to the development of tumors may depend from the characteristics of the NO generating systems. The content of NO in the tumor changed by ИТУ, inhibitor of iNOS, c-PTIO, traps and SNP, donor NO. Production of macrophage NO were evaluated by nitrites in the culture media. iNOS was assessed using the Western blot analysis. Phenotype of macrophages was assessed using cytometry for CD labels. Life span of mice C57BL/6N with Ehrlich tumor was 25% greater than that of the C57BL/6J. Reducing the content of NO in the tumor reduced life expectancy of high-resistance to tumor subline C57BL/6N at 23%. Increase of NO increased life expectancy of low-resistance subline C57BL/6J at 26%. Macrophages of C57BL/6N were 1.5 times higher contents of iNOS and NO production, as compared with macrophages of C57BL/6J. CD phenotype markers determined the macrophage phenotype C57BL/6N as M1 and C57BL/6J mice macrophage phenotype as M2. Thus, the body's vulnerability to the development of tumors may depend from the characteristics of the NO generating systems. C57BL/6J, unlike C57BL/6N does not synthesize NNT (nicotinamide nucleotide transhydrogenase) and have differences in the single nucleotide polymorphism (SNP). The important role of NO in the resistance to Carcinoma, NNT and SNP deserve attention in the development of new methods of antitumor therapy.

Key words: C57BL/6N; C57BL/6J; M1 and M2 phenotype; macrophages; NO; NO traps; NO donor; NOS inhibitors; Ehrlich carcinoma; tumor

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич, зав. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Несмотря на успехи в области фармакологического лечения, онкологические заболевания, по-прежнему, имеют серьезные социальные и экономические последствия. В связи с этим, понимание молекулярных и клеточных механизмов канцерогенеза и обоснование новых эффективных способов ограничения опухолевого роста является одной из фундаментальных проблем современной медицины.

Уязвимость организма к развитию опухоли определяется многими факторами, среди которых генетическая предрасположенность часто играет ключевую роль [1—3]. В свою очередь генетическая предрасположенность к развитию опухолей определяется тем, насколько эффективно генотип индивида или вида формирует противоопухолевую иммунную защиту. Одним из важных факторов такой защиты является оксид азота (NO) и соответственно эффективность систем генерации NO [4, 5—7].

В совокупности это позволяет нам выдвинуть гипотезу, о том, что уязвимость организма или вида к развитию опухоли может предопределяться генетическими особенностями систем генерации NO. Цель работы состояла в проверке этой гипотезы.

Для достижения этой цели мы решили три задачи:

1) оценили уязвимость к развитию опухоли Эрлиха мышей разных генетических сублиний, а именно C57BL/6J и C57BL/6N;

2) с помощью ловушек NO, блокаторов индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и доноров NO. Оценили, насколько важна роль NO в различиях уязвимости мышей разных генетических сублиний к развитию опухоли;

3) оценили мощность систем генерации NO у макрофагов, основных продуцентов иммуногенного NO.

Методика

Экспериментальные животные

Работа была проведена на мышах двух генетически различных сублиний линии C57BL/6: C57BL/6J (15 мышей) и C57BL/6N (15 мышей). C57BL/6J были получены в питомнике животных «Андреевка» (<http://andreevka.msk.ru/index.htm>), а C57BL/6N — в питомнике «Пуццино» (<http://www.spf-animals.ru>). Эксперименты проводились в соответствии с руководством ВОЗ для биомедицинских исследований на животных (http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm).

Опухоль Эрлиха

Опухолевый рост инициировали с помощью внутрибрюшинного введения клеток асцитной карциномы Эрлиха. Клетки опухоли были получены в «Россий-

ском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина». Мышам, внутрибрюшинно вводили 250 тысяч опухолевых клеток, разведенных в 0,2 мл физиологического раствора. Каждый день, до момента гибели, мышей взвешивали. Устойчивость мышей к карциноме Эрлиха оценивали по продолжительности жизни после введения опухолевых клеток и по изменению веса животных, которое отражало накопление асцита в брюшной полости.

Препараты, влияющие на содержание NO

Для изменения содержания NO в зоне опухоли использовали ITU (S-(2-aminoethyl isothioure), селективный ингибитор iNOS, в концентрации 10 мг/кг, с-PTIO ([2-4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxil-3-oxide]), ловушку NO, которая не проникает через клеточную мембрану и не входит в клетку [8], в дозе 200 мкмоль и нитропруссид натрия (sodium nitroprusside SNP), донор NO [9], в дозе 200 мкмоль. Препараты вводили внутрибрюшинно на 3, 7, 12 дни после привития опухоли. Эти дни соответствовали началу лаг, лог и терминальной фаз роста асцитной карциномы Эрлиха.

Оценка систем генерации NO макрофагов

Для оценки макрофагальной продукции NO, из мышей выделяли перитонеальные макрофаги [10]. После выделения, макрофаги размещали в плоскодонные лунки 48-луночных культуральных планшетов в среде RPMI-1640 с 10% сывороткой с 100 U/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина при 37°C и 5% CO₂. Макрофаги распределяли из расчета 0,5 млн клеток на лунку в 0,5 мл среды. Для оценки базальной продукции NO, макрофаги культивировали 24 часа, а для оценки стимулированной — добавляли липополисахарид (ЛПС) в концентрации 500 нг/мл на 24 часа. После этого оценивали продукцию NO макрофагами спектрофотометрически, по содержанию нитритов в культуральной среде с помощью реакции Грисса [11] и содержание iNOS с помощью стандартного метода Western blot анализ [12] и антител к iNOS (iNOS antibodies rabbit polyclonal (KAS-N0001, Assay Designs, USA).

Оценка фенотипа макрофагов

Фенотип макрофагов оценивали по продукции NO и содержанию iNOS, а также с помощью поверхностно-клеточных маркеров M1 фенотипа CD25 и CD80 и маркеров M2 фенотипа CD163 и CD206 [13]. Для определения маркеров использовали метод проточной цитофлуориметрии и моноклональные антитела к CD80 и CD25 (Beckman Coulter) и к CD163 и CD206 (Beckman Coulter CD163 и BD Pharmingen CD206) [13]. Подготовка проб макрофа-

гов для анализа проводилась по инструкциям производителя. Оценивали процентное содержание маркеров M1 и M2 фенотипов среди всех макрофагов. Увеличение продукции NO, содержания iNOS и CD маркеров M1 фенотипа свидетельствовало о формировании M1 фенотипа, а снижение продукции NO и содержания iNOS и увеличение CD маркеров M2 фенотипа свидетельствовало о формировании M2 фенотипа [13].

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 8.0 (Statsoft). Данные представлены в виде средних значений полученных показателей (M) и их ошибок ($\pm m$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1. Мыши C57BL/6N

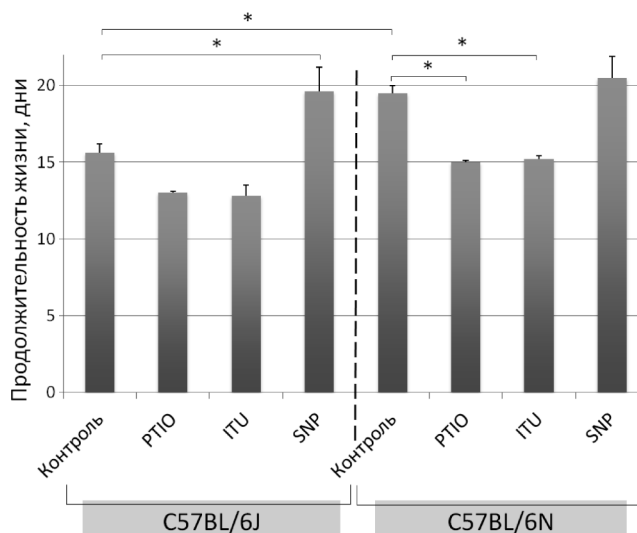
более устойчивы к карциноме Эрлиха по сравнению с мышами C57BL/6J

После введения опухолевых клеток продолжительность жизни мышей сублинии C57BL/6J составила $15,6 \pm 0,6$ дней, тогда как у C57BL/6N — $19,5 \pm 0,5$ дней ($p < 0,01$), то есть была на 25% дольше. Токсическое действие карциномы Эрлиха проявлялось у обеих сублиний увеличением асцита в брюшной полости, и соответственно увеличением веса животных. Однако у мышей сублинии C57BL/6N увеличение веса к 10 дню развития опухоли, по сравнению с первым днем составило лишь $6,5 \pm 1,1\%$, тогда как у C57BL/6J — $12,7 \pm 1,8\%$ ($p < 0,01$), то есть было почти в два раза больше.

Таким образом, мыши сублинии C57BL/6N оказались достоверно более устойчивыми к развитию асцитной карциномы Эрлиха, по сравнению с мышами сублинии C57BL/6J по параметрам продолжительности жизни и накопления асцитической жидкости в брюшной полости.

2. Увеличение содержания NO в зоне опухоли увеличивает, а снижение — снижает продолжительность жизни мышей с карциномой Эрлиха

Гистограммы на рисунке показывают, как изменение содержания NO в зоне роста опухоли влияет на продолжительность жизни мышей. Видно, что снижение содержания NO с помощью ловушки NO, PTIO или с помощью блокатора iNOS, ITU приводит к достоверному снижению продолжительности жизни высокоустойчивой сублинии мышей C57BL/6N с опухолью на 23% ($p < 0,01$). С другой стороны, также видно, что повышение содержания NO с помощью донора NO, SNP приводит к достоверному повышению продолжительности жизни низ-



Влияние изменения содержания NO в зоне роста опухоли на продолжительность жизни мышей.

Снижение содержания NO проводили с помощью ловушки NO, PTIO или с помощью блокатора iNOS, ITU.

Повышение содержания NO проводили с помощью донора NO, SNP. NO — оксид азота; PTIO — ([2-4-carboxyphenyl]-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxil-3-oxide) — ловушка NO; ITU — (S-(2-aminoethyl isothioureia) — блокатор NO; SNP — sodium nitroprusside — донор NO; C57BL/6N и C57BL/6J — сублинии мышей.

По оси ординат — продолжительность жизни, дни. Достоверность отличий между сублиниями мышей: * — $p < 0,01$

коустойчивой сублинии мышей C57BL/6J с опухолью на 26% ($p < 0,01$). При этом ни один из препаратов, модулирующих содержание NO в зоне опухоли, практически не влиял на накопление асцита в брюшной полости мышей (данные не показаны).

Полученные результаты согласуются с гипотезой о важной роли NO в генетически-детерминированном механизме, который определяет продолжительность жизни после начала развития опухоли.

3. Макрофаги мышей с большей устойчивостью к карциноме Эрлиха генерируют больше базального и индуцированного NO, по сравнению с макрофагами мышей с меньшей устойчивостью

Основными продуцентами иммуногенного антиопухолевого NO являются макрофаги. Данные таблицы 1 показывают, что перитонеальные макрофаги высокоустойчивой к опухоли сублинии мышей C57BL/6N, имеют примерно в 1,5 раза более высокую базальную и стимулированную продукцию NO, по сравнению с макрофагами низкоустойчивой к опухоли сублинии мышей C57BL/6J. Этим различиям в продукции макрофагального NO соответствует более высокое содержание iNOS в макрофагах мышей C57BL/6N, по сравнению с C57BL/6J (данные на вставке в таблице).

Высокая продукция NO и содержание iNOS являются маркерами провоспалительного M1 фенотипа макрофагов [13]. На этом основании фенотип макрофагов C57BL/6N можно определить как M1, а фенотип макрофагов C57BL/6J, с более низкой продукцией NO — как M2. Таковую фенотипическую принадлежность подтверждают CD маркеры фенотипа макрофагов. Макрофаги C57BL/6N имели на своей поверхности больше маркеров M1 фенотипа, CD25 и CD80, и меньше маркеров M2 фенотипа, CD163 и CD206, по сравнению с макрофагами C57BL/6J.

Полученные данные согласуются с исходной гипотезой о том, что уязвимость организма или вида к развитию опухоли может предопределяться генетическими особенностями систем генерации NO. NO играет в канцерогенезе двойственную роль. Так с одной стороны показано, что NO может индуцировать апоптоз, благодаря подавлению синтеза антиапоптотического Bcl-2 и увеличению экспрессии проапоптотического Bax и p53 [14], и таким образом обладать антиопухолевым действием. Однако, с другой стороны, NO, благодаря например нитрозилированию каспаз [15, 16] и/или активации синтеза HSP70 [17] может ограничивать развитие апоптоза в опухолевых клетках [18] и соответственно обладать проопухолевым действием. Локальная концентрация NO и свободных радикалов в зоне опухоли определяет, каким образом NO и его метаболиты будут взаимодействовать

с ДНК, с системами репарации ДНК, опухолевым супрессором p53, другими активаторами и ингибиторами апоптоза. Эти взаимодействия, в свою очередь, будут формировать про или анти опухолевые эффекты NO [6].




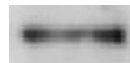
Очевидно, что в наших экспериментах у мышей C57BL/6J и C57BL/6N при развитии опухоли Эрлиха реализовался антиопухолевый эффект NO, так как ловушка NO и блокатор iNOS приводили к снижению продолжительности жизни мышей обеих сублиний после введения опухолевых клеток, а введение донора NO, напротив, увеличивало продолжительность жизни (рисунок).

В ходе иммунного ответа, главным источником синтеза NO являются макрофаги. Макрофаги могут ограничивать рост опухолевых клеток не только за счет продукции NO [19, 20], но также и за счет других механизмов, таких, как увеличение продукции провоспалительных цитокинов [20], свободных радикалов [19] или презентации опухолевых антигенов и формирования Th1 и цитотоксических лимфоцитов [21, 22]. Вместе с тем, тот факт, что селективное блокирование iNOS макрофагов снижает продолжительность жизни мышей с опухолью (рисунок) свидетельствует о важной роли макрофагального NO в антиопухолевой защите.

Наши экспериментальные данные не дают возможность прямо ответить на вопрос, какой механизм определяет генетически-обусловленную более высо-

Таблица

Базальная и стимулированная продукция NO и содержание iNOS в макрофагах, выделенных из высокоустойчивой сублинии C57BL/6N и низкоустойчивой к опухоли сублинии C57BL/6J. На вставках представлены иммунограммы Вестерн блот анализа: интенсивность окрашивания черной полосы соответствует содержанию iNOS в макрофагах

Сублиния	Продолжительность жизни после введения опухоли, дни	Показатели систем генерации NO	
		Базальные условия	Стимулирующие условия
C57BL/6N	19,5 ± 0,5	Нитриты, мкмоль	
		45,7 ± 1,34	74,4 ± 1,26
		iNOS	
		Базальные условия	Стимулирующие условия
			
C57BL/6J	15,6 ± 0,6*	Нитриты, мкмоль	
		29,6 ± 1,43*	52,2 ± 1,28*
		iNOS	
		Базальные условия	Стимулирующие условия
			

Примечание. Достоверность различий между сублиниями мышей: * — $p < 0,001$

кую мощность систем генерации NO макрофагов C57BL/6N, по сравнению с макрофагами C57BL/6J. Вместе с тем, поскольку обе сублинии имеют общее происхождение (от линии C57BL/6), весьма вероятно, что различие в механизмах синтеза NO связано с небольшими отличиями в генотипе этих сублиний. Генетические исследования показали, что генотипы C57BL/6J и C57BL/6N имеют два важных отличия.

Первое отличие. Мыши C57BL/6J, в отличие от C57BL/6N, имеют небольшую делецию в гене никотинамид нуклеотид трансгидрогеназы (nicotinamide nucleotide transhydrogenase, NNT) и поэтому не синтезируют белок NNT [23]. NNT является митохондриальным протонным насосом, который кодируется ядерной ДНК. Отсутствие NNT приводит к нарушению гомеостаза глюкозы и снижению секреции инсулина [23]. В макрофагах, как показали Ripoll et al. [24], NNT играет роль регулятора воспалительных ответов, продукции свободных радикалов и синтеза NO.

Второе отличие. Mekada et al. [25] и Zurita et al. [26] обнаружили различия в однонуклеотидном полиморфизме (SNP) ДНК этих сублиний.

Можно предположить, что различия в механизмах генерации NO и уязвимости к развитию опухоли связаны с отсутствием/присутствием белка NNT и/или различиями в SNP. Это предположение требует тщательного изучения.

Необходимо также учитывать, что в зоне опухоли создаются условия гипоксии и репрограммирование макрофагов может быть связано с этим фактором [27, 28]. Вместе с тем, сам факт важной роли NO в увеличении продолжительности жизни при наиболее агрессивном виде опухоли карциноме, делает перспективным поиск новых подходов к лечению опухолей с помощью манипулирования NO в зоне опухоли. Сопоставление наших данных и анализ литературы, показывает, что ген и белок NNT и различия в SNP, обнаруженные у разных сублиний C57BL/6 также заслуживают внимания при разработке новых методов противоопухолевой терапии.

Исследования были проведены при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки России (Соглашение от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0020, Уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEF160414X0020).

Список литературы

1. Cybulski C, Nazarali S, Narod SA. Multiple primary cancers as a guide to heritability. *Int J Cancer*; 2014 Oct 15; 135(8): 1756-63.
2. Demichelis F, Stanford JL. Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. *Urol Oncol*. 2014 Jul 1. pii: S1078-1439(14)00163-X.
3. Lochhead P, Chan AT, Nishihara R, Fuchs CS, Beck AH, Giovannucci E, Ogino S. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. *Mod Pathol*. 2015 Jan; 28(1):14-29.
4. Bellin D1, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Mol Plant Microbe Interact*. 2013 Mar; 26(3): 271-7.
5. Buijs N, Luttkhold J, Houdijk AP, van Leeuwen PA. The role of a disturbed arginine/NO metabolism in the onset of cancer cachexia: a working hypothesis. *Curr Med Chem*. 2012; 19 (31): 5278-86.
6. Engin AB. Dual function of nitric oxide in carcinogenesis, reappraisal. *Curr Drug Metab*. 2011 Nov; 12 (9): 891-9.
7. Korde Choudhari S, Sridharan G, Gadbaill A, Poornima V. Nitric oxide and oral cancer: a review. *Oral Oncol*. 2012 Jun; 48(6): 475-83.
8. Akaike T. and Maeda H. Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxide 3-oxide (PTIO). *Methods. Enzymol*. 1996; 268:211-21.
9. Wang J, He Q, Yan X, Cai Y, Chen J. Effect of exogenous nitric oxide on sperm motility in vitro. *Biol Res*. 2014 Sep 18; 47 (1): 44.
10. Xia Zhang, Ricardo Goncalves and David M. Mosser. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol*. 2008 November; CHAPTER: Unit-14.1.
11. Redente E.F., Dwyer-Nield L.D., Barrett B.S. et al. Lung tumor growth is stimulated in IFN- γ -/- mice and inhibited in IL-4-R α -/- mice; *Anticancer Research*. 2009; 29(12): 5095-101.
12. Smith F.S., Titheradge M.A. Nitric oxide protocols. *Methods in molecular biology*. 1998; 100: 171-80
13. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008; 1(13): 453-61.
14. Zeini M1, Traves PG, Lopez-Fontal R, Pantoja C, Matheu A, Serrano M, Bosca L, Hortelano S. Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *J Immunol*. 2006 Sep 1; 177(5): 3327-36.
15. Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2005 Jan; 38(1):163-74. Epub 2004 Dec 8.
16. Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res*. 2002 Mar 15; 62(6):1648-53.
17. Malyshev IYu, Malugin AV, Golubeva LYu, Zenina TA, Manukhina EB, Mikoyan VD, Vanin AF. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett*. 1996 Aug 5; 391(1-2):21-3.
18. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013 Jun; 34(6):1181-8. Epub 2013 Apr 4.
19. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-99.
20. Lum HD, Buhtoiarov IN, Schmidt BE, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, Rakhmilevich AL. Tumoristatic ef-

fects of anti-CD40 mAb-activated macrophages involve nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Immunology*, 2006; 118 (2):261-70.

21. Backer R, Schwandt T, Greuter M, Oosting M, Jngerkes F, Tting T et al. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107 (1):216-21.

22. Barrio MM, Abes R, Colombo M, Pizzurro G, Boix C, Roberti MP et al. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8(+) T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PLoS One*, 2012; 7 (7):e40311

23. Toye AA1, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005 Apr; 48 (4):675-86. Epub 2005 Feb 24.

24. Ripoll VM1, Meadows NA, Bangert M, Lee AW, Kadioglu A, Cox RD. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) acts as a novel modulator of macrophage inflammatory responses. *FASEB J*. 2012 Aug; 26(8):3550-62. Epub 2012 May 16.

25. Mekada K1, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim*. 2009 Apr; 58(2):141-9.

26. Zurita E1, Chagoyen M, Cantero M, Alonso R, Gonzalez-Neira A, Lopez-Jimenez A, et al. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res*. 2011 Jun; 20 (3):481-9. Epub 2010 May 27.

27. Малышев И.Ю. Гипоксия и репрограммирование иммунного ответа при развитии опухоли: центральная роль макрофагов. *Патогенез*. 2011;(3): 44-5.

28. Малышев И.Ю., Круглов С.В., Лямина С.В. Гипоксия, воспаление и фенотипическая пластичность макрофагов: центральная роль HIF-1 и NFkB. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012;(3): 42-50.

Поступила 26.02.15

References

1. Cybulski C, Nazarali S, Narod SA. Multiple primary cancers as a guide to heritability; *Int J Cancer*; 2014 Oct 15; 135(8):1756-63.

2. Demichelis F, Stanford JL. Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. *Urol Oncol*. 2014 Jul 1. pii: S1078-1439(14)00163-X.

3. Lochhead P, Chan AT, Nishihara R, Fuchs CS, Beck AH, Giovannucci E, Ogino S. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. *Mod Pathol*. 2015 Jan; 28(1):14-29.

4. Bellin D1, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Mol Plant Microbe Interact*. 2013 Mar; 26(3):271-7.

5. Buijs N, Luttkikholt J, Houdijk AP, van Leeuwen PA. The role of a disturbed arginine/NO metabolism in the onset of cancer cachexia: a working hypothesis. *Curr Med Chem*. 2012; 19 (31): 5278-86.

6. Engin AB. Dual function of nitric oxide in carcinogenesis, reappraisal. *Curr Drug Metab*. 2011 Nov; 12 (9): 891-9.

7. Korde Choudhari S, Sridharan G, Gadbaill A, Poornima V. Nitric oxide and oral cancer: a review. *Oral Oncol*. 2012 Jun; 48(6): 475-83.

8. Akaike T. and Maeda H. Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide (PTIO). *Methods. Enzymol*. 1996; 268: 211-21.

9. Wang J, He Q, Yan X, Cai Y, Chen J. Effect of exogenous nitric oxide on sperm motility in vitro. *Biol Res*. 2014 Sep 18; 47 (1):44.

10. Xia Zhang, Ricardo Goncalves and David M. Mosser. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol*. 2008 November; CHAPTER: Unit-14.1.

11. Redente E.F., Dwyer-Nield L.D., Barrett B.S. et al. Lung tumor growth is stimulated in IFN- γ -/- mice and inhibited in IL-4-R α -/- mice; *Anticancer Research*. 2009; 29(12): 5095-101.

12. Smith F.S., Titheradge M.A. Nitric oxide protocols. *Methods in molecular biology*. 1998; 100: 171-80/

13. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008; 1(13): 453-61.

14. Zeini M1, Traves PG, Lopez-Fontal R, Pantoja C, Matheu A, Serrano M, Bosca L, Hortelano S. Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *J Immunol*. 2006 Sep 1; 177(5): 3327-36.

15. Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2005 Jan; 38(1):163-74. Epub 2004 Dec 8.

16. Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res*. 2002 Mar 15; 62(6):1648-53.

17. Malyshev IYu, Malugin AV, Golubeva LYu, Zenina TA, Manukhina EB, Mikoyan VD, Vanin AF. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett*. 1996 Aug 5; 391(1-2):21-3.

18. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013 Jun; 34(6):1181-8. Epub 2013 Apr 4.

19. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-99.

20. Lum HD, Buhtoiarov IN, Schmidt BE, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, Rakhmilevich AL. Tumorstatic effects of anti-CD40 mAb-activated macrophages involve nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Immunology*. 2006; 118 (2): 261-70.

21. Backer R, Schwandt T, Greuter M, Oosting M, Jngerkes F, Tting T et al. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; 107 (1):216-21.

22. Barrio MM, Abes R, Colombo M, Pizzurro G, Boix C, Roberti MP et al. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8(+) T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PLoS One*, 2012; 7 (7):e40311

23. Toye AA1, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005 Apr; 48 (4):675-86. Epub 2005 Feb 24.

24. Ripoll VM1, Meadows NA, Bangert M, Lee AW, Kadioglu A, Cox RD. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) acts as a novel modulator of macrophage inflammatory responses. *FASEB J*. 2012 Aug; 26(8):3550-62. Epub 2012 May 16.

25. Mekada K1, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim.* 2009 Apr; 58(2): 141-9.

26. Zurita E1, Chagoen M, Cantero M, Alonso R, Gonzalez-Neira A, et al. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res.* 2011 Jun; 20(3):481-9. Epub 2010 May 27.

27. Malyshev I.Yu. Hypoxia and reprogramming the immune response in the development of tumors: the central role of the macrophages. *Patogenez.* 2011;(3): 44-5.(in Russian)

28. Malyshev I.Yu., Kruglov S.V., Lyamina S.V. Hypoxia, inflammation and its phenotypic plasticity of macrophages: the central role of HIF-1 and NFκB. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2012; (3): 42-50. (in Russian)

Received 26.02.15

Сведения об авторах:

Калиш С.В. — ст. лаборант кафедры патофизиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. 127473, Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1, тел. 8(495)365-03-25

Лямина С.В. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. 127473, Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1, тел.8(495)365-03-25

Буданова О.П. — ст.н.с. лаборатории регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИОПП». Москва, 125315, ул.Балтийская, д.8. e-mail: ercsgamma@inbox.ru, тел.+7-499-151-1756

Мальшев И.Ю. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. 127473, Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1, зав. лабораторией регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИОПП», Москва, 125315, ул.Балтийская, д.8; e-mail: iymalyshev1@gmail.com. Тел.+7-499-151-1756.

Белова С.В., Норкин И.А., Пучиньян Д.М.

Влияние биополимера хондроитинсульфата на репаративную регенерацию соединительной ткани

ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России, 410002, г.Саратов, ул. им. Н.Г. Чернышевского, 148

Цель исследования — изучение лечебного эффекта внутрисуставного способа введения препарата «муко-сат» с целью стимуляции процессов репаративной регенерации соединительной ткани коленных суставов у кроликов с экспериментальным артритом. Установлено, что внутрисуставное введение хондроитинсульфата (препарат «муко-сат») оказывает стимулирующее действие на процессы репаративной регенерации соединительной ткани, которое проявляется положительными изменениями в состоянии соединительноткан-ных элементов ткани суставов, снижением содержания гликозаминогликанов в сыворотке крови и нормализа-цией состава их углеводного компонента, что, вероятно, связано со стимуляцией биосинтеза собственных нормальных гликозаминогликанов в тканях коленных суставов животных.

Ключевые слова: соединительная ткань, репаративная регенерация, внутрисуставное введение, экспери-ментальный артрит, хондроитинсульфат

Belova S.V., Norkin I.A., Puchinyan D.M.

The effect of the biopolymer chondroitin sulfate on reparative regeneration of connective tissue

The research objective is a study of an intra-articular method of introduction of the preparation «mukosat» for stimula-tion of reparative regeneration of connective tissue of knee joints in rabbits with an experimental arthritis. It is ascertained that intra-articular introduction of chondroitin sulfate (the preparation «mukosat») acts as a stimulus for reparative regen-eration of connective tissue thus showing up positive changes in the status of connective tissue elements of joints: decrease in glycosaminoglycan content in blood serum and normalization of the composition of glycosaminoglycan carbohydrate component. It probably depends on stimulation of biosynthesis of autologous normal glycosaminoglycans in tissues of ani-mal knee joints.

Key words: connective tissue, reparative regeneration, intra-articular introduction, experimental arthritis, chondroitin sulfate

Воспалительно-деструктивные изменения в соединительной ткани суставов — основной патогенетический механизм ревматоидного артрита [1]. Как правило они обнаруживаются уже на ранней стадии активного синовита, до образования паннуса, являющегося морфологической основой тканевой деструкции [2, 3]. Прогрессирующие изменения в структуре соединительной ткани характеризуются нарушением обмена протеогликанов — функционально важных биополимеров ее экстрацеллюлярного матрикса [4, 5], деструкции нормальных гликозаминогликанов и нарушением их синтеза в фибробластах [6, 7].

В арсенале средств лечения больных ревматоидным артритом не последнее место занимает локальная

терапия. На фармацевтическом рынке широко представлены препараты, в состав которых входят компоненты соединительной ткани, в частности, гиалуроновая кислота, глюкозамин сульфат, хондроитинсульфат. К таким препаратам относится «муко-сат», действующим началом которого является биополимер хондроитинсульфат, введение последнего осуществляется внутримышечно. Принимая во внимание свойство хондроитинсульфата активировать метаболические процессы в соединительной ткани, представляется актуальным изучение действия внутрисуставного введения препарата, как способа непосредственного воздействия на пораженные аутоиммунным процес-сом суставные структуры.

Цель исследования — изучение внутрисуставного способа введения препарата «муко-сат» для стимуляции репаративной регенерации соединительной ткани коленных суставов у кроликов с экспериментальным артритом.

Для корреспонденции: Белова Светлана Вячеславовна, д.биол.н., ст. науч. сотр. отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований, e-mail: sarniito_bsv@mail.ru

Методика

Исследование проведено на 38 кроликах «Шиншила Русская» в стандартных условиях вивария. Кролики с экспериментальным артритом [8], были распределены на 3 группы: опытную (18 кроликов с внутрисуставным введением препарата «муколат» в дозе 0,1 мл один раз в 3 дня, общим курсом 5 инъекций), группу сравнения (10 кроликов с внутрисуставным введением 0,9%-ного раствора хлорида натрия в той же дозе и в те же сроки, что и препарат и контрольную группу из 10 интактных кроликов. В качестве биополимера хондроитинсульфата использовали лекарственный препарат «муколат», представляющий собой 10%-ный раствор хондроитинсульфата, естественного компонента соединительной ткани, который получают из трахеи хрящевой ткани крупного рогатого скота.

Оценивали общее состояние экспериментальных животных, определяли окружность и объем движений в обоих коленных суставах.

Локальные изменения в пораженных коленных суставах животных оценивали по уровню общего цитоза и качественному составу клеточных элементов суставного содержимого, метаболические — по общему содержанию гликозаминогликанов, рассчитываемому по уровню уроновых кислот и по гексоз в сыворотке крови [9].

Эффективность внутрисуставного введения препарата подтверждалась результатами гистоморфометрического исследования тканей коленных суставов (пе-

риартикулярные ткани, синовиальная оболочка, мениски, хрящ и субхондральная кость) с полуколичественной оценкой в баллах общепринятых признаков их поражения [10]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы «MedStat», предназначенной для обработки результатов медицинских и биологических наблюдений.

Эксперименты на животных проводили согласно рекомендациям Европейской конвенции по защите животных.

Результаты и обсуждение

Признаки экспериментального артрита у кроликов по клиническим и лабораторным характеристикам проявляли сходные свойства с ревматоидным артритом у людей. При клиническом обследовании отмечалось снижение аппетита и двигательной активности у опытных животных в сравнении с интактными, увеличение окружности пораженного коленного сустава.

В содержимом сустава с синовитом был повышен цитоз с негативными изменениями качественного состава клеточных элементов (табл. 1). В сыворотке крови было выявлено повышение содержания гликозаминогликанов (табл. 2).

Гистоморфометрические исследования показали утолщение и разрыхление синовиальной оболочки пораженных суставов с единичными точечными кровоизлияниями. Микроскопически у всех животных в синовиальной оболочке суставов наблюдалась очаговая пролифе-

Таблица 1

Общий цитоз и клеточный состав суставного содержимого коленных суставов кроликов ($M \pm m$)

Показатели	Интактные кролики (n = 10)	Кролики с артритом (n = 28)	Опытная группа (n = 18)	Группа сравнения (n = 10)
Цитоз, $\times 10^9/\text{л}$	0,15 \pm 0,01	2,21 \pm 0,09*	0,62 \pm 0,08**	2,30 \pm 0,06***
Нейтрофилы, частота встречаемости, %	9,51 \pm 0,11	42,13 \pm 0,84*	12,35 \pm 0,61**	46,40 \pm 0,52***
Лимфоциты, частота встречаемости, %	8,43 \pm 0,09	39,67 \pm 0,46*	12,88 \pm 0,52**	40,19 \pm 0,07***
Макрофаги, частота встречаемости, %	0	37,08 \pm 0,40*	0,91 \pm 0,06**	41,15 \pm 0,80***
Рагоцитоподобные клетки, частота встречаемости, %	0	30,21 \pm 0,54*	0,80 \pm 0,06**	32,87 \pm 0,68***

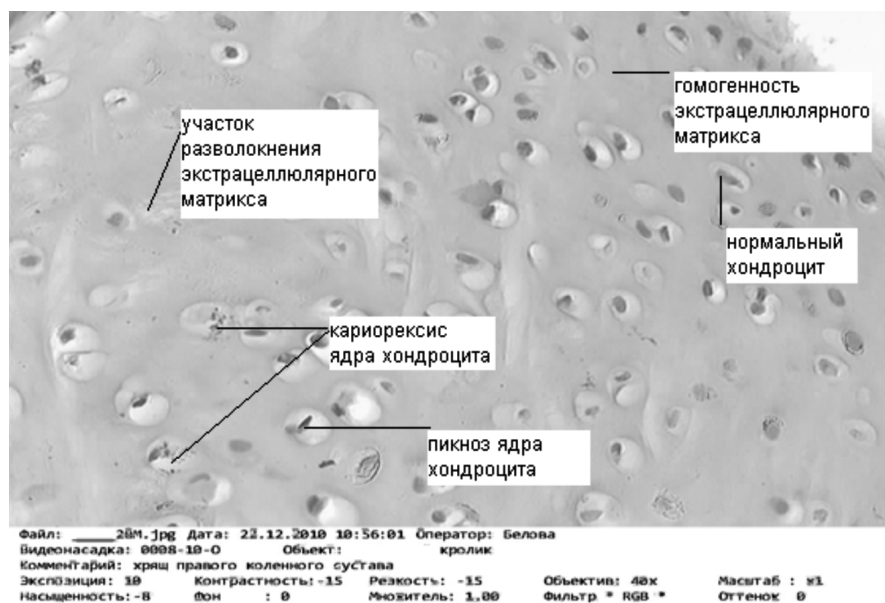
Примечание. * — значимая разница показателей между интактными кроликами и кроликами с экспериментальным артритом; ** — между кроликами с экспериментальным артритом до и после лечения; *** — между кроликами опытной группы и группы сравнения.

Таблица 2

Показатели метаболизма соединительной ткани в сыворотке крови у экспериментальных животных, ($M \pm m$)

Показатель	Интактные кролики (n = 10)	Кролики с артритом (n = 28)	Опытная группа (n = 18)	Группа сравнения (n = 10)
Гликозаминогликаны (уроновые кислоты, $\text{г} \times 10^{-2}/\text{л}$)	1,71 \pm 0,10	2,62 \pm 0,08*	1,93 \pm 0,08**	3,50 \pm 0,09***
Гликозаминогликаны (гексозы, $\text{г} \times 10^{-2}/\text{л}$)	2,58 \pm 0,11	4,18 \pm 0,09*	3,20 \pm 0,08**	4,45 \pm 0,09***

Примечание. В табл. 1 и 2: * — значимые различия между группами «интактные» и «экспериментальный артрит»; ** — «экспериментальный артрит» до и после лечения; *** — экспериментальный артрит: «опытная группа» и «группа сравнения».



Микрофото хряща коленного сустава кролика после внутрисуставных инъекций препарата «муколат». Окраска гематоксилином и эозином. Ув. об. 20, ок. 10.

рация синовиоцитов, у некоторых особей встречались участки с поверхностным некрозом и отложениями фибрина, отмечалась диффузная лимфоидно-гистиоцитарная и плазмоцитарная инфильтрация субинтимального слоя, с незначительным содержанием фибробластов. В менисках определялись единичные плазматические клетки, наблюдалась пролиферация фибробластов. На поверхности хряща имелись небольшие участки с разрыхленным и частично утраченным поверхностным слоем, хондроциты были в состоянии дистрофии, наблюдалась потеря биополимеров гликозаминогликанов. Субхондральная кость характеризовалась истончением субхондральной костной пластинки и трабекул, что свидетельствовало о потере костного вещества.

После окончания курса внутрисуставных инъекций препарата «муколат» отмечалось улучшение лабораторных показателей параллельно с нормализацией клинической картины заболевания. Был существенно снижен уровень цитоза в суставном содержимом, однако полной нормализации не отмечалось. Определение качественного состава клеточных элементов показало уменьшение количества нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов и отсутствие рагоцитоподобных клеток (табл. 1). В сыворотке крови определялось статистически значимое снижение содержания гликозаминогликанов (табл. 2).

Положительное влияние препарата на процессы репаративной регенерации соединительной ткани подтверждали данные гистоморфометрического исследования, которые показали, что макроскопически параартикулярные ткани не были изменены, при микроскопии обнаруживалась незначительная пролиферация пиронинофиль-

ных фибробластов. При макроскопическом исследовании определялось некоторое разрыхление синовиальной оболочки без кровоизлияний на её поверхности, при микроскопии выявлялась незначительная гиперплазия ворсин и пролиферация кроющих клеток, при этом имелись участки отложения фибрина, как на поверхности, так и между синовиоцитами. Мениски при макро- и микроскопии не были изменены. Суставной хрящ макроскопически имел нормальную структуру. При микроскопическом исследовании его поверхностный слой сохранялся, наблюдались единичные участки разрыхления и разволокнения. В ориентации зон нарушений не отмечалось. Упорядоченно расположенные хондроциты не имели признаков дистрофии. Субхондральная кость, как при макроскопическом, так и при микроскопическом исследовании без признаков патологии.

Полученные результаты свидетельствуют о слабо выраженных признаках неспецифического хронического продуктивного воспаления и подтверждают данные клинико-лабораторного исследования в плане терапевтической эффективности внутрисуставного введения препарата «муколат».

В группе сравнения у животных отмечалось ухудшение клинических проявлений заболевания и данных лабораторного исследования.

Известно, что клетки хрящевой ткани способны к интерстициальному росту. При этом происходит нарастание ткани хряща изнутри, что может обеспечить репаративную регенерацию поврежденных соединительнотканых структур суставного хряща. В данной работе изучалась возможность стимуляции репаративной регенерации соединительной ткани коленных суставов

у кроликов с экспериментальным артритом. Препарат «муколат» обладает способностью подавлять активность ферментов, участвовавших в деградации хрящевой ткани. В ходе проведения эксперимента было установлено регулирующее воздействие хондроитинсульфата на метаболизм соединительной ткани и, в частности, на обмен протеогликанов, что сопровождалось снижением содержания гликозаминогликанов в сыворотке крови и нормализацией состава их углеводного компонента.

Таким образом, внутрисуставное введение хондроитинсульфата (препарат «муколат») оказывал стимулирующее влияние на процессы репаративной регенерации соединительной ткани, что проявлялось положительными изменениями состояния соединительнотканых элементов суставов, вероятно, за счет активации биосинтеза собственных нормальных гликозаминогликанов в тканях коленных суставов животных.

Данные исследования положены в основу нового способа внутрисуставного введения хондроитинсульфата — препарата «муколат» в условиях экспериментального артрита у кроликов (Патент РФ №2347572).

Список литературы

1. Насонов Е.Л. Ранний ревматоидный артрит. *Медицинский вестник*. 2006; 13(356): 9-10.
2. Мазуров В.И., Лила А.М. Ранний артрит. Клиническая ревматология. *Руководство для врачей*. СПб.: Фолиант; 2005.
3. Brafee D.D., Pierre-Jerome C., Kettner N.W. Clinical and radiological manifestations of the rheumatoid wrist. A comprehensive review. *J. Manipul. Physiol. Ther.* 2003; 26 (5): 325-9.
4. Ершов К.И., Русова Т.В., Фаламеева О.В., Садовой М.А., Айзман Р.И. Протеогликаны плечевой кости крыс wistar разного возраста. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина*. 2008; 6 (1): 21-5.
5. Русова Т.В., Рыкова В.И., Корель А.В., Зайдман А.М. Структура протеогликанов пластинки роста тел позвонков у больных идиопатическим сколиозом. *Бюллетень Сибирского отделения РАМН*. 2007; 1: 80-3.
6. Garcia S., Mera A., Gomez-Reino J.J., Conde C. Poly(ADP-ribose) polymerase suppression protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis. *Rheumatology*. 2009; 48(5): 483-9.
7. Noh E.M., Kim J.S., Hur H. et al. Cordycepin inhibits IL-1 β -induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology*. 2009; 48(1): 45-8.

8. Pettipher E.R., Henderson B., Moncada S. Higgs G.A. Leucocyte infiltration and cartilage proteoglycan loss in immune arthritis in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 95: 169-76.

9. Карякина Е.В. Клиническое значение определения гликозаминогликанов сыворотки крови и синовиальной жидкости при ревматоидном артрите. *Вопр. ревматологии*. 1982; 4: 31-4.

10. Шехтер А.Б., Крель А.А., Ращупкин З.П. Оценка морфологических проявлений синовита у больных ревматоидным артритом. *Методические рекомендации*. М.; 1985.

Поступила 10.01.14

References

1. Nasonov E.L. Early rheumatoid arthritis. *Meditsinskiy vestnik*. 2006; 13(356): 9-10. (in Russian)
2. Mazurov V.I., Lila A.M. Early arthritis. Clinical rheumatology. [Ranniy artrit. Klinicheskaya revmatologiya]. *Rukovodstvo dlya vrachey*. SPb.: Foliant; 2005. (in Russian)
3. Brafee D.D., Pierre-Jerome C., Kettner N.W. Clinical and radiological manifestations of the rheumatoid wrist. A comprehensive review. *J. Manipul. Physiol. Ther.* 2003; 26 (5): 325-9.
4. Ershov K.I., Rusova T.V., Falameeva O.V., Sadovoy M.A., Ayzman R.I. Proteoglycans of a humeral bone of rats of wistar of different age. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya medicina*. 2008; 6 (1): 21-5. (in Russian)
5. Rusova T.V., Rykova V.I., Korel' A.V., Zaydman A.M. Structure of proteoglycans of a plate of growth of bodies of vertebrae at patients with idiopathic scoliosis. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2007; 1: 80-3. (in Russian)
6. Garcia S., Mera A., Gomez-Reino J.J., Conde C. Poly(ADP-ribose) polymerase suppression protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis. *Rheumatology*. 2009; 48(5): 483-9.
7. Noh E.M., Kim J.S., Hur H., Park B.H., Song E.K., Hon M.K. et al. Cordycepin inhibits IL-1 β -induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology*. 2009; 48(1): 45-8.
8. Pettipher E.R., Henderson B., Moncada S. Higgs G.A. Leucocyte infiltration and cartilage proteoglycan loss in immune arthritis in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 95: 169-76.
9. Karyakina E.V. Clinical value of definition of glycosaminoglycan of serum of blood and synovia liquid at rheumatoid arthritis. *Vopr. revmatologii*. 1982; 4: 31-4. (in Russian)
10. Shekhter A.B., Krel' A.A., Rashchupkin Z.P. Estimation of morphological manifestations of a synovitis at patients with rheumatoid arthritis. [Otsenka morfologicheskikh proyavleniy sinovita u bolnykh revmatoidnym artritom] *Metodicheskie rekomendatsii*. M.; 1985. (in Russian)

Received 10.01.14

Сведения об авторах:

Норкин Игорь Алексеевич, д.м.н., проф., директор ФГБУ «СарНИИТО»

Пучиньян Даниил Миронович, д.м.н., проф., и.о. гл. науч. сотр. отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований

Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л.

Характеристика клеток Лейдига у новорожденного потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64

Проанализированы морфофункциональные особенности интерстициальных эндокриноцитов (клеток Лейдига) у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза. Установлено, что у подопытных крысят имеет место снижение числа клеток Лейдига, изменение соотношения активных и неактивных эндокриноцитов и, как следствие, уменьшение индекса активности этих клеток.

Ключевые слова: семенники, клетки Лейдига, патология печени, крысы, потомство

Bryukhin G.V., Sizonenko M.L.

Characteristics of Leydig cells in the newborn posterity of female rats with chronic injury of the hepatobiliary system of various genesis

South-Ural State medical University, 64, Vorovsky str., Chelyabinsk, 454092, Russia

Morphological and functional features of interstitial endocrine cells (Leydig cells) in the posterity of female rats with experimental liver injury of various genesis in the neonatal period were analyzed. Found that in experimental rats are a reduction in the number of Leydig cells, the ratio between active and inactive endocrinocytes and as a consequence, reduction of its cell activity index.

Key words: testes, Leydig cells, liver disease, rats, posterity

Актуальность исследования обусловлена, прежде всего, увеличением числа бесплодных браков. В настоящее время репродуктологи и социологи особое внимание в структуре бесплодия супружеских пар уделяют мужскому фактору. Согласно современным представлениям, причинами нарушения мужского репродуктивного здоровья являются разнообразные факторы, среди которых особое значение уделяется особенностям пренатального развития, когда формируется репродуктивная система и происходит становление гипоталамо-гипофизарно-гонадных взаимоотношений [4—6]. К сожалению, на сегодняшний день остается до конца не изученным влияние экзогенных и эндогенных факторов на пренатальное становление мужской репродуктивной системы. В то же время для разработки эффективных методов защиты репродуктивной системы от действия факторов, угнетающих сперматогенную функцию человека, необходимо изучение тонких механизмов их повреждающего действия.

Для корреспонденции: Сизоненко Максим Леонидович, к.м.н., доцент каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, e-mail:

Цель исследования — анализ особенностей морфофункционального состояния клеток Лейдига у новорожденного потомства самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Методика

Исследования проведены на белых крысах «Вистар» (самках) и их потомстве в период новорожденности. Для достижения поставленной цели у взрослых половозрелых самок моделировались поражение гепатобилиарной системы.

Алкогольную хроническую интоксикацию с преимущественным поражением печени создавали у крыс до беременности путем замены питьевой воды 15% раствором этилового спирта в течение 3 мес. в условиях свободного доступа [7]. Эту группу (алкогольная «Ал»- группа) составили 12 крысят из 12 пометов.

Мезенхимальное поражение печени у самок крыс создавали путем введения 20 ЕД активности щелочной фосфатазы [8]. Эту группу (мезенхимальная «М»- группа) составили 10 крысят из 10 пометов.

Аутоиммунное поражение печени создавали путем длительной (4 мес) сенсibilизации животных гомологичным антигеном печени с адъювантом Фрейнда по общепринятой методике. Первоначально печеночный антиген вводили подкожно с адъювантом Фрейнда, а затем внутривентриально в возрастающих дозах с интервалом 3 сут (всего 7 инъекций). Повторную иммунизацию проводили через 10—15 сут. от момента последней инъекции по сходной схеме. Всего проведено 3 цикла иммунизации. Доза печеночного антигена, получаемого животными за полный курс иммунизации, составила 200 мг гомологичного антигена. Эту группу (аутоиммунная «А»-группа) составили 10 крысят из 10 пометов.

Лекарственное поражение печени осуществляли путем интрагастрального введения животным тетрациклина в дозе 1,5 г на кг массы тела на 1% крахмальном растворе ежедневно в течение 5 сут. [9]. Эту группу (лекарственная «Л»-группа) составили 9 крысят из 9 пометов.

Поражение печени верифицировали морфологически (жировая дистрофия гепатоцитов, расширение синусоидных капилляров, дисконфлексация гепатоцитов, умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы печени), биохимически (увеличение аспаратаминотрансферазы, гамма-глутамилтранспептидазы, повышение концентрации билирубина) и иммунологически (титр противопеченочных антител 1:64 и 1:128) критериев. Через 1 нед. после замены спирта водой и введения гепатотоксических соединений (D-галактозамина и щелочной фосфатазы) к крысам подсаживали интактных самцов.

Группу сравнения (контрольная «К»-группа) составили 14 крысят из 14 пометов.

Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ №755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР).

Объектом исследования явилось однодневное потомство самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы. На серийных гистологических срезах семенников, окрашенных гематоксилином и эозином, при помощи морфометрической установки Motic VA 400 (Германия) проводили определение площади интерстициальной ткани семенников. Кроме того, производили подсчет суммарного количества клеток Лейдига, в общей популяции которых определяли активные и неактивные гландулоциты [10]. Клетки Лейдига подлежали количественной оценке в 30 полях зрения из расчета на один строго поперечный срез извитого семенного канальца. Индекс активности интерстициальных гландулоцитов семенника подсчитывали как отношение числа активных клеток Лейдига к неактивным, подсчитанным

в общих 30 полях зрения. Кроме того, определялся коэффициент (K_1), отражающий отношение числа клеток Лейдига к суммарному содержанию сперматогенных клеток из расчета на один семенной каналец. Учитывая тесные паракринные взаимоотношения между клетками Лейдига и sustentocytes, нами производился подсчет коэффициента (K_2), отражающего отношение суммарного количества интерстициальных эндокриноцитов к таковому клеток Сертоли.

Полученные данные обработаны на компьютере с использованием программы Statistica v.6. (Stasoft, Inc.). Учитывая небольшую выборку животных, значимость результатов оценивали непараметрическим методом — критерия Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Прежде всего, нами установлено, что площадь интерстициальной ткани в семенниках подопытных животных большинства экспериментальных групп увеличена по сравнению с группой контроля. Так, у интактных новорожденных крысят площадь интерстициальной ткани семенников составила $39,40 \pm 0,13\%$. При этом площадь интерстиция семенников у животных «алкогольной» группы — $41,30 \pm 1,67\%$, «аутоиммунной» — $47,40 \pm 0,13\%$ и особенно «лекарственной» — $59,64 \pm 1,98\%$ групп значимо превысила таковой показатель в контроле. Исключение составили животные мезенхимальной группы с показателем площади интерстициальной соединительной ткани ($34,13 \pm 2,62\%$).

Анализ суммарного содержания клеток Лейдига в интерстициальной ткани семенников позволил установить (таблица), что у подопытных крысят всех групп данный показатель достоверно снижен по сравнению с контролем. Наибольший интерес представляют данные о содержании активных, то есть тестостеронпродуцирующих клеток Лейдига. Нами установлено, что у подопытных крысят всех групп количество активных эндокриноцитов существенно уменьшено, а число неактивных клеток увеличено по сравнению с группой контроля (таблица), что обусловило резкое снижение у них индекса активности клеток Лейдига. При этом изменился коэффициент (K_1), отражающий отношение суммарного количества клеток Лейдига к общему количеству сперматогенных клеток из расчета на один семенной извитой каналец. Как видно из таблицы, у новорожденных крысят алкогольной и, особенно, аутоиммунной групп данный показатель увеличился, а у животных мезенхимальной и, особенно, лекарственной групп, снизился по сравнению с группой контроля.

Кроме того, учитывая тесные паракринные взаимоотношения между клетками Лейдига и sustentocytes (клетками Сертоли), нами проведен анализ ко-

Характеристика клеток Лейдига экспериментальных животных ($M \pm m$)

Группа	Суммарное количество клеток Лейдига	Активные клетки Лейдига		Неактивные клетки Лейдига		Индекс активности клеток Лейдига	K_1	K_2
		Абс.	%	Абс	%			
К	47,40 ± 0,27	45,07 ± 0,50	70,28 ± 0,68	19,06 ± 0,18	29,72 ± 0,20	2,37 ± 0,08	2,66 ± 0,09	12,16 ± 0,07
Ал	6,91 ± 1,67*	52,18 ± 0,43*	52,12 ± 0,48*	47,94 ± 0,46*	47,88 ± 0,58*	1,09 ± 0,02	2,93 ± 0,95*	1,34 ± 0,09*
М	16,98 ± 0,93*	24,78 ± 0,85*	62,28 ± 0,67*	15,01 ± 0,72*	37,72 ± 0,67*	1,65 ± 0,04*	1,26 ± 0,07*	0,68 ± 0,04*
А	7,98 ± 0,85*	19,72 ± 0,56*	37,01 ± 0,10*	33,56 ± 1,12*	62,99 ± 0,30*	0,59 ± 0,04*	5,36 ± 0,91*	1,09 ± 0,05*
Л	9,73 ± 0,90*	12,42 ± 0,90*	67,21 ± 0,58*	6,06 ± 0,38*	32,79 ± 0,55*	2,05 ± 0,05*	0,78 ± 0,07*	0,28 ± 0,03*

Примечание. * — результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

эффицента, отражающего отношение суммарного количества клеток Лейдига к таковому sustentоцитов из расчет на один семенной извитой каналец (K_2). Установлено, что у потомства самок с хронической патологией гепатобилиарной системы происходит существенное снижение данного показателя (таблица). Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее выраженное его снижение имеет место у новорожденных крысят лекарственной группы.

Известно, что реализация репродуктивной стратегии млекопитающих осуществляется, прежде всего, благодаря тестостерону, основным местом биосинтеза которого являются интерстициальные эндокриноциты — клетки Лейдига. Многочисленными исследованиями показано, что клетки Лейдига формируются, подвергаются пролиферации и дифференцировки еще в антенатальном периоде [6]. Несмотря на то, что клетки Лейдига своей дефинитивной формы достигают только в постнатальном периоде (например, у крыс это происходит только к концу периода полового созревания), уже в антенатальном периоде они выступают в качестве индуктора половой дифференцировки уrogenитального тракта, а также влияют на нейроэндокринную регуляцию секреции гонадотропных гормонов. Во взрослом организме интерстициальные эндокриноциты активно участвуют в регуляции различных этапов сперматогенеза [6]. Вместе с тем, не вызывает сомнений, что регуляция сперматогенеза в клетках Лейдига представляет собой сложный процесс, в который вовлечены практически все уровни гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системы [11]. В свете вышеизложенного, нам представляется, что при моделировании поражения гепатобилиарной системы у самок крыс происходит нарушение многочисленных функций печени, в результате чего происходит накопление продуктов метаболизма, в том числе азотистых шлаков, обладающих токсическим действием, неинaktivированных гормонов, в том числе половых, а также антител и сенсibilизированных лимфоцитов, которые проникают через гематоплацен-

тарный барьер к плоду. Учитывая данные литературы [4, 5], логично предположить, что изменения условий внутриутробного развития в силу патологии гепатобилиарной системы, могут обусловить нарушение гипоталамо-гипофизарно-гонадных взаимоотношений. Эти данные тесно согласуются с результатами [12], свидетельствующими о нарушении структурного становления гипоталамических мелкоклеточных и крупноклеточных нейросекреторных ядер у потомства самок крыс с хронической патологией гепатобилиарной системы. В конечном итоге, нарушения гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы у данной группы животных приводят к нарушению процессов формирования, пролиферации и начальной дифференцировки интерстициальных эндокриноцитов и, как следствие, становления сперматогенного пласта в семенных извитых каналах.

Список литературы

- Кулаков В.И., Леонова В.В., Кузьмичева Л.Н. *Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии*. М.: Медицинское информационное агентство; 2005.
- Боголюбов С.В., Витязева И.И., Макарова Н.П., Павлова А.Г. Клиническое ведение пациентов с тератозооспермией в циклах вспомогательных репродуктивных технологий. *Доктор.Ру*. 2009; 6 (50): 34-8.
- Чалый М. Репродуктивная функция мужчин в 21 веке. *Врач*. 2009; 6: 6-7.
- Потапов С.Н., Торголь Н.И., Андреев А.В. Морфологические особенности клеток Лейдига плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией. *Медицина сегодня и завтра*. 2011; 4(53): 23-6.
- Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С. *Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология*. Черновцы: Мед. академия; 2007.
- Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. *Клетки Лейдига семенников позвоночных (онтогенез, ультраструктура, цитофизиология, факторы и механизмы регуляции)*. Оренбург: Изд-во ОрГМА; 2010.
- Буров Ю.В. Изменения гонадотропной функции гипофиза крыс при развитии экспериментального алкоголизма. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1986; 12 (6): 675-6.

8. Маянский Д.Н., Иопкер А.И., Коудстоал Я., Кардонк М.Дж. Индукция гранулематозного воспаления печени неинфекционными частицами. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1990; 5: 45-9.

9. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. *Методические указания по изучению гепатопротективной активности фармакологических веществ*. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005.

10. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1983; 3: 66-72.

11. Стадников А.А., Шевлюк Н.Н. Морфофункциональная характеристика гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы крыс-самцов в условиях эмоционально-болевого стресса (ЭБС). *Морфология*. 1996; 110 (5): 38-42.

12. Кузнецова А.Б., Брюхин Г.В. Особенности становления аркуатного нейросекреторного ядра гипоталамуса у потомства самок крыс с хроническим алкогольным поражением печени. *Вестник Южно-Уральского государственного университета*. 2005; 4 (44): 120-6.

Поступила 18.09.14

References

1. Kulakov V.I., Leonova V.V., Kuz'micheva L.N. *Treatment of female and male infertility. Assisted Reproductive Technologies*. Moscow: Medical Information Agency, 2005. (In Russian)

2. Bogolyubov S.V., Vityazeva I.I., Makarova N.P., Pavlova A.G. Clinical management of patients with teratozoospermia in cycles of assisted reproductive technologies. *Doktor.Ru*. 2009; 6 (50): 34-8. (In Russian)

3. Chalyu M. Men reproductive function in the 21st century. *Vrach*. 2009; 6: 6-7 (In Russian)

4. Potapov S.N., Torgol' N.I., Andreev A.V. Morphological features of Leydig cells from fetuses and newborns of

mothers with preeclampsia. *Meditsina s'ogodni i zavtra*. 2011; 4(53): 23-6. (In Russian)

5. Reznikov A.G., Pishak V.P., Nosenko N.D., Tkachuk S.S. *Prenatal stress and neuroendocrine pathology*. Chernovtisi: Medical Academy, 2007. (In Russian)

6. Shevlyuk N.N., Stadnikov A.A. *Leydig cells of the testes of vertebrates (ontogenesis, ultrastructure, cytophysiology, factors and mechanisms of regulation)*. Orenburg: Publisher OrG-MA; 2010. (In Russian)

7. Burov Yu.V. Change of gonadotropic pituitary function in rats during the development of experimental alcoholism. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1986; 12 (6): 675- 6. (In Russian)

8. Mayanskiy D.N., Iopker A.I., Koudstoal Ya., Kar-donk M.Dzh. Induction of granulomatous inflammation of the liver by non communicable particles. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1990; 5: 45-9. (In Russian)

9. Vengerovskiy A.I., Markova I.V., Saratikov A.S. *Methodological guidance on the study of hepatoprotective activity of pharmacological substances. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological agents*. Moscow: Medical, 2005. (In Russian)

10. Ukhov Yu.I., Astrakhantsev A.F. Morphometric methods in the rating of the functional state of the testes. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*. 1983; 3: 66-72. (In Russian)

11. Stadnikov A.A., Shevlyuk N.N. Morphofunctional characteristics of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of male rats under emotional and painful stress. *Morfologiya*. 1996; 110 (5): 38-42. (In Russian)

12. Kuznetsova A.B., Bryukhin G.V. Features of formation of neurosecretory arcuate nucleus of the hypothalamus in the posterity of female rats with chronic alcoholic liver disease. *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta*. 2005; 4 (44): 120-6. (In Russian)

Received 18.09.14

Сведения об авторах:

Брюхин Геннадий Васильевич, д.м.н., проф. каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, e-mail: kanc@chelsma.ru

Тараско А.Д.¹, Ибатуллин И.А.², Арефьева А.К.¹

Влияние поясничной (паранефральной) новокаиновой блокады на микроциркуляцию и обмен протеогликанов при экспериментальном гонартрозе

¹ — ГБОУ ДПО «Новокузнецкий ГИУВ», 654005, г. Новокузнецк, просп. Строителей, д. 5

² — ГБОУ ДПО Казанская государственная медицинская академия постдипломного образования, 420012, Казань, ул. Муштары, д. 11

Выполнено экспериментальное исследование на морских свинках обоего пола ($n = 30$). Экспериментальные животные разделены на равные группы по 10 животных: 1 — контрольная (интактные животные); 2 — группа сравнения (производилось моделирование гонартроза путем пересечения собственной связки надколенника, экспозиция 6 месяцев); 3 — основная (животным с гонартрозом производилось «лечение» поясничной новокаиновой блокадой (ПНБ) с интервалом 3–5 суток трижды). Установлено, что после курса ПНБ при гонартрозе отмечается увеличение плотности инъецированного русла в суставных и околосуставных структурах, что отражает рост объема микроциркуляции, а более интенсивное накопление в основном веществе эпифизарного хряща ШИК (+) материала указывает на повышение уровня протеогликанов в суставном хряще.

Ключевые слова: поясничная новокаиновая блокада, экспериментальный гонартроз

Tarasko A.D., Ibatullin I.A., Aref'eva A.K.

Effect of lumbar (perirenal) procaine blockade on microcirculation and exchange proteoglycans with experimental gonarthrosis

Experimental studies on guinea pigs of both sexes ($n = 30$). Experimental animals are divided into equal groups of 10 animals: 1 — the control group (intact animals), 2 — the comparison group (modelling of gonarthrosis by crossing his own patellar ligament has been made, exposure 6 months), 3 — the main group (animals with gonarthrosis treatment was carried out by performing lumbar procaine blockade (LPB) with an interval of 3–5 days three times). We establish that after a course of LPB in gonarthrosis marked increase in the density of the injected channel in the articular and periarticular structures, which reflects a growth in the microcirculation, and more intense accumulation in the basic substance of epiphyseal cartilage PAS (+) indicates the material to increase the level of proteoglycan in articular cartilage.

Key words: lumbar procaine blockade, experimental gonarthrosis

Остеоартроз — это заболевание, в патогенезе которого основное место занимает дегенерация суставного хряща за счет снижения в межзубчатом веществе протеогликанов, уменьшение степени кровоснабжения субхондральной зоны кости, ишемия и воспалительные изменения в сумочно-связочном аппарате сустава.

Исследование гемодинамики в коленных суставах у больных с гонартрозом методом поперечной реографии показали, что важную роль в патогенезе играют локальные гемодинамические нарушения, которые заключаются в уменьшении артериального притока, обеднении функционирующего микроциркуляторного русла и венозно-лимфатическом застое [1].

Вышеизложенное позволило предположить, что имеются основания для включения в комплекс терапии гонартроза паранефральной блокады по А.В. Вишневному (ПНБ), как метода неспецифической патогенетической терапии. Известно, что ПНБ стимулирует коллатеральный кровоток и микроциркуляцию в нижних конечностях [2, 5]. Это позволяет предположить, что аналогичный эффект может иметь место после ПНБ в суставных и околосуставных структурах коленных суставов. Целесообразность применения ПНБ при гонартрозе обусловлена также тем, что после ПНБ увеличивается концентрация глюкокортикоидов (противовоспалительных гормонов) [3,4], снижается концентрация катехоламинов, что приводит к уменьшению воспалительных проявлений и степени шунтирования крови на периферии.

Цель исследования: доказать, что после ПНБ в суставных и околосуставных тканях коленного сустава появляются признаки увеличения микроциркуляции и имеются положительные изменения в обмене протеогликанов.

Для корреспонденции: Тараско Андрей Дмитриевич, д.м.н., проф. каф. хирургии, урологии и эндоскопии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Минздрава России; e-mail: anta19562008@yandex.ru

Методика

Выполнено экспериментальное исследование на зрелых морских свинках обоего пола. Исследования проводились в зимне-весенний период. Метод исследования — морфологический. Количество животных — 30. Животные разделены на три равные группы по 10 животных: 1 — контрольная (интактная), 2 — группа сравнения (модель гонартроза), 3 — основная (модель гонартроза + курс ПНБ). Обезболивание — калипсоловый наркоз. Гонартроз моделировался путем пересечения собственной связки надколенника слева. Через 6 месяцев у всех животных констатировалось наличие гонартроза с деформацией сустава и ограничением объема движений, атрофией мышц на бедре. В 3 группе выполнялась двусторонняя ПНБ (0,25% раствор новокаина, общий объем — 1,0 на 100 г массы, разделенный на два равных объема, введенные справа и слева) трижды с интервалом 3—5 суток. Выведение животных из эксперимента производилось эвтаназией под калипсоловым наркозом путем внутривенного введения 2% раствора листенона 2,0. В 3-й группе эвтаназия выполнялась через 6—7 дней после выполнения последней ПНБ. Сосудистая система через камеры сердца инъецировалась 5% раствором черной туши. Коленные суставы и мышцы, расположенные околосуставно, забирались для гистологического исследования. Препараты окрашивались гематоксилин-эозином и по Шиффу для оценки обмена протеогликанов в эпифизарном хряще. Для исследования микроциркуляторного русла готовились просветленные препараты толщиной 100 мкм. Исследование гистологических препаратов производилось на стереоскопическом микроскопе МБС-9 и биологическом микроскопе «Биолам Р-15». На микроскопе МБС-9 производилась качественная оценка содержания ШИК(+) материала в основном веществе хряща по трем градациям: слабая (+), средней интенсивности (++) и интенсивная (+++). Кроме качественной оценки препаратов про-

изводились измерения: толщины хряща на эпифизе бедра напротив средней части надколенника в мм (окуляр 8^x, увеличение на шкале рукоятки 7, цена деления шкалы 0,1 мм, что при данном увеличении соответствует величине на объекте 0,014 мм). На микроскопе «Биолам Р-15» проводилось измерение толщины мышечных волокон и диаметр инъецированных микрососудов при увеличении 7х90 (масляная иммерсия) с применением шкалы длиной 10 мм и ценой деления 0,1 мм (измерения проводились в 5 полях зрения по 10 измерений в каждом). Плотность инъецированных микрососудов в синовиальной оболочке и мышцах определялась на микроскопе «Биолам Р-15» с использованием сетки размером 8х8 мм с ценой квадрата 0,5х0,5 мм при увеличении 7х40. Подсчет микрососудов производился в 100 квадратах на каждом препарате. Для демонстрации проводилось фотоприставление микропрепаратов с использованием фотоприставки «Зенит» при увеличении 7х8. Весь цифровой материал обработан на персональном компьютере с использованием прикладной статистической программы «Адан». Достоверность различий в группах оценивалась с применением критерия Стьюдента (количественные показатели) и критерия Фишера (качественные показатели). Различия расценивались как достоверные, начиная со значений $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Состояние коленных суставов в различных группах экспериментальных животных отражено в табл. 1.

Как видно из табл. 1, толщина эпифизарного хряща в группе 1 справа и слева одинаковая. Накопление ШИК(+) материала в эпифизарном хряще средней интенсивности, равномерное. Интенсивность инъекции сосудов синовиальной оболочки также удовлетворительная и равномерная с обеих сторон. Инъекция микрососудов субхондральной зоны неравномерная, мозаичная (рис. 1 А).

Таблица 1

Состояние коленных суставов в экспериментальных группах морских свинок

Группы животных	Толщина суставного хряща, мм		Интенсивность накопления ШИК(+) материала в эпифизарном хряще		Интенсивность инъекции сосудов в синовиальной оболочке	
	Правый	Левый	Правый	Левый	Правый	Левый
Группа 1 (n = 10)	0,11 ± 0,005	0,1 ± 0,005	++	++	++	++
Группа 2 (n = 10)	0,23 ± 0,015 $p_{1-2} = 0,001$ $p_{пр-л} = 0,01$	0,34 ± 0,034 $p_{1-2} = 0,001$	+	++	+	+
Группа 3 (n = 10)	0,3 ± 0,033	0,33 ± 0,043	++	+++ $p_{2-3} = 0,04$	+++ $p_{2-3} = 0,02$	+++ $p_{2-3} = 0,02$

Примечание. p_{1-2} — достоверность различий между группой 1 и группой 2; p_{2-3} — достоверность различий между группой 2 и группой 3; $p_{пр-л}$ — достоверность различий между правой и левой стороной.

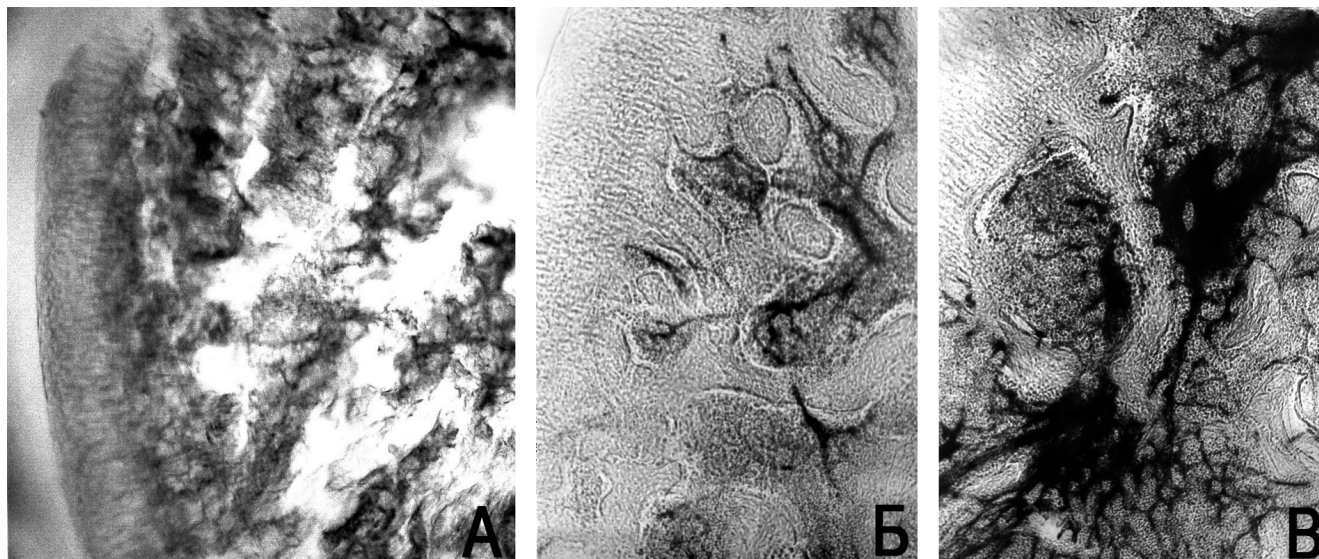


Рис. 1.

В группе 2 обращает на себя внимание неоднородность морфологической картины как здорового, так и больного суставов. Толщина эпифизарного хряща в правом (здоровом) суставе в среднем увеличивается в 2 раза по сравнению контрольной группой и, несмотря на заметное увеличение ошибки средней арифметической (m), различия статистически достоверные. Увеличение толщины эпифизарного хряща на здоровой стороне объясняется विकарной гипертрофией в связи с увеличением нагрузки на правую заднюю конечность. Накопление ШИК(+) материала в хряще неравномерное и слабое. В 8 случаях из 10 справа накопление ШИК(+) материала слабое, что объясняется перегрузкой «здоровой» конечности. Инъекция сосудов в субхондральной зоне бедренной кости чаще слабая. Плотность инъецированных сосудов в синовиальной оболочке такая же, как у животных в группе 1, но интенсивность инъекции — слабая.

В левом (больном) суставе отмечается деформация, неравномерная толщина эпифизарного хряща, местами истончение и узурация, склероз суставной капсулы. В суставной капсуле встречаются очаги хрящевой метаплазии. В суставной щели имеет место разрастание грануляционной ткани. Толщина эпифизарного хряща в среднем достоверно больше, чем в правом суставе, что объясняется репаративным процессом. Накопление ШИК(+) материала в хряще неравномерное, мозаичное, накопление ШИК(+) в 7 случаях расценено как средней интенсивности, в 3 случаях — слабое. Инъекция микрососудов субхондральной зоны эпифиза интенсивная, что объясняется компенсаторной перестройкой микроциркуляторного русла в больном суставе (рис. 2 Б). В синовиальной оболочке инъекция сосудов неравномерная, чаще слабая.

В группе 3 при морфологическом исследовании установлено исчезновение асимметрии в отношении

Таблица 2

Сравнительная оценка состояния мышц бедра на «больной» стороне в 1, 2 и 3 экспериментальных группах

Показатели	Группы животных		
	Группа 1 (n = 10)	Группа 2 (n = 10)	Группа 3 (n = 10)
Толщина мышечных волокон, мкм	13,7 ± 0,38	9,8 ± 0,52 $p_{1-2} < 0,001$	12,1 ± 0,47 $p_{2-3} < 0,05$
Диаметр капилляров, мкм	0,6 ± 0,08	0,6 ± 0,08 $p_{1-2} > 0,5$	1,2 ± 0,03 $p_{2-3} < 0,001$
Плотность инъецированных капилляров (ед/100 кв)	30+3,5	16,4 ± 3,86 $p_{1-2} < 0,02$	64,4 ± 5,71 $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$

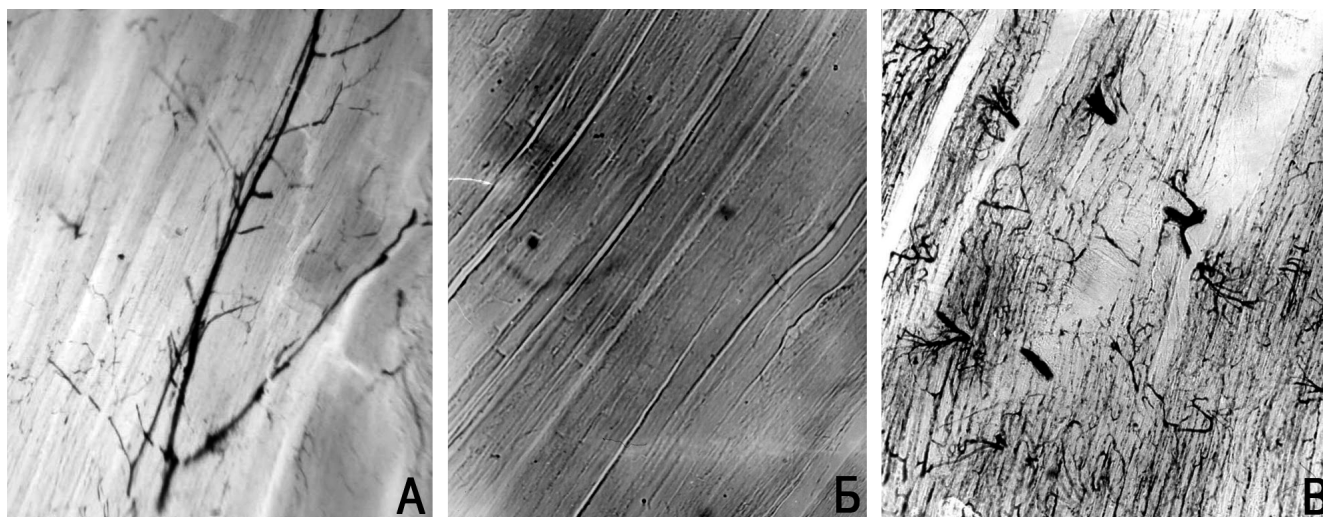


Рис. 2.

толщины эпифизарного хряща между правой и левой стороной, в то время, как в группе сравнения эта асимметрия является статистически достоверным фактом. Это объясняется лечебным действием ПНБ. Блокада, вероятно, дает эффект анальгезии, что позволяет примерно одинаково нагружать конечности, и обеспечивает улучшение трофики. Отмечается более выраженное, чем в контроле накопление ШИК(+) материала в хряще на стороне поражения, в 9 случаях из 10 интенсивность окраски основного вещества хряща расценена как ++++. Отмечается асимметрия в накоплении ШИК(+) материала справа и слева: справа ШИК(+) материал распределяется неравномерно, содержание его среднее (++), а слева — ШИК(+) материал распределяется более равномерно и его накопление можно расценить как интенсивное (+++).

Отмечается более интенсивная, чем в группе 2, инъекция микрососудов, как в субхондральной зоне, так и в синовиальной оболочке (рис. 1).

После курса ПНБ в «больных» суставах в субхондральной зоне инъекция неравномерная, но интенсивная (рис. 1 В). В синовиальной оболочке «здоровых» суставов сосуды расширены, количество их больше, чем в контроле. В синовиальной оболочке «больных» суставов микрососуды расширены, образуют сети, инъекция их интенсивная. Изменения в мышечных структурах в области сустава (сгибатели) отражены в табл. 2.

Полученные данные демонстрируют значительные различия в состоянии микроциркуляторного русла

в мышцах между группой 1 и 2, а также между группой 2 и 3. После курса ПНБ диаметр микрососудов увеличивается в среднем в 2 раза, что объясняется вероятным уменьшением объема эндотелиальных клеток или повышением перфузионного давления. Плотность инъецированных капилляров в мышцах бедра значительно меньше при моделировании гонартроза (группа 2), местами выявляются обширные «бессосудистые» поля, на которых инъекционный раствор в микрососудах виден в виде округлых точечных образований (рис. 2 Б), а после проведения курса ПНБ плотность инъецированного микрососудистого русла больше не только по сравнению с группой 2 (в среднем в 3,9 раза), но и по сравнению с группой 1 (в среднем в 2 раза). При этом имеются морфологические данные об изменении функциональной активности мышц. На это указывает достоверное увеличение толщины мышечных волокон после проведения курса ПНБ. Различия в интенсивности инъецирования микрососудистого русла мышц бедра демонстрируются на рис. 2.

Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что после проведения курса ПНБ при гонартрозе в эксперименте отмечается рост плотности инъецированного микрососудистого русла в суставных и околоуставных структурах, что отражает увеличение объема микроциркуляции, а гистохимические данные — накопление ШИК(+) материала в основном веществе хряща, указывают на более интенсивный синтез и накопление протеогликанов в суставном хряще.

Список литературы

1. Аскарлов А.Ф. О роли регионарного кровообращения в патогенезе деформирующего остеоартроза. *Ревматология*. 1985; 1: 27—9.

2. Вишневецкий А.В. Новокаиновый блок. *Новый хирургический архив*. 1937; 38 (3—4): 392—99.

3. Волков В.Е. Влияние поясничной новокаиновой блокады на функциональную активность надпочечников. *Экспериментальная хирургия*. 1964; 2: 83—5.

4. Зейнапур А.М. Влияние на функцию коры надпочечников человека односторонней околопочечной новокаиновой блокады по А.В. Вишневецкому. В кн.: *Вопросы общей патологии: Сборник научных работ ЦНИЛ*. — Душанбе. 1972; Вып. 1, т. 97: 60—3.

5. Ханнанов Н.И. *Адаптационная перестройкам сосудистой системы голени при переломе ее костей*: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Казань, 1999.

Поступила 20.09.13

1. Askarov A.F. On the role of regional circulation in the pathogenesis of osteoarthritis procaine block. *Revmatologiya*. 1985; 1: 27—9. (in Russian)

2. Vishnevskiy A.V. Procaine block. *Novyy khirurgicheskiy arkhiv*. 1937. 38 (3—4): 392—99. (in Russian)

3. Volkov V.E. Effect of lumbar procaine blockade on the functional activity of the adrenal glands. *Eksperimental'naya khirurgiya*. 1964. 2: 83—5. (in Russian)

4. Zeynapur A.M. Impact on the function of the adrenal sided perirenal procaine blockade on AV Wisniewski. In: *Voprosy obshchey patologii: Sbornik nauchnykh rabot TsNIL*. Dushanbe; 1972; 97(1): 60—3. (in Russian)

5. Khannanov N.I. *Adaptation vascular surgery tibia fracture its bones*: Avtoreferat dis. ... kand. med. nauk. Kazan'; 1999. 27 p. (in Russian).

Received 20.09.13

Referenses

Сведения об авторах

Ибатуллин Ильгиз Абдуллович, доктор мед. наук, заслуженный деятель науки Республики Татарстан, проф. каф. клинической анатомии и амбулаторной хирургии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Минздрава России

Арефьева Александра Константиновна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИЛ патанатомии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Минздрава России

© Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф., 2015
УДК 616-002-008.953-092+615.015.44

Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф.

Возможности медикаментозного управления процессом перепрограммирования фенотипа макрофагов

Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России,
119991, Москва, Трубецкая ул., 8, стр.2

Макрофаги играют ключевую роль в развитии многих заболеваний человека. Выявление соотношения и роли при них различных фенотипов макрофагов может служить критериями оценки эффективности/неэффективности лечения пациента, а также прогноза течения заболевания. Кроме того, возможность целенаправленного изменения фенотипа макрофагов представляет собой перспективное направление в разработке оптимальных методов лечения форм патологии, в патогенез которых вовлечены лейкоциты. В настоящем обзоре публикаций, в основном последних пяти лет, анализируются результаты работ об эффектах веществ, большинство из которых используется для лечения пациентов и в настоящее время. Для этих веществ доказана способность влиять на процессы активации макрофагов, а также на их сигнальные пути. Воздействие таких веществ на процессы перепрограммирования фенотипа макрофагов представляется весьма важным для современной медицины.

Ключевые слова: макрофаг, фенотип, перепрограммирование, сигнальный путь, воспаление

Sakharov V.N., Litvitskiy P.F.

Opportunities for pharmacological management of macrophage polarization

State Federal-Funded Educational Institution of Higher Professional Training
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

Macrophages play a key role in the pathogenesis of many human diseases. Both evaluation of M2/M1 macrophage ratio and discovering definite roles of macrophage phenotypes in this diseases may be used as criteria for assessment of effectiveness of treatment and for predicting prognosis of patients. Moreover, macrophage reprogramming seems to be a perspective therapeutic strategy for the diseases with inflammatory component in their pathogenesis. This review is based on articles published mainly in last five years and describes the results of the studies for some substances, most of them being used in current medical practice. This agents have been proven to have determined affection on macrophage polarization, its signal pathways, etc. Influencing macrophage reprogramming by such agents seems to be an important strategy in modern medicine.

Key words: macrophage, phenotype, reprogramming, signal pathway, inflammation

Вещества, стимулирующие формирование M1 фенотипа макрофагов и его эффекты

Процесс «классической» активации макрофагов — один из ключевых механизмов развития атеросклероза. Известно, что окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП), вызывающие формирование пенистых клеток и выработку провоспалительных веществ, опосредуют этот процесс частично путем активации Toll-подобного рецептора TLR4 и TLR4/NF-κB сигнального пути. Показано, что комплекс окисленных ЛПНП, β2-гликопротеина I (β2GPI) и его ингибитора anti-β2GPI также способствует трансформации в пенистые клетки культуральных перитонеальных макрофагов мышей линии

BALB/c. В этих клетках возрастает экспрессия TLR4, накопление липидов, фосфорилированного NF-κB p65 (p-NF-κB p65) и хемоаттрактанта моноцитов MCP-1 [1].

Важная закономерность выявлена в работе Jianyuh Zhou et al. с использованием культуры перитонеальных макрофагов: адреналин в дозировке 10 нг/мл повышал их фагоцитарную активность, а также выработку фактора некроза опухолей альфа (TNF-α) и интерлейкинов IL-1β, IL-10. Добавление же адреналина в дозе 50 и 100 нг/мл приводило к обратному эффекту. Авторы рассматривают этот феномен как модель частого развития посттравматических инфекционных осложнений на фоне чрезмерно активированного нейроэндокринного влияния [2]. Авторы делают вывод, что эффект адреналина двояк и зависит от его дозы.

Стимулировать выработку провоспалительных цитокинов (таких, как IL-1β, IL-6, IL-8 и TNF-α), а

Для корреспонденции: Сахаров Владимир Николаевич, аспирант Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова, e-mail: vladimirsah91@mail.ru

также IL-10 способны и растворимые фрагменты гепарансульфата, которые образуются под действием гепараназы [3].

Важным фактором перепрограммирования макрофагов является полисахарид трutowика (polysaccharide). Это вещество, как оказалось, способствует экспрессии IL-1 β , индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), IL-10, трансформирующего фактора роста TGF- β и TNF- α при M1 активации макрофагов, вызванной интерфероном IFN- γ [4].

Вещества, ингибирующие формирование M1 фенотипа макрофагов и его эффекты

Выше приведен факт того, что окисленные ЛПНП и их комплексы способствуют активации NF- κ B p65. Воздействие же на культуру периферических мононуклеаров крови кверцетина (биофлавоноида) тормозит ядерную транслокацию субъединицы NF- κ B p65, уменьшает выработку IL-6, снижает количество TLR2 и TLR4, а также подавляет экспрессию циклооксигеназы-2 и индуцибельной NO-синтазы [5].

Доказано также, что ресвератрол — полифенольное соединение, обнаруженное в винограде и красном вине, обладает выраженным противовоспалительным свойством. При исследовании экспрессионного профиля культуры клеток эпителия десны в присутствии жизнеспособных или инактивированных *P. gingivalis*, обнаружено, что добавление ресвератрола подавляло выработку эпителиоцитами провоспалительных цитокинов, вероятно, нарушая NF- κ B опосредованную передачу сигнала (и независимо от гена сиртуина SIRT-1) [6].

Другое вещество — эскулетин при воздействии на макрофаги мышей RAW 264.7 подавляет провоспалительный ответ, вызванный липополисахаридом (LPS). При этом в макрофагах снижается экспрессия индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы-2, выработка оксида азота, простагландина E2, провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β , уменьшаются ядерная транслокация NF- κ B (последнее — за счет блокады процесса деструкции ингибитора NF- κ B (I κ B)- α) и генерация активных форм кислорода [7].

Воздействие известного лекарственного препарата пропофола на купферовские клетки печени выявило значительное снижение выработки ими таких LPS-индуцированных цитокинов, как IL-1 β и TNF- α по сравнению с контролем (без воздействия препарата). Такой эффект связывают с модификацией передачи сигнала NF- κ B [8]. Известно, что IL-1 β — мощный провоспалительный фактор, играющий ключевую роль в развитии фиброза и атеросклероза. В недавних исследованиях обнаружено, что добавление к культуре клеток макрофагов мышей лозартана приводило к снижению (в сравнении с контрольной группой) продукции ими IL-1 β , а также уровня мРНК NALP3 и активности каспазы-1.

Таким образом, если при воздействии LPS + АТР на макрофаги происходит активация NALP3 инфламмосомы, то лозартан, по-видимому, частично благодаря ограничению ее активации, способствует снижению продукции IL-1 β [9].

D'Agostino P. et al. еще в 1998 году продемонстрировано, что воздействие тетрациклина и доксициклина на макрофаги мышей культуры J774 дозозависимо снижало активность индуцибельной NO-синтазы. При этом не наблюдалось изменения жизнеспособности клеток, нарушения синтеза белка в них, накопления мРНК индуцибельной NO-синтазы. Такой эффект объяснялся учеными воздействием тетрациклина на постранскрипционные механизмы [10].

Известно, что лигнаноное полифенольное соединение (+)-эписезамин ограничивает TNF- α -индуцированный ответ макрофагов. Дополнительно к этому Freise C. и Querfeld U. показали, что аналогичный эффект указанное вещество оказывало и на культуру гладкомышечных клеток сосудов, тормозя их TNF- α -опосредованную пролиферацию и миграцию в очаг атерогенеза, в том числе за счет ингибирования процесса активации NF- κ B, синтеза адгезина VCAM-1 и необходимых для миграции клеток металлопротеиназ-2 и -9. Таким образом, этот полифенол может влиять на патологический процесс не только как антиоксидант, но и как вещество, ограничивающее выработку провоспалительных цитокинов [11].

Важными являются результаты исследований влияния различных структурных компонентов вирусов на модуляцию иммунного ответа. Так, показано, что HBeAg способен нарушать TLR-опосредованную передачу сигнала, индуцированного вирусом [12]. Похожим свойством обладает и гамма-герпесвирус, ассоциированный с развитием саркомы Капоши [13]. Учитывая эти сведения, перспективным представляется изучение вклада подобных механизмов в развитие персистирующих инфекций и опухолевых заболеваний.

Вещества, ограничивающие формирование M2 фенотипа макрофагов и его эффекты

Особый интерес для медицины представляют ингибиторы M2 поляризации макрофагов. И, в связи с этим, одним из перспективных препаратов для изучения является доксициклин и другие тетрациклины. Доказано, что действие тетрациклинов не ограничивается только снижением синтеза NO-синтазы. Важными представляются факты об эффектах тетрациклинов не только как антибиотиков, но и как средств, модулирующих воспалительный ответ. Рассмотрим это на примере некоторых видов сосудистой патологии. Разрыв аневризмы брюшной аорты у жителей США, как сообщалось в 2003 году, был в течение ряда лет причиной более чем 15000 смертей ежегодно [14]. Результа-

ты клинических испытаний (опубликованы в 2009 году) применения доксициклина при диагностированной аневризме брюшной аорты в период до хирургического лечения показали существенное влияние препарата на эффекты нейтрофилов и Т-клеток. В то же время, какого-либо значимого воздействия на макрофаги обнаружено не было: не наблюдалось достоверного уменьшения, в сравнении с контролем, уровней IL-1 β , TNF- α , хемокина MCP-1, CCL2, воспалительного белка макрофагов 1 (CCL4). При этом отмечалось достоверное, в сравнении с контролем, снижение содержания IL-6 [15], что однако не было связано с возможными эффектами макрофагов. Клиническое исследование 18-месячного применения доксициклина с целью стабилизации абдоминальных аневризм аорты, результаты которого опубликованы в 2013 году, тем не менее показало, что этот препарат существенно не влиял ни на скорость роста аневризмы, ни на необходимость и время проведения оперативного лечения [16]. Однако Samadzadeh K.M. et al. считают, что именно эффекты моноцитов играют решающую роль в развитии абдоминальных аневризм аорты. Эти авторы показали, что моноциты пациентов с аневризмой аорты обладают более выраженной адгезивной и миграционной способностью, которая, в свою очередь, прямо пропорциональна диаметру аневризмы [17].

В 2012 г. продемонстрирована существенная связь между склонностью к разрыву аневризм церебральных артерий и соотношением фенотипов макрофагов в них. Исследователи допустили, что разрыву аневризм способствует преобладание в их стенке M1 макрофагов и повышенное количество мастоцитов. В контрольной группе количество M1 и M2 макрофагов было примерно одинаковым ($p = 0,045$) [18]. В связи с этим логичен был вывод о том, что препарат, тормозящий рост и разрыв аневризм при модуляции M1 ответа, не должен значительно угнетать M2 эффекты макрофагов. Однако оказалось, что доксициклин, как и ряд других тетрациклинов, является мощным ингибитором M2 поляризации макрофагов.

В связи с этим важны результаты исследования влияния доксициклина на неоваскуляризацию при моделировании возрастной макулярной дегенерации. L. He и A.G. Matneros сообщили, что ингибитором формирования проангиогенного M2 фенотипа макрофагов и блокатором патологического ангиогенеза может служить доксициклин: именно этот препарат вызывал дозозависимое подавление M2 поляризации мышечных костномозговых макрофагов, не нарушая жизнеспособность этих клеток. Этими же авторами показано, что в модели макулярной дегенерации, получаемой воздействием на ткань лазерного луча, хориоидальную неоваскуляризацию стимулируют M2 макрофаги, а также то, что доксициклин и *in vivo* подавляет M2 поляризацию и последующую хориоидальную

неоваскуляризацию при возрастной макулярной дегенерации. L. He, A.G. Matneros считают, что этот препарат весьма перспективен в лечении ряда заболеваний, сопровождающихся патологическим ангиогенезом, к примеру, при одном из опухолевых заболеваний — мультиформной глиобластоме [19]. Этими же авторами показано, что в течение 24 часов после лазерного воздействия на сосудистую оболочку наблюдается инфильтрация ее макрофагами, вслед за которой в течение 4 суток происходит неоваскуляризация. Существенно, что макрофагами из мест инфильтрации экспрессировались гены аргиназы-1, YM1 или антагониста к рецептору IL-1 (IL-1RA), в то время, как маркеры M1 активации не образовывались. При этом практически все макрофаги претерпевали альтернативную активацию (F4/80+, Arg1+, YM1+), а резидентные макрофаги вне очага поражения не синтезировали M2 маркеры (F4/80+, Arg1-, YM1-). Экспрессия M2 маркеров в эксперименте коррелировала с транскрипцией потенциально проангиогенного цитокина IL-1 β , обычно образующегося при M1 активации. Уровень IL-1 β достигал пика в момент наивысшей активности неоваскуляризации, а более низкие значения регистрировались на 5-е сутки, когда очаги неоангиогенеза уже сформировались. Примечательно, что макрофаги, мигрировавшие в поврежденные ткани глаза, стимулировали хориоидальную неоваскуляризацию, воздействуя на глиальные клетки сетчатки и потенцируя выделение ими VEGF-A и IL-1 β . Примечательно, что с M2 фенотипом связана высокая степень опухолевой прогрессии и низкая выживаемость при мультиформной глиобластоме [19].

L. He и A.G. Matneros обнаружили ряд закономерных изменений в экспрессии маркеров M2 фенотипа при обработке клеток культуры THP-1 доксициклином:

- снижения CD68 не отмечалось, а количество CD11b уменьшалось умеренно;
- уровень маннозного рецептора (MRC-1) значительно падал при воздействии доксициклином на THP-1 клетки [19].

Следовательно, значимого уменьшения уровня маркеров дифференцировки макрофагов не происходило. Что же касается выработки MRC-1, являющегося признаком M2 поляризации, то его количество существенно снижалось. Одновременное повышение выработки таких маркеров экспрессии M1 фенотипа как циклооксигеназа-2, хемокин CXCL9 и синтаза оксида азота iNOS позволяет сделать вывод о том, что не только угнетается M2 поляризация (опосредованная IL-4 и IL-13), но и усиливается переход макрофагов в M1 состояние. Помимо доксициклина ограничивают M2 поляризацию (правда, в меньшей степени) также тетрациклин и миноциклин. Таким образом, доксициклин (а также тетрациклин и миноциклин) являются одними из первых, приведенных в литературе веществ, способных ингибировать M2 ответ макрофагов [19].

Описано также влияние доксицилина на лимфангиогенез, вызванный воспалением в ткани рогавицы. Так, на мышцах показано, что процесс лимфангиогенеза значительно подавлялся доксициклином, в том числе за счет угнетения синтеза провоспалительных цитокинов, передачи сигнала VEGF-C через VEGF рецептор-3 и миграции сосудистых клеток [20]. Тем не менее, блокада M2 поляризации весьма перспективна не только с целью лечения сосудистой патологии. Выше уже упоминалось о возможности применения такого подхода при мультиформной глиобластоме (что объясняется преимущественным влиянием на процесс ее неоваскуляризации).

На биологической модели рака легкого у мышей соотношение макрофагов M2/M1 составляло 4,4. При этом, как известно, M1 макрофаги способны ингибировать опухолевый рост, генерируя активные формы кислорода, оксид азота и TNF- α , а M2 макрофаги, напротив, способствуют опухолевому росту и метастазированию, т.к. секретируют ростовые факторы, VEGF, матричные металлопротеиназы и подавляющие иммунный ответ цитокины и хемокины. При этом, как правило, опухоль-ассоциированные макрофаги представлены именно M2 фенотипом и поддерживают опухолевую прогрессию [21].

Важно, что воздействие IFN- γ , цедекоксиба и их комбинации на мышей, которым вводилась суспензия клеток легочной карциномы культуры LLC-1, приводило к несколько различающимся между собой результатам. Так, при применении только IFN- γ соотношение M2/M1, за счет повышения содержания M1 и снижения M2 макрофагов, достигало 1,1 ($p < 0,01$ по сравнению с контролем). При использовании одного цедекоксиба соотношение M2/M1 составило 1,7 ($p < 0,01$ по сравнению с контролем); а вот воздействие их комбинации снижало соотношение M2/M1 до 0,8 ($p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой и группами, у которых препараты применялись в отдельности). Показано также значимое уменьшение веса опухоли в каждой из указанных групп (эффект комбинации препаратов в этом случае достоверно не отличался от их раздельного применения), изменение синтеза VEGF, матричных металлопротеиназ -2 и -9 [21].

Похожее влияние другого ингибитора циклооксигеназы-2 этодолака на опухоль-ассоциированные макрофаги модели рака молочной железы показано Yi-Rang Na et al. Авторы выявили факты подавления этодолаком процесса M2-поляризации макрофагов и увеличения выработки ими TNF- α [22].

Выводы

Соотношение M1 и M2 фенотипов макрофагов играет существенную роль в патогенезе многих (возможно — большинства) болезней человека. В связи с этим, выбор препаратов, которые будут способствовать при-

обретению макрофагами того или иного заданного фенотипа, весьма важен и ответственен. Немаловажно и то, что многие вещества, влияющие на M1 или M2 поляризацию макрофагов, уже применяются в медицине и относительно недороги (в отличие, к примеру, от препаратов цитокинов или генно-инженерных биологических средств). Примером могут служить тетрациклины и ингибиторы циклооксигеназы 2 типа. Вместе с тем, очевидно, что необходимо и дальнейшее тщательное изучение патогенеза заболеваний, а также механизмов регуляции различными веществами, в том числе — лекарственными, процесса целенаправленного перепрограммирования макрофагов. При их строгом отборе в будущем возможно эффективное лечение ряда заболеваний, некоторые перспективы которого продемонстрированы в настоящем обзоре литературы.

Список литературы

- Xu Y., Kong X., Zhou H., Zhang X., Liu J., Yan J., Xie H., Xie Y.. oxLDL/ β 2GPI/anti- β 2GPI complex induced macrophage differentiation to foam cell involving TLR4/NF- κ B signal transduction pathway. *Thromb Res*. 2014; 134(2): 384-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882274/> (дата обращения: 18.10.2014);
- Zhou J., Yan J., Liang H., Jiang J. Epinephrine Enhances the Response of Macrophages under LPS Stimulation. *Biomed Res Int*. 2014. — Vol. 2014. Article ID 254686. — 8p. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160625/> (дата обращения: 11.10.2014);
- Goodall K.J., Poon I.K., Phipps S., Hulett M.D. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS One*. — 2014. — Vol.9, №10. — e109596. — 13p. URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0109596> (дата обращения: 18.10.2014);
- Jiang Z., Huang R., Zhang X., Hu J., Zhao J., Zeng X. Regulatory effects of polyporus polysaccharide on the expressions of cytokines released from M1 macrophages. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. (Chinese journal of cellular and molecular immunology)* [Article in Chinese]. 2014; 30(10): 1030-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25270203> (дата обращения: 17.10.2014);
- Bhaskar S., Shalini V., Helen A. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF- κ B signaling pathway. *Immunobiology*. 2011; 216(3): 367-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828867/> (дата обращения: 18.10.2014);
- Minagawa T., Okui T., Takahashi N., Nakajima T., Tabeta K., Murakami S., Yamazaki K. [Epub ahead of print] Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT1 independent manner. *J Periodontol Res*. 2014. Oct 14. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25312218> (дата обращения: 17.10.2014);
- Hong S.H., Jeong H.K., Han M.H., Park C., Choi Y.H. Esculetin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators and cytokines by inhibiting nuclear factor- κ B translocation in RAW 264.7 macrophages. *Mol Med Rep*. 2014; 10(6): 3241-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310143> (дата обращения 13.12.2014);

8. Li S., Wang C.X., Liu N.Z., Liu P. [Epub ahead of print] Anti-inflammatory Effects of Propofol on Lipopolysaccharides-Treated Rat Hepatic Kupffer Cells. *Cell Biochem Biophys*. 2014. Oct 9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296958> (дата обращения: 17.10.2014);
9. Wang F., Huang L., Peng Z.Z., Tang Y.T., Lu M.M., Peng Y., Mel W.J., Wu L., Mo Z.H., Meng J., Tao L.J. Losartan inhibits LPS + ATP-induced IL-1beta secretion from mouse primary macrophages by suppressing NALP3 inflammasome. *Pharmazie*. 2014;69(9): 680-684. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272939> (дата обращения: 17.10.2014);
10. D'Agostino P., Arcoleo F., Barbera C., Di Bella G., La Rosa M., Misiano G., Milano S., Brai M., Cammarata G., Feo S., Cillari E. Tetracycline inhibits the nitric oxide synthase activity induced by endotoxin in cultured murine macrophages. *Eur J Pharmacol*. — 1998. — Vol.10, №346 (2-3). — P.283-90 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652371/> (дата обращения: 18.10.2014);
11. Freise C., Querfeld U. [Epub ahead of print] The lignan (+)-episesamin interferes with TNF- α -induced activation of VSMC via diminished activation of NF- κ B, ERK1/2 and AKT and decreased activity of gelatinases. *Acta Physiol (Oxf)*. — 2014. — Sep 30. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267105/> (дата обращения: 18.10.2014);
12. Lang T., Lo C., Skinner N., Locarnini S., Visvanathan K., Mansell A. The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *J Hepatol*. 2011; 55(4): 762-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334391/> (дата обращения: 18.10.2014);
13. Bussey K.A., Reimer E., Todt H., Denker B., Gallo A., Konrad A., Ottinger M., Adler H., Styrzl M., Brune W., Brinkman M.M. The gammaherpesviruses Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and murine gammaherpesvirus 68 modulate the Toll-like receptor-induced proinflammatory cytokine response. *J Virol*. 2014; 88(16): 9245-59. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899179/> (дата обращения: 18.10.14);
14. Liu J., Xiong W., Vaca-Regen L., Nagase H., Baxter B.T. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. — 2003. — Vol.38, №6. — P.1376-1383. URL: [http://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214\(03\)01022-X/abstract#/article/S0741-5214\(03\)01022-X/fulltext?mobileUi=1](http://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214(03)01022-X/abstract#/article/S0741-5214(03)01022-X/fulltext?mobileUi=1) (дата обращения: 14.10.2014);
15. Lindeman J.H., Abdul-Hussien H., van Bockel J.H., Wolterbeek R., Kleemann R. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells. *Circulation*. 2009. Vol.119. №16. P.2209-2216 URL: <http://m.circ.ahajournals.org/content/119/16/2209.long> (дата обращения: 15.10.2014);
16. Meijer C.A., Stijnen T., Wasser M.N., Hamming J.F., van Bockel J.H., Lindeman J.H. Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2013;159(12): 815-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24490266> (дата обращения: 18.10.2014);
17. Samadzadeh K.M., Chun K.C., Nguyen A.T., Baker P.M., Bains S., Lee E.S. Monocyte activity is linked with abdominal aortic aneurysm diameter. *J Surg Res*. 2014; 190(1): 328-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726061> (дата обращения: 18.10.2014);
18. Hasan D., Chalouhi N., Jabbour P., Hashimoto T. Macrophage imbalance (M1 vs. M2) and upregulation of mast cells in wall of ruptured human cerebral aneurysms: preliminary results. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 222. <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/222> (дата обращения: 05.10.2014);
19. He L., Marneros A. G. Doxycycline inhibits polarization of macrophages to the proangiogenic M2-type and subsequent neovascularization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014. Vol.289. №12 P.8019-28. URL: <http://m.jbc.org/content/289/12/8019.full.pdf> (дата обращения: 11.10.2014);
20. Han L., Su W., Huang J., Zhou J., Qiu S., Liang D. Doxycycline inhibits inflammation-induced lymphangiogenesis in mouse cornea by multiple mechanisms. *PLoS One*. 2014. Vol. 9. №9. — e108931. — 9p. URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0108931> (дата обращения: 16.10.2014);
21. Ren F., Fan M., Mei J., Wu Y., Liu C., Pu Q., You Z., Liu L. Interferon- γ and celecoxib inhibit lung-tumor growth through modulating M2/M1 macrophage ratio in the tumor microenvironment. *Drug Des Devel Ther*. 2014. №8. P. 1527-38. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC25284985/> (дата обращения: 16.10.2014);
22. Na Y.R., Yoon Y.N., Son D.I., Seok S.H. Cyclooxygenase-2 inhibition blocks M2 macrophage differentiation and suppresses metastasis in murine breast cancer model. *PLoS One*. 2013. Vol.8. №5. e63451. — 11p. URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0063451> (дата обращения: 11.10.2014).

Поступила 26.02.15

Сведения об авторах:

Литвицкий Петр Францевич — д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор, зав. кафедрой патофизиологии лечебного факультета Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова. E-mail: litvicki@mma.ru

Ветрилэ Л.А., Карпова М.Н., Кузнецова Л.В.

Аутоантитела к глутамату, ГАМК и их рецепторам при эпилепсии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Балтийская ул., 8

В обзоре обсуждается патогенетическая роль аутоантител (аутоАТ) к возбуждающим и тормозным нейромедиаторам к глутамату, ГАМК и их рецепторам в патогенезе эпилепсии. Приводятся данные клинических и экспериментальных исследований, в которых показано, что аутоАТ к глутаматным AMPA-, NMDA-рецепторам и к рецепторам ГАМК в высоких титрах обладают высокой патогенетической активностью, вызывая существенное снижение плотности соответствующих рецепторов и гибель нейронов. Обсуждаются результаты экспериментальных исследований о противосудорожном действии антител (АТ) к глутамату и опозитном проконвульсивном эффекте АТ к ГАМК на разных моделях эпилептической активности.

Ключевые слова: аутоантитела; глутамат; ГАМК; рецепторы; эпилепсия

Vetrile L.A., Karpova M.N., Kuznetzova L.V.

Autoantibodies to glutamate, GABA And their receptors in epilepsy

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiiskaya str., 125315, Moscow, Russia

This review discusses the pathogenic role of autoantibodies (autoAB) to excitatory and inhibitory neurotransmitters glutamate, GABA and their receptors in the pathogenesis of epilepsy. The data of clinical and experimental studies show that glutamate AMPA and NMDA- receptors autoAB and GABA receptors autoAB in high titers are highly pathogenic, causing a significant decrease of the density of the receptors and contribute the neuronal death. Discusses the results of experimental data about of the anticonvulsant action of glutamate antibodies (AT) and opposite proconvulsant effect of GABA antibodies in different models of epileptic activity.

Key words: autoantibodies; glutamate; GABA, receptors; epilepsy

Эпилептогенез, по определению Г.Н. Крыжановского, является ярким примером дисрегуляционной патологии, а сама эпилепсия — дисрегуляционной болезнью. В основе эпилепсии лежит патологическая эпилептическая система, которая охватывает не только двигательную, но и другие сферы деятельности ЦНС, иммунную систему и другие интегративные системы [1, 2].

Согласно современным представлениям об эпилептогенезе, иммунным процессам отводится особая роль в дебюте заболевания, стадии его доклинического и клинического течения. Угнетение гуморального и клеточного звеньев иммунитета наблюдается уже в доклинической стадии эпилепсии. Регуляторное влияние ЦНС на иммунную систему опосредуется нейромедиаторами, нейрогормонами и нейропептидами [3—5]. Многие эндогенные биорегуляторы, такие, как нейропептиды, гормоны, цитокины, продуцируются как в ЦНС, так и в иммунной системе [6].

Для корреспонденции: Ветрилэ Лучия Александровна, к.м.н., вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии, e-mail: vetrile.L@yandex.ru

На иммунокомпетентных клетках имеются рецепторы почти ко всем известным нейрорегуляторным факторам [3—5]. Иммунная система в свою очередь может регулировать деятельность ЦНС посредством цитокинов и аутоантител (аутоАТ) к антигенам нервной ткани [7, 8].

Одним из существенных проявлений иммунных дисфункций при эпилепсии является усиленная продукция аутоАТ к нейромедиаторам и их рецепторам, ферментам, пептидам и другим нейроантигенам. Согласно сетевой теории Ерне (Jerne) иммунная система здорового человека продуцирует аутоАТ ко всем антигенам собственного организма [9]. Изучение биологической и физиологической роли естественных аутоАТ остается одной из актуальных проблем иммунологии. Фундаментальными исследованиями А.Я. Кульберга и Грабар (Grabar P.) доказано, что основная роль естественных антител (АТ) состоит в поддержании иммунного гомеостаза [10, 11]. Естественные АТ классов IgG и IgM к различным антигенам — идиопатические (аутоАТ 1-го порядка) и антиидиопатические (аутоАТ 2-го порядка) — явля-

ются составной частью иммунной сети. В норме их концентрации поддерживаются в определенных физиологических пределах. Сопряженность между содержанием аутоАТ и соответствующих антиидиотипических АТ является условием нормального функционирования иммунной и нервной систем [12].

Повышение судорожной готовности мозга сопровождается нарушением функционирования многих систем, в том числе, глутамат- и ГАМК-ергических. Вовлеченные в патогенез эпилептической активности возбуждающие глутаматные и тормозные ГАМК-рецепторы мембран нейронов являются среди всех известных классических рецепторов самыми «сложными» по своей структуре и наличию разнообразных аллостерических модуляторов. Изменение баланса между глутамат- и ГАМК-ергическими процессами являются ключевыми в патогенезе эпилепсии [13, 14].

Многочисленные клиничко-экспериментальные данные свидетельствуют об участии аутоАТ к нейромедиаторам и их рецепторам в механизмах развития эпилепсии. У больных эпилепсией и на экспериментальных моделях у животных обнаружена усиленная продукция аутоАТ к глутаматным NMDA- и AMPA-рецепторам, к ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторам, рецептору глицина, глутаматдекарбоксилазе, потенциал-зависимому калиевому каналному комплексу, белку S100b, глияльному фибриллярному кислому белку, фактору роста нервов, фосфолипидам, основному белку миелина, а также к нейромедиаторам — глутамату, ГАМК, серотонину и дофамину [15—20].

Аутоантитела к глутаматным рецепторам

АутоАТ к AMPA рецептору. В аутоиммунный процесс при эпилепсии вовлечены различные субъединицы глутаматного AMPA рецептора. В настоящее время аутоАТ к GluR3B субъединице AMPA рецептора обнаружены у значительного числа пациентов с различными видами эпилепсии: фокальной [21, 22] и тяжелыми формами резистентной эпилепсии [23, 24]. В ходе экспериментального анализа нейротропного действия АТ к GluR3 и глутамата было установлено совпадение их эффектов, т.е., АТ дублируют эффект эндогенного лиганда — глутамата [25, 26]. Это подтверждается клиническими и экспериментальными исследованиями. Экспериментальные данные были получены как при системном введении АТ, так и в культуре нейронов головного мозга. Установлено, что сыворотка крови и спинномозговая жидкость (СМЖ) больных, содержащие высокий уровень аутоАТ к GluR3B, вызывала гибель нейронов гиппокампа в культуре клеток. Аффинно-очищенные АТ к GluR3B в концентрации равной 1 мкМ вызывали изменения мембранного потенциала в Хе-

porus ооцитах. Показательно, что именно в этой концентрации АТ к GluR3B обнаруживаются в сыворотке крови больных эпилепсией [27]. По мнению авторов, небольшая деполяризация, вызываемая аутоАТ к GluR3B, может подавлять гиперполяризацию, вызываемую тормозными нейронами, а также снимать Mg²⁺ блок, облегчая активацию NMDA-рецепторов. Кроме того, аутоАТ к GluR3B могут понижать порог комплемент-индуцированной нейрональной гибели, так как, минимальная активация ионотропных рецепторов увеличивает чувствительность кортикальных нейронов к комплементарной атаке [23, 28].

Таким образом, АТ к GluR3 субъединице AMPA рецептора действуют как высокоспецифичные агонисты глутаматных рецепторов, вызывают гибель нейронов головного мозга, усиливая патологический процесс. Однако было обнаружено, что не все АТ к GluR3 субъединице AMPA-рецепторов вызывают их активацию. Установлено, что АТ с аминокислотной последовательностью 372—395 вызывают в культуре фетальных кортикальных нейронов мыши повышенную электрическую активность. Сходные изменения вызывала и сыворотка крови пациентов с эпилепсией Расмуссена. Вместе с тем, иммунизация крыс и мышей разных линий коротким GluR3B-пептидом (с последовательностью аминокислот 245—274) не вызывала спонтанной судорожной активности, а приводила к снижению частоты судорог и их тяжести в ответ на введение конвульсанта пентилентетразола по сравнению с не иммунизированными животными [26, 27, 29, 30]. В спектре неврологических дегенеративных заболеваний аутоАТ к GluR3 субъединице AMPA-рецепторов с аминокислотной последовательностью 372—395 обнаружены только у больных эпилепсией и частота их выявления коррелировала с неврологическими и поведенческими расстройствами [26].

В крови больных с различными видами эпилепсии обнаружено существенное повышение содержания аутоАТ к GluR1 субъединице AMPA-рецепторов [31]. Показано, что кроличьи АТ к субъединице GluR1 способны вызывать увеличение Ca²⁺ и деэнергизацию митохондрий и приводить к некротическим повреждениям в нейронах гиппокампа и мозжечка [32]. Повышение уровня аутоАТ к GluR1 субъединице выявлено и у детей с эпилепсией и пароксизмальными состояниями [33]. Увеличение содержания аутоАТ к GluR1 субъединице может быть связано с действием токсических концентраций глутамата и оксида азота (NO) на белковые и липидные структуры нейрональных мембран и на проницаемость ГЭБ. Развитие гипоксии во время судорожного приступа, увеличение концентрации NO, последу-

ищее некротическое повреждение нейрональных мембран и повышение проницаемости ГЭБ могут приводить к проникновению фрагментов рецепторов в кровь и создавать условия для образования аутоАТ к ним [33, 34].

АутоАТ к NMDA рецептору. У значительного числа больных эпилепсией в сыворотке крови обнаружены аутоАТ к субъединицам глутаматного NMDA рецептора: NR1 и NR2A/B [26, 35, 36]. В экспериментах на крысах внутрижелудочковые инъекции АТ к субъединицам NMDA-рецептора приводили к существенному снижению NMDA рецепторов в нейронах гиппокампа [37].

Снижение плотности NMDA рецепторов в культуре клеток гиппокампа крыс обнаружено при ее культивировании со СМЖ пациентов, содержащей аутоАТ к субъединице NR1 NMDA рецепторов; при этом снижение плотности рецепторов коррелировало с титром аутоАТ [37]. СМЖ пациентов, содержащая аутоАТ к NR1 субъединице NMDA рецептора, подавляла индукцию длительной потенциации в срезах гиппокампа мышей [38]. Введение АТ к NR1 субъединице NMDA рецептора в префронтальную кору мозга крыс приводило к повышению внеклеточной концентрации глутамата. По мнению авторов, АТ блокируют внеклеточный эпитоп субъединицы NR1 NMDA рецептора, что в свою очередь способствует повышению уровня глутамата и дисбалансу между AMPA- и NMDA-рецепторами [39, 40].

В сыворотке крови и СМЖ больных эпилепсией определяются повышенные титры аутоАТ к NR2A/B субъединицы NMDA рецептора, которые также характеризуются высокой патогенностью. В экспериментальных исследованиях было показано, что высокие концентрации АТ к субъединице NR2A/B NMDA рецептора вызывают гибель нейронов посредством активации NMDA рецепторов, значительно снижают плотность рецепторов на мембранах нейронов гиппокампа и индуцируют поведенческие и когнитивные расстройства. В то же время низкие концентрации АТ к NR2A/B субъединицы NMDA рецептора положительно модулируют рецепторную функцию, усиливая синаптическую передачу [26].

Аутоантитела к рецепторам ГАМК

В патогенезе эпилепсии вовлечены и аутоАТ к рецепторам ГАМК, основному тормозному нейромедиатору ЦНС.

АутоАТ к ГАМК_B рецептору идентифицированы у больных с лимбическим энцефалитом [41]. У большинства пациентов с аутоАТ к ГАМК_B рецептору развивались судороги или эпилептический

статус, которые прекращались после иммунотерапии. Это позволило авторам прийти к выводу, что высокая частота эпилептических приступов связана с высоким титром аутоАТ к ГАМК_B рецептору [18, 41].

АутоАТ к ГАМК_A рецептору выявлены у больных с энцефалитом и эпилептическим статусом. АТ, выделенные из СМЖ пациентов, реагировали с $\alpha 1$ и $\beta 3$ субъединицами ГАМК_A рецептора [42]. По крайней мере, четыре мутации $\alpha 1$ -субъединицы связаны с генерализованной эпилепсией [43]. Мутации $\beta 3$ субъединицы выявлены у детей с абсансной эпилепсией [44]. СМЖ пациентов, содержащая аутоАТ к ГАМК_A рецептору, культивируемая с культурой гиппокампальных нейронов крысы, вызывала снижение плотности синаптических ГАМК_A рецепторов, но не влияла на общую плотность рецепторных кластеров — синаптических и внесинаптических, что свидетельствует о миграции синаптических рецепторов к внесинаптическим сайтам [42]. Авторы полагают, что высокий титр аутоАТ к ГАМК_A рецепторам и вызываемое ими снижение плотности синаптических рецепторов могут быть причиной тяжелых судорог, устойчивых к действию антиэпилептических препаратов.

Аутоантитела к глутамату и ГАМК

Высокие показатели уровня аутоАТ к глутамату и ГАМК были выявлены у больных с фокальной эпилепсией и у детей с посттравматической эпилепсией [45]. В экспериментальных условиях усиленную продукцию аутоАТ к глутамату и ГАМК обнаружили у мышей в процессе пентилентетразолового киндлинга [46]. Киндлинг, как модель хронической эпилептизации мозга, наиболее близка к человеческой эпилепсии и отражает существенные стороны патогенеза эпилептического синдрома, приближая его к клиническим особенностям развития заболевания [2, 47, 48]. На 14-й день киндлинга аутоАТ к глутамату были обнаружены у всех опытных животных, а аутоАТ к ГАМК у 60% мышей. При этом частота обнаружения аутоАТ к ГАМК коррелировала с тяжестью судорожной реакции: у мышей с тяжестью судорог в 4—5 баллов процент обнаружения аутоАТ к ГАМК был значительно ниже, чем у животных с тяжестью судорог в 1—3 балла [46].

Индукцию синтеза аутоАТ к глутамату и ГАМК при эпилепсии можно рассматривать как свидетельство нарушения нейроиммунного взаимодействия при данной форме патологии ЦНС. Повышение частоты и уровня выявляемых аутоАТ может служить прогностическим критерием тяжелого течения заболевания и использоваться уже на ранних этапах подбора

адекватной противоэпилептической терапии. Вполне вероятно, что выявляемые аутоАТ могут ассоциироваться с некоторыми формами эпилепсии [35, 49]. Однако эпилепсия сама по себе, а также прием антиэпилептических препаратов оказывают существенное влияние на реактивность иммунной системы, поэтому достаточно сложно определить роль выявляемых аутоАТ к нейромедиаторам в патогенезе эпилепсии.

АТ к глутамату и ГАМК при острой генерализованной и хронической эпилептической активности

Учитывая определенную молекулярную схожесть структуры и антигенной специфичности аутоАТ и АТ, индуцируемых искусственными экзогенными конъюгатами нейромедиатор-белок, представляется естественной однотипность механизмов их действия на организм. Исходя из этого, одним из подходов к изучению роли выявляемых аутоАТ к нейромедиаторам в патогенезе эпилепсии является инициация образования аутоАТ путем активной иммунизации животных соответствующим конъюгатом или системным введением аффинно-очищенных АТ.

Антитела к глутамату. В опытах на мышцах C57Bl/6 на модели острых генерализованных судорог, вызванных внутривенным титрованием конвульсанта пентилентетразола, было показано, что АТ к глутамату, индуцируемые активной иммунизацией конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином, оказывают выраженное противосудорожное действие, вызывая повышение порогов клонических судорог и тонической фазы судорог с летальным исходом, а также увеличивая латентный период появления указанных судорог [50, 51]. Противосудорожный эффект АТ к глутамату на острые генерализованные судороги был обнаружен и при их предварительном однократном системном (внутрибрюшинном и интраназальном) введении [52, 53]. Противосудорожное действие АТ к глутамату было подтверждено и на модели фокальной пенициллин-индуцированной эпилептической активности у ненаркотизированных свободно передвигающихся крысах [54]. Однако АТ к глутамату при их внутрибрюшинном введении не оказывали влияния на динамику развития хронической эпилептизации мозга — пентилентетразолового киндлинга у мышшей C57Bl/6. Вместе с тем, они оказывали противосудорожное действие на острые генерализованные судороги у мышшей с повышенной в результате пентилентетразолового киндлинга судорожной активностью мозга [55].

Антитела к ГАМК. АТ к основному тормозному медиатору ГАМК при предварительном однократном внутрибрюшинном введении оказывали противоположное проконвульсивное действие на острые генерализованные судороги, вызванные внутривенным титрованием конвульсанта пентилентетразола, которое выражалось в снижении порогов клонических судорог и тонической фазы судорог с летальным исходом и в уменьшении латентного периода возникновения указанных судорог у мышшей C57Bl/6 [56]. Однократное внутрибрюшинное введение АТ к ГАМК оказывало проконвульсивное действие и в процессе хронической эпилептизации мозга мышшей — пентилентетразолового киндлинга, вызывая увеличение количества животных с судорогами и тяжести судорог [56].

Совпадение эффектов АТ к глутамату при активной иммунизации конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином и при других способах их введения свидетельствует о существовании общего механизма их действия на ЦНС. Механизм действия АТ на ЦНС — это сложный процесс, включающий несколько аспектов. Известно, что АТ, индуцируемые активной иммунизацией или при их системном введении, способны проникать через ГЭБ в ЦНС и оказывать действие на функциональное состояние соответствующих рецепторов в результате связывания нейромедиатора. Об этом свидетельствуют результаты исследований, в которых было показано изменение спектральных характеристик электрической активности разных структур мозга, а также уровней нейромедиаторов — серотонина, дофамина и их метаболитов в коре и гиппокампе головного мозга экспериментальных животных (мышшей C57Bl/6 и крыс Вистар) при активной иммунизации соответствующими конъюгатами или при однократном внутрибрюшинном введении АТ к серотонину и дофамину [57—59].

Можно предположить, что в результате связывания глутамата и ГАМК, проникшими в ЦНС АТ, происходит подавление активности глутаматергической и усиление ГАМК-ергической систем достаточной для того, чтобы до некоторой степени восстановить нарушенный баланс, с чем, возможно, и связан противосудорожный эффект АТ к глутамату и противоположное проконвульсивное действие АТ к ГАМК. Это предположение подтверждается исследованием, выполненным на модели иммобилизационного стресс-синдрома у крыс, в котором было показано, что интраназальное введение АТ к глутамату приводило к восстановлению уровней глутамата и ГАМК в гиппокампе, измененных в результате стрессорного воздействия [60]. Исследованием методом микродиагностики было показано, что иммунизация крыс конъю-

гатов глутамата с бычьим сывороточным альбумином изменяет в дорсальном гиппокампе профиль содержания глутамата и ГАМК в динамике стрессорного воздействия и постстрессорного периода [61]. Кроме того, нельзя исключить и опосредованное действие АТ через медиаторы иммунной системы (цитокины) или через другие нейромедиаторные системы мозга, в частности, дофаминергической [62].

Заключение

Представленные данные позволяют рассматривать аутоАТ к нейромедиаторам и их рецепторам как посредников и модуляторов нейроиммунных взаимодействий в условиях дизрегуляции нервной и иммунной систем. АТ к возбуждающим и тормозным нейромедиаторам глутамату и ГАМК, играющие ключевую роль в патогенезе эпилептической активности, оказывают нейромодулирующее действие, изменяя активность патологической эпилептической системы. АТ к глутамату оказывают протективное противосудорожное действие, а антитела к ГАМК — оппозитное, проконвульсивное. На основании приведенных литературных данных можно прийти к заключению, что изучение роли нейроиммунных процессов в патогенезе эпилепсии, в частности, образование аутоАТ к нейромедиаторам и их рецепторам, является перспективным направлением в разработке новых подходов к диагностике и лечению эпилепсии. Определение спектра и уровня аутоАТ к глутамату и ГАМК у больных эпилепсией может служить важным критерием определения тяжести заболевания и назначения адекватного лечения.

Список литературы

1. Крыжановский Г.Н. Регуляция и дизрегуляция в живых системах. *Патогенез*. 2007; приложение 1: 4-5.
2. Крыжановский Г.Н. Фундаментальные механизмы и общие закономерности дизрегуляционной патологии нервной системы. В кн.: Гусев Е.И., Крыжановский Г.Н. *Дизрегуляционная патология нервной системы*. Москва: ООО Мед. информ. Агентство; 2009. С. 100-106.
3. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Сениашвили Р.И. *Нейроиммунопатология*. Москва: НИИ ОПП; 2003; 438.
4. Boldyrev A., Bryushkova E., Vladychenskaya E. NMDA-receptors in immunocompetent cells. *Biochemistry*. 2012; 77(12): 128-34.
5. Nedergaard M., Takano T., Hansen A. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci*. 2002; 3 (9): 748-55.
6. Blaloc J. The immune system as the sixth sense. *J. Intern. Med.* 2005; 257: 126-138.
7. Bauer S., Sepok S., Todorova-Rudolph A., Nowak M., Koller M., Lorenz R. et al. Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. *Epilepsy Res*. 2009; 86 (6): 82-8.
8. Maroso M., Balosso S., Ravizza T., Liu J., Bianchi M.E., Vezzani A. Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signaling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J. Internat. Med.* 2011; 270 (4): 319-26.
9. Jerne N.K. Towards network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*. 1974; 125: 309-19.
10. Кульберг А.Я. *Регуляция иммунного ответа*. М. 1986.
11. Grabar P. Autoantibodies and the physiological role of immunoglobulins. *Immunol. Today*. 1983; 4 (12): 337-40.
12. Морозов С.Г., Гнеденко Б.Б., Грибова И.Е., Ключник Т.П., Сидякин А.А. и др. «Иммунная сеть» аутоантител к белкам нервной ткани в норме и при патологии. *Патогенез*. 2006; 4(1): 26-30.
13. Гусев Е.И., Техт А.Б. Некоторые аспекты патогенеза эпилепсии. *Медицинский академический журнал*. 2006; 6 (2): 3-11.
14. El-Hassar L., Milh M., Wendling F., Ferrand N., Escalapez M., Bernard C. Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. *The Journal of Physiology*. 2007; 578: 193-211.
15. Кузнецова Л.В., Ветрилэ Л.А., Карпова М.Н. Нейроиммунологические аспекты патогенеза эпилепсии. (Обзор). *Успехи физиологических наук*. 2014; 45 (3): 3-22.
16. Ekizoglu E., Tuzun E., Woodhall M. Investigation of neuronal autoantibodies in two different focal epilepsy syndromes. *Epilepsia*. 2014; 55 (3): 414-22.
17. Falip M., Carreno M., Miro J., Saiz A., Villanueva V., Quilez A. Prevalence and immunological spectrum of temporal lobe epilepsy with glutamic acid decarboxylase antibodies. *Eur. J. Neurol*. 2012; 19 (6): 827-33.
18. Hofberger R., Tiulaer M.J., Sabater L., Dome B., Rozsas A., Hegedus B. et al. Encephalitis and GABA(B) receptor antibodies: Novel findings in a new case series of 20 patients. *Neurology*. 2013; 81: 1500-6.
19. Petit-Pedrol M., Armangue T., Peng X., Bataller L., Cellucci T., Davis R. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus and antibodies to the GABA A receptor: a case series characterization of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*. 2014; 13: 276-86.
20. Armangue T., Peng X. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterization of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*. 2014; 13: 276-86.
21. Feichtinger M., Wiendl H., Korner E., Holl A., Gruber L., Fazekas F. et al. No effect of immunomodulatory therapy in focal epilepsy with positive glutamate receptor type 3-antibodies. *Seizure*. 2006; 15 (5): 350-4.
22. Wiendl H., Bien C.G., Bernasconi P., Fleckenstein B., Elger C.E., Dichgans J. et al. GluR3 antibodies: Prevalence in focal epilepsy but no specificity for Rasmussen's encephalitis. *Neurology*. 2001; 57 (8): 1511-4.
23. Levite M., Ganor Y. Autoantibodies to glutamate receptors can damage the brain in epilepsy, systemic lupus erythematosus and encephalitis. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2008; 8 (7): 1141-60.
24. Mantegazza R., Bernasconi P., Baggi F., Mantegazza R., Bernasconi P., Baggi F. et al. Antibodies against GluR3 peptides are not specific for Rasmussen's encephalitis but are also present in epilepsy patients with severe, early onset disease.

- ase and intractable seizures. *J. Neuroimmunol.* 2002; 131 (1-2): 179-85.
25. Carlson N.G., Gahring L.C., Twyman R.T., . Identification of amino acid in the glutamate receptor, GluR3, important for antibody-binding and receptor specific activation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (17): 1295-301.
26. Levite M. Glutamate receptor antibodies in neurological diseases: anti-AMPA-GLUR3 antibodies, anti-NMDA-NR1, anti-NMDA-NR2A/B antibodies, anti-mGLUR1 antibodies or anti-mGLUR5 antibodies are present in subpopulations of patients with either: epilepsy, encephalitis, cerebellar ataxia, systemic lupus erythematosus (SLE) and neuropsychiatric SLE, Sjogren's syndrome, schizophrenia, mania or stroke. *J. Neural Transm.* 2014; 121(8):1029-75.
27. Ganor Y., Goldberg-Stern H., Amrom D., Lerman-Sagie T., Teichberg V., Pelled D. et al. Autoimmune epilepsy: some epilepsy patients harbor autoantibodies to glutamate receptors and dsDNA on both sides of the blood-brain barrier, which may kill neurons and decrease in brain fluids after Hemispherotomy. *Clin. Dev. Immunol.* 2004; 11 (3-4): 241-52.
28. Xiong Z.Q., McNamara J.O. Fleeting activation of ionotropic glutamate receptors sensitizes cortical neurons to complement attack. *Neuron.* 2002; 36 (3): 363-74.
29. Ganor Y., Goldberg-Stern H., Blank M., Shoenfeld Y., Dobrynina LA, Kalashnikova L., Levite M. Antibodies to glutamate receptor subtype 3 (GluR3) are found in some patients suffering from epilepsy as the main disease, but not in patients whose epilepsy accompanies antiphospholipid syndrome or Sneddon's syndrome. *Autoimmunity.* 2005; Sep; 38(6): 417-24.
30. Whitney K.D., McNamara J.O. GluR3 autoantibodies destroy neural cells in a complement-dependent manner modulated by complement regulatory proteins. *J. Neurosci.* 2000; 20 (19): 7307-16.
31. Дамбинова С.А., Изыкенова Г.А. Аутоантитела к подтипам глутаматных рецепторов — маркеры функционального поражения головного мозга: их диагностическое значение для выявления пароксизмальной активности и ишемии. *Журн. высш. нервн. деят.* 1997; 47 (2): 439-46.
32. Сорокина Е.Г., Сторожевых Т.П., Сенилова Я.Е., Гранстрем О.К., Реутов В.П., Пинелис В.Г. Действие антител к AMPA-рецепторам глутамата на нейроны мозга в первичных культурах мозжечка и гиппокампа. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2006; 142 (7): 59-62.
33. Пинелис В.Г., Сорокина Е.Г. Аутоиммунные механизмы модуляции активности глутаматных рецепторов при эпилепсии и черепно-мозговой травме у детей. *Вестник российской АМН.* 2008; 12: 44-51.
34. Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Гранстрем О.К., Пинелис В.Г. Возможная роль оксида азота в повреждении глутаматных рецепторов при эпилепсии. *Известия национальной академии наук Беларуси. Серия медико-биологических наук.* 2002; 1: 18-22.
35. Bien C.G. Value of autoantibodies for prediction of treatment response in patients with autoimmune epilepsy: Review of the literature and suggestions for clinical management. *Epilepsia.* 2013; 54 (2): 48-55.
36. Dalmau J., Lancaster E., Martinez-Hernandez E., Rosenfeld M.R., Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol.* 2011; 10 (1): 63-74.
37. Hughes E.G., Peng X., Gleichman A.J., Lai M., Zhou L., Tsou R. et al. Cellular and Synaptic Mechanisms of Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *J. Neurosci.* 2010; 30 (17): 5866-75.
38. Zhang Q., Tanaka K., Sun P., Nakata M., Yamamoto R., Sakimura K. et al. Suppression of synaptic plasticity by cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis patients. *Neurobiol. Dis.* 2012; 45: 610-5.
39. Bauer J., Vezzani A., Bien C.G. Epileptic encephalitis: the role of the innate and adaptive immune system. *Brain Pathol.* 2012; 22 (2): 412-21.
40. Manto M., Dalmau J., Didelot A., Rogemond V., Honorat J. Afferent facilitation of corticomotor responses is increased by IgG of patients with NMDA-receptor antibodies. *J. Neurol.* 2011; 258: 27-33.
41. Lancaster E., Martinez-Hernandez E., Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology.* 2011; 77 (2): 179-89.
42. Petit-Pedrol M., Armangue T., Peng X. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterization of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2014; 13: 276-86.
43. Zhou C., Huang Z., Ding L., Deel M.E., Arain F.M., Murray C.R. et al. Altered cortical GABA_A receptor composition, physiology, and endocytosis in a mouse model of a human genetic absence epilepsy syndrome. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 21458-72.
44. Tanaka M., Olsen R.W., Medina M.T., Schwartz E., Alonso M.E., Duron R.M. et al. Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; 82: 1249-61.
45. Лусникова И.В. Клинические и нейроиммунологические аспекты фармакорезистентной эпилепсии: Автореф. дис. кан. мед. наук. М.: Рос. гос. мед. ун-т. Фед. агент. по здравоохран. и соц. разв. 2008.
46. Ветрилэ Л.А., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Карпова М.Н. Аутоантитела к глутамату, ГАМК, серотонину и дофамину в динамике развития хронической эпилептизации мозга мышей C57Bl/6. *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* 2010; 2: 11-4.
47. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А., Клишина Н.Ю., Калинина М.В., Кузина О.С. и др. Cl⁻-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс на раннем этапе развития хронической эпилептизации мозга. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2006; 142 (8): 139-41.
48. Bazyan A.S., Zhulin V.V., Karpova M.N., Klishina N.Y., Glebov R.N. Long-term reduction of benzodiazepine receptor density in the rat cerebellum by acute seizures and kindling and its recovery 6 months later by a pentylenetetrazole challenge. *Brain Res.* 2001; 888 (2): 212-20.
49. Brenner T., Sills G.J., Hart Y., Howell S, Waters P., Brodie M.J. et al. Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy. *Epilepsia.* 2013; 6: 1028-35.
50. Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Клишина Н.Ю., Трекова Н.А., Кузнецова Л.В., Евсеев В.А. Повышение порогов судорожной реакции к конвульсанту коразолу после активной иммунизации конъюгатом глутамат-БСА мышей разных генетических линий. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2003; 136 (9): 287-9.
51. Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю. Повышение порогов судорожной реакции после активной иммунизации конъюгатом глута-

мат-БСА мышей и при системном введении антител к глутамату. *Патогенез*. 2011; 1: 21-6.

52. *Евсеев В.А., Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Клишина Н.Ю., Кузнецова Л.В., Трекова Н.А.* Антитела к глутамату при системном введении повышают пороги судорожной реакции к пентилентетразолу. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2005; 140 (9): 276-8.

53. *Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Ветрилэ Л.А., Клишина Н.Ю.* Повышение порогов судорожной реакции после интраназального введения антител у мышей C57Bl/6. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2013; 155 (3): 282-5.

54. *Кузнецова Л.В., Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Клишина Н.Ю.* Влияние антител к глутамату на фокальную пенициллининдуцированную эпилептическую активность. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2013; 155 (5): 555-8.

55. *Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Трекова Н.А.* Влияние системного введения антител к глутамату на судорожную реакцию мышей C57Bl/6, подвергшихся пентилентетразоловому киндлингу. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2007; 143 (6): 611-3.

56. *Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Трекова Н.А., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Евсеев В.А.* Нейроиммунномодулирующее действие антител к ГАМК на острую генерализованную и хроническую эпилептическую активность. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2006; 142 (11): 505-8.

57. *Евсеев В.А., Трекова Н.А., Ветрилэ Л.А., Миковская О.И., Башарова Л.А., Грудень М.А. и др.* Нейромодулирующее влияние антител к серотонину на поведенческие реакции, уровень нейромедиаторов в ЦНС и лигандсвязывающую активность центральных серотониновых рецепторов у мышей линии C57Bl/6 и BALB/c. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2001; 132 (7): 27-9.

58. *Евсеев В.А., Миковская О.И., Ветрилэ Л.А., Трекова Н.А., Башарова Л.А., Грудень М.А. и др.* Антитела к дофамину как нейромодуляторы поведенческих реакций мышей разных генотипов. *Журн. высш. нервн. деят.* 2002; 52 (3): 320-5.

59. *Панкова Н.Б., Ветрилэ Л.А., Башарова Л.А., Крушина Н.А., Хлебникова Н.Н., Родина В.И. и др.* Иммунизация крыс конъюгатами дофамина и серотонина с бычьим сывороточным альбумином предотвращает развитие экспериментального МФТП-индуцированного депрессивного синдрома (по электрофизиологическим показателям). *Журн. высш. нервн. деят.* 2003; 53 (2): 199-207.

60. *Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Кудрин В.С., Клодт П.М.* Влияние антител к глутамату на развитие стресс-реакции и содержание нейромедиаторов в гиппокапе и гипоталамусе крыс с разной поведенческой активностью. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2013; 155 (3): 293-8.

61. *Умрюхин А.Е., Чекмарева Н.Ю., Сотников С.В., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А.* Микродиализное исследование содержания глутамата и ГАМК в дорсальном гиппокампе у крыс на фоне иммунизации конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином. *Неврол. вестник*. 2013; 45 (1): 27-33.

62. *Chuhna N., Zhang H., Masson J., Zhuang X., Sulzer D., Hen R. et al.* Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses. *The J. of Neurosci.* 2004; 24 (4): 972-81.

References

1. *Kryzhanovskiy G.N.* Regulation and dysregulation in living systems. *Patogenez*. 2007; Prilozhenie 1: 4-5. (in Russian)

2. *Kryzhanovskiy G.N.* Fundamental mechanisms and general regularities of the nervous system of pathology dizregulation. *V kn.: Gusev E.I., Kryzhanovskiy G.N. Dizregulyatsionnaya patologiya nervnoy sistemy*. Moscow: OOO Med. inform. Agentstvo; 2009. S. 100-6. (in Russian)

3. *Kryzhanovskiy G.N., Magaeva S.V., Sepiashvili R.I.* *Neuroimmunopatologiya*. Moscow: SRI RFP; 2003. (in Russian)

4. *Boldyrev A., Bryushkova E., Vladychenskaya E.* NMDA-receptors in immunocompetent cells. *Biochemistry*. 2012; 77(12): 128-34.

5. *Nedergaard M., Takano T., Hansen A.* Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3 (9): 748-55.

6. *Blaloc J.* The immune system as the sixth sense. *J. Intern. Med.* 2005; 257: 126-138.

7. *Bauer S, Cepok S, Todorova-Rudolph A, Nowak M, Koller M, Lorenz R. et al.* Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. *Epilepsy Res.* 2009; 86 (6): 82-8.

8. *Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Bianchi M.E, Vezzani A.* Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signaling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J. Internat. Med.* 2011; 270 (4): 319-26.

9. *Jerne N.K.* Towards network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*. 1974; 125: 309-19.

10. *Kul'berg A.Ya.* Regulation of the immune response. Moscow. 1986. (in Russian)

11. *Grabar P.* Autoantibodies and the physiological role of immunoglobulins. *Immunol. Today*. 1983; 4 (12): 337-40.

12. *Morozov S.G., Gnedenko B.B., Gribova I.E., Klyushnik T.P., Sidyakin A.A.* «Immune Network» autoantibodies to neural tissue proteins in normal and pathological conditions. *Patogenez*. 2006; 4(1): 26-30. (in Russian)

13. *Gusev E.I., Gekht A.B.* Some aspects of the pathogenesis of epilepsy. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2006; 6 (2): 3-11. (in Russian)

14. *El-Hassar L., Milh, F. Wendling., Ferrand N., Escalapez I M., Bernard C.* Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. *The Journal of Physiology*. 2007; 578: 193-211.

15. *Kuznetsova L.V., Vetrile L.A., Karpova M.N.* Neuroimmunologi aspects of the pathogenesis of epilepsy. (Review). *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2014; 45 (3): 3-22. (in Russian)

16. *Ekizoglu E., Tuzun E., Woodhall M.* Investigation of neuronal autoantibodies in two different focal epilepsy syndromes. *Epilepsia*. 2014; 55 (3): 414-22.

17. *Falip M., Carreno M., Miro J., Saiz A., Villanueva V., Quilez A.* Prevalence and immunological spectrum of temporal lobe epilepsy with glutamic acid decarboxylase antibodies. *Eur. J. Neurol.* 2012; 19 (6): 827-33.

18. *Hofberger R., Titulaer M.J., Sabater L., Dome B., Rozsas A., Hegedus B. et al.* Encephalitis and GABA(B) receptor antibodies: Novel findings in a new case series of 20 patients. *Neurology*. 2013; 81: 1500-6.

19. *Petit-Pedrol M., Armangue T., Peng X., Bataller L., Cellucci T., Davis R.* Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus/ and antibodies to the GABA A receptor: a ca-

Поступила 26.02.15

se series characterization of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2014; 13: 276-86.

20. *Armangue T., Peng X.* Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterization of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2014; 13: 276-86.

21. *Feichtinger M., Wiendl H., Korner E., Holl A., Gruber L., Fazekas F. et al.* No effect of immunomodulatory therapy in focal epilepsy with positive glutamate receptor type 3-antibodies. *Seizure.* 2006; 15 (5): 350-4.

22. *Wiendl H., Bien C.G., Bernasconi P., Fleckenstein B., Elger C.E., Dichgans J. et al.* GluR3 antibodies: Prevalence in focal epilepsy but no specificity for Rasmussen's encephalitis. *Neurology.* 2001; 57 (8): 1511-4.

23. *Levite M., Ganor Y.* Autoantibodies to glutamate receptors can damage the brain in epilepsy, systemic lupus erythematosus and encephalitis. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2008; 8 (7): 1141- 60.

24. *Mantegazza R., Bernasconi P., Baggi F., Mantegazza R., Bernasconi P., Baggi F. et al.* Antibodies against GluR3 peptides are not specific for Rasmussen's encephalitis but are also present in epilepsy patients with severe, early onset disease and intractable seizures. *J. Neuroimmunol.* 2002; 131 (1-2): 179-85.

25. *Carlson N.G., Gahring L.C., Twyman R.T., Rogers S.W.* Identification of amino acid in the glutamate receptor, GluR3, important for antibody-binding and receptor specific activation. *J. Biol.Chem.* 1997; 272 (17):1295-301.

26. *Levite M.* Glutamate receptor antibodies in neurological diseases: anti-AMPA-GLUR3 antibodies, anti-NMDA-NR1, anti-NMDA-NR2A/B antibodies, anti-mGLUR1 antibodies or anti-mGLUR5 antibodies are present in subpopulations of patients with either: epilepsy, encephalitis, cerebellar ataxia, systemic lupus erythematosus (SLE) and neuropsychiatric SLE, Sjogren's syndrome, schizophrenia, mania or stroke. *J.Neral Transm.* 2014; 121(8):1029-75.

27. *Ganor Y., Goldberg-Stern H., Amrom D., Lerman-Sagie T., Teichberg V., Pelled D. et al.* Autoimmune epilepsy: some epilepsy patients harbor autoantibodies to glutamate receptors and dsDNA on both sides of the blood-brain barrier, which may kill neurons and decrease in brain fluids after Hemispherotomy. *Clin. Dev. Immunol.* 2004; 11 (3-4): 241-52.

28. *Xiong Z.Q., McNamara J.O.* Fleeting activation of ionotropic glutamate receptors sensitizes cortical neurons to complement attack. *Neuron.* 2002; 36 (3): 363-374.

29. *Ganor Y., Goldberg-Stern H., Blank M., Shoenfeld Y., Dobrynina L.A., Kalashnikova L., Levite M.* Antibodies to glutamate receptor subtype 3 (GluR3) are found in some patients suffering from epilepsy as the main disease, but not in patients whose epilepsy accompanies antiphospholipid syndrome or Sneddon's syndrome. *Autoimmunity.* 2005; 38(6): 417-24.

30. *Whitney K.D., McNamara J.O.* GluR3 autoantibodies destroy neural cells in a complement-dependent manner modulated by complement regulatory proteins. *J. Neurosci.* 2000; 20 (19): 7307-16.

31. *Dambinova S.A., Izykenova G.A.* Autoantibodies to glutamate receptor subtypes — markers of functional brain lesions: their diagnostic value for detection of paroxysmal activity and ischemia. *Zhurn. vyssh. nervn. deyat.* 1997; 47 (2): 439-46. (in Russian)

32. *Sorokina E.G., Storozhevyykh T.P., Senilova Ya.E., Granstrem O.K., Reutov V.P., Pinelis V.G.* Action of antibody-

es AMPA glutamate receptors on brain neurons in primary cultures of cerebellum and hippocampus. *Byul. eksper. biol. i med.* 2006; 142 (7): 59-62. (in Russian)

33. *Pinelis V.G., Sorokina E.G.* Autoimmune mechanisms of modulation of the activity of glutamate receptors in children with epilepsy and craniocerebral injury. *Vestnik rossiyskoy AMN.* 2008; 12: 44-51. (in Russian)

34. *Sorokina E.G., Reutov V.P., Granstrem O.K., Pinelis V.G.* The possible role of nitric oxide in the damage of glutamate receptors in epilepsy. *Izvestiya natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya mediko-biologicheskikh nauk.* 2002; 1: 18-22. (in Russian)

35. *Bien C.G.* Value of autoantibodies for prediction of treatment response in patients with autoimmune epilepsy: Review of the literature and suggestions for clinical management. *Epilepsia.* 2013; 54 (2): 48-55.

36. *Dalmau J., Lancaster E., Martinez-Hernandez E., Rosenfeld M.R., Balice-Gordon R.* Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol.* 2011; 10 (1): 63-74.

37. *Hughes E., Peng X., Gleichman A.J., Lai M., Zhou L., Tsou R. et al.* Cellular and Synaptic Mechanisms of Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *J. Neurosci.* 2010; 30 (17): 5866- 75.

38. *Zhang Q., Tanaka K., Sun P., Nakata M., Yamamoto R., Sakimura K. et al.* Suppression of synaptic plasticity by cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis patients. *Neurobiol. Dis.* 2012; 45: 610-5.

39. *Bauer J., Vezzani A., Bien C.G.* Epileptic encephalitis: the role of the innate and adaptive immune system. *Brain Pathol.* 2012; 22 (2): 412-21.

40. *Manto M., Dalmau J., Didelot A., Rogemond V., Honorat J.* Afferent facilitation of corticomotor responses is increased by IgG of patients with NMDA-receptor antibodies. *J. Neurol.* 2011; 258: 27-33.

41. *Lancaster E., Martinez-Hernandez E., Dalmau J.* Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology.* 2011; 77 (2): 179-89.

42. *Petit-Pedrol M., Armangue T., Peng X.* Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterization of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2014; 13: 276-86.

43. *Zhou C., Huang Z., Ding L., Deel ME., Arain FM., Murray C.R. et al.* Altered cortical GABA_A receptor composition, physiology, and endocytosis in a mouse model of a human genetic absence epilepsy syndrome. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 21458-72.

44. *Tanaka M., Olsen R.W., Medina M.T., Schwartz E., Alonso M.E., Duron R.M. et al.* Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; 82: 1249-1261.

45. *Lusnikova I.V.* Clinical and neuro-immunological aspects of pharmacoresistant epilepsy: *Avto-ref. dis. kan. med. nauk. M.: Ros. gos. med. un-t. Fed. agent. po zdravookhran. i sots. razv.* 2008. (in Russian)

46. *Vetrile L.A., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Karpova M.N.* Autoantibodies to glutamate, GABA, serotonin and dopamine in the dynamics of development of chronic brain epileptization in mice C57BL/6. *Patol. fiziol. i eksperim. terapiya.* 2010; 2: 11-4. (in Russian)

47. *Rebrov I.G., Karpova M.N., Andreev A.A., Klishina N.Yu., Kalinina M.V., Kuzina O.S. i dr.* Cl — conductivity of GABAA receptor complex of synaptic membranes of rat

cerebral cortex at an early stage of chronic brain epileptization. *Byul. eksper. biol. i med.* 2006; 142 (8): 139-41. (in Russian)

48. *Bazyan A.S., Zhulin V.V., Karpova M.N., Klishina N.Y., Glebov R.N.* Long-term reduction of benzodiazepine receptor density in the rat cerebellum by acute seizures and kindling and its recovery 6 months later by a pentylenetetrazole challenge. *Brain Res.* 2001; 888 (2): 212-20.

49. *Brenner T., Sills G. J., Hart Y., Howell S., Waters P., Brodie M.J. et al.* Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy. *Epilepsia.* 2013; 6: 1028-1035.

50. *Karpova M.N., Vetrile L.A., Klishina N.Yu., Trekova N.A., Kuznetsova L.V., Evseev V.A.* Heightening convulsive reactions to the convulsant korazol after active immunization glutamate-BSA conjugate in mice different genetic lines. *Byul. eksper. biol. i med.* 2003; 136 (9): 287-9. (in Russian)

51. *Karpova M.N., Vetrile L.A., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu.* Heightening convulsive reactions to the convulsant after active immunization glutamate-BSA conjugate in mice and at systemic administration of antibodies to glutamate. *Patogenez.* 2011; 1: 21-6. (in Russian)

52. *Evseev V.A., Karpova M.N., Vetrile L.A., Klishina N.Yu., Kuznetsova L.V., Trekova N.A.* Systemic administration of glutamate antibodies increases the threshold of pentylenetetrazole convulsive reaction. *Byul. eksper. biol. i med.* 2005; 140 (9): 276-8. (in Russian)

53. *Karpova M.N., Kuznetsova L.V., Vetrile L.A., Klishina N.Yu.* Increasing the reaction convulsive thresholds after intranasal administration of glutamate antibodies in mice C57BL/6. *Byull. eksperim. biol. i med.* 2013; 155 (3): 282-5. (in Russian)

54. *Kuznetsova L.V., Karpova M.N., Vetrile L.A., Klishina N.Yu.* Effect of antibodies to glutamate on penicillin induced focal seizure activity. *Byull. eksperim. biol. i med.* 2013; 155 (5): 555-8. (in Russian)

55. *Karpova M.N., Vetrile L.A., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Trekova N.A.* Effect of systemic administration of glutamate antibodies on the convulsive reaction C57Bl/6 mice exposed pentylenetetrazole kindling. *Byul. eksper. biol. i med.* 2007; 143 (6): 611-3. (in Russian)

56. *Karpova M.N., Vetrile L.A., Trekova N.A., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Evseev V.A.* Neuroimmunomodulating action of antibodies to GABA on acute and chronic generalized seizure activity. *Byul. eksper. biol. i med.* 2006; 142 (11): 505-8. (in Russian)

57. *Evseev V.A., Trekova N.A., Vetrile L.A., Mikovskaya O.I., Basharova L.A., Gruden' M.A. i dr.* Neuromodulating influence of serotonin antibodies on the behavioral reactions, neurotransmitter levels in the CNS and ligand binding activity of central serotonin receptors in mice C57Bl/6 and BALB/c. *Byul. eksper. biol. i med.* 2001; 132 (7): 27-9. (in Russian)

58. *Evseev V.A., Mikovskaya O.I., Vetrile L.A., Trekova N.A., Basharova L.A., Gruden' M.A. i dr.* Antibodies to dopamine as neuromodulators behavioral responses of mice of different genotypes. *Zhurn. vyssh. nervn. deyat.* 2002; 52 (3): 320-5. (in Russian)

59. *Pankova N.B., Vetrile L.A., Basharova L.A., Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Rodina V.I. i dr.* Immunization of rats with bovine serum albumin conjugates with dopamine or serotonin prevents the development of experimental MFTP-induced depressive syndrome. (An electrophysiological study. *Zhurn. vyssh. nervn. deyat.* 2003; 53 (2): 199-207. (in Russian)

60. *Vetrile L.A., Zakharova I.A., Kudrin V.S., Klodt P.M.* Effect of glutamate antibodies on the development of the stress response and the content of neurotransmitters in hippocampus and hypothalamus of rats with different behavioral activity. *Byul. eksper. biol. i med.* 2013; 155 (3): 293-8. (in Russian)

61. *Umryukhin A.E., Chekmareva N.Yu., Somikov S.V., Vetrile L.A., Zakharova I.A.* Microdialysis study content of glutamate and GABA in the dorsal hippocampus in the rat during immunization glutamate conjugate with bovine serum albumin. *Nevrol. vestnik.* 2013; 45 (1): 27-33. (in Russian)

62. *Chuhna N., Zhang H., Masson J., Zhuang X., Sulzer D., Hen R. et al.* Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses. *The j. of Neurosci.* 2004; 24 (4): 972-81.

Received 26.02.15

Сведения об авторах:

Карпова Маргарита Николаевна — д.биол.н., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы

Кузнецова Лада Владимировна — канд. биол. н, ст. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы

Правила оформления статей для публикации в журнале «Патологическая физиология и экспериментальная терапия»

1. Статьи, оформленные без соблюдения указанных правил, к рассмотрению не принимаются.

2. Все присланные работы обязательно проходят этап научного рецензирования, редакция оставляет за собой право сокращения публикуемых материалов и адаптации их к рубрикам журнала.

3. В редакцию направляются 2 экземпляра рукописи, которые сопровождаются направлятельным письмом учреждения, заверенным ответственным лицом, на имя главного редактора журнала. К рукописи прилагается электронный носитель (диск — CD), содержание которого должно быть идентичным принтерной распечатке.

4. Текст печатается в тестовом редакторе Word шрифтом Times, 14 кеглем, через 1,5 интервала на листе А4. Поля верхнее и нижнее — 2,5 см, поле слева — 3,5 см, поля справа — 1,5. Запрещается использование автоматических переносов. Внизу справа проставляется нумерация страниц.

5. Объем оригинальных статей не должен превышать 8 страниц; обзоров — 15; кратких сообщений — 3 страницы. Исключение — заказные обобщающие статьи, объем которых оговаривается редколлекцией с автором.

6. Оформление титульной страницы:

- имя, отчество, фамилия(и) автора(ов);
- название статьи (без аббревиатуры);
- полное официальное название учреждения и его полный почтовый адрес;
- принадлежность авторов к учреждению обозначается надстрочным индексом в порядке упоминания.

7. Оригинальная статья должна содержать разделы:

- введение (краткое обоснование цели);
- методика (с четким, легко воспроизводимым описанием);
- результаты и обсуждение;
- литература.

8. К оригинальной статье необходимо приложить резюме с ключевыми словами (на русском и английском языках). Резюме должно отражать основное содержание работы. В начале резюме приводятся: УДК, фамилии авторов, затем название статьи. Резюме печатается на отдельной странице.

9. Статья тщательно выверяется автором(ами): формулы, таблицы, дозы визируются авторами на полях, латинские и греческие буквы помечаются на полях (лат., греч.).

10. Статья подписывается всеми авторами. На отдельной странице указываются полные сведения об авторах: ученая степень, ученое звание, должность, кафедра, отделение, почтовый и электронный адреса всех учреждений, телефоны.

11. Количество графического материала должно быть минимальным. Все цифровые данные должны сопровождаться соответствующими единицами в системе единиц СИ.

12. Таблицы должны быть компактными, названия должны точно соответствовать содержанию граф. Сокращения слов не допускается. Данные таблиц не

должны дублироваться графиками и повторяться в тексте статьи.

Обязательно указание методов, программ статистической обработки материала.

13. В формулах должны быть четко размечены все элементы: латинские буквы — синим, греческие — красным; индексы надстрочные (A^1) и подстрочные (A_1), буквы прописные (A) и строчные (a), сходные буквы и цифры (O, буква, 0, цифра).

14. Аббревиатура допускается только при первоначальном упоминании с указанием полного названия.

15. Цитируемая литература приводится в алфавитном порядке на отдельном листе. В статье, в квадратных скобках, дается ссылка на порядковый номер источника. В списке литературы сначала указываются отечественные авторы, потом иностранные. Работы отечественных авторов, опубликованные на иностранных языках, помещаются среди работ иностранных авторов в общем алфавитном порядке, а работы иностранных авторов, опубликованные на русском языке — среди работ отечественных авторов в общем алфавитном порядке.

Если цитируются несколько работ одного автора, их нужно указывать в хронологическом порядке. Статья, написанная коллективом авторов (более 4 авторов), помещается в списке литературы по фамилии первого автора, при этом указываются еще два автора, а далее ставится «и др.». Если авторов всего 4, то указываются все авторы. После фамилии авторов приводится полное название статьи, источник, год, том, номер, выпуск, страницы (от и до); для книг, сборников, авторефератов и диссертаций обязательно указать их точное название, издательство, город, год.

Книга, написанная коллективом авторов (более 4 человек), помещается в списке по ее названию, а далее через косую черту указываются фамилии трех авторов, далее ставится «и др.». В монографиях иностранных авторов, изданных на русском языке, после названия книги через двоеточие указывается с какого языка сделан перевод. Ссылки на неопубликованные работы, работы для ограниченного пользования, диссертации, рабочие документы ВОЗ не допускаются.

16. Направление в редакцию работ, опубликованных в других изданиях или же посланных для печати в другие редакции, не допускается.

17. Статьи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.

18. Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются.

19. Датой поступления статьи считается время поступления ее окончательного (переработанного) варианта.

20. Плата с аспирантов за публикацию рукописей не взимается.

Статьи направляются по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8. УРАМН НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Редакция журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия».

